

Aus dem

Department für Anatomie Tübingen

Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik

**Einfluss des Entwicklungsstadiums und des
Wnt-Signalwegs auf die Neurogenese von Progenitoren
des enterischen Nervensystems *in vitro***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Zhang, Ying

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 21.03.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Aufbau und Funktionen des enterischen Nervensystems	6
1.2	Entwicklung des enterischen Nervensystems	10
1.3	Stamm- und Progenitorzellen des enterischen Nervensystems	13
1.4	Wnt-Signalwege	14
1.5	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Computer-Software	20
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Glaswaren	21
2.1.4	Chemikalien	22
2.1.5	Antikörper	24
2.1.6	Zusammensetzung der Lösungen und Zellkulturmedien	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Präparation und Isolierung von murinen ENS-Zellen	27
2.2.2	Kultivierung von murinen ENS-Zellen	28
2.2.3	Grundprotokoll zur Immunzytochemie	31
2.2.4	<i>Whole mount</i> -Immunhistochemie	31
2.2.5	BrdU-Proliferationsassay	32
2.2.6	Detektion von Biozytin-markierten Zellen	33
2.2.7	Datenauswertung und Statistik	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Isolation und Expansion von ENS-Zellen in der Zellkultur	36
3.2	<i>In vitro</i> -Differenzierung von zuvor proliferierten ENS-Progenitoren	39
3.3	Entwicklungsabhängige Unterschiede zum Proliferations- und Differenzierungspotential von ENS-Progenitoren <i>in vitro</i>	42
3.4	Einfluss des Wnt-Signalwegs auf das Wachstum von Enterosphären	46
3.5	Einfluss des Wnt-Signalwegs in der Proliferationsphase auf die Differenzierung von ENS-Vorläuferzellen	50

4	Diskussion	54
4.1	Expansion, Differenzierung und Charakterisierung von neo- und postnatalen ENS-Vorläuferzellen des Darms	54
4.2	Entwicklungsabhängige Unterschiede zum Proliferations- und Differenzierungspotential von ENS-Progenitoren <i>in vitro</i>	60
4.3	Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Proliferation von ENS-Progenitoren <i>in vitro</i>	63
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	68
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Erklärungen zum Eigenanteil	81
8	Veröffentlichungen	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CK1 α	Caseinkinase 1 alpha
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKK	<i>Dickkopf-Related Protein</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
DVL	<i>Dishevelled Protein</i>
E18	Embryonaler Tag 18
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ENS	Enterisches Nervensystem
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GDNF	<i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
HBSS	<i>Hanks' Buffered Salt Solution</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor</i>
LGR	<i>Leucine-Rich Repeat Containing G-Protein-Coupled Receptor</i>
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein</i>
NOS1	Stickstoffmonoxid-Synthase 1
P0	Postnataler Tag 0
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
ROR	<i>Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor</i>
RYK	<i>Receptor-Like Tyrosine Kinase</i>
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i>
TCF/LEF	<i>T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor</i>
TUJ1	β -Tubulin III
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
(v/v)	<i>Volume Per Volume</i>
(w/v)	<i>Weight Per Volume</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde der Einfluss des Entwicklungsstadiums und des Wnt-Signalwegs auf die Neurogenese von kultivierten Progenitoren des enterischen Nervensystems (ENS) untersucht. Um in diese Thematik einzuführen, werden in der nachfolgenden Einleitung der Aufbau, die Funktionen und die Entwicklung des enterischen Nervensystems dargestellt und ein Überblick über Stamm- und Progenitorzellen des ENS sowie über die Wnt-Signalwege gegeben.

1.1 Aufbau und Funktionen des enterischen Nervensystems

Aufbau des ENS

Das enterische Nervensystem, als Teil des peripheren Nervensystems, besteht aus verschiedenen Subtypen an neuronalen und glialen Zellen, die ein komplexes zelluläres Netzwerk innerhalb der Wand des Verdauungstrakts bilden (Gershon 1999, Furness 2006, Furness 2012).

Die Gesamtzahl der Nervenzellen des ENS ist vergleichbar mit der Anzahl der Neurone im Rückenmark (Michel *et al.* 2022). Ausgehend von immunhistologischen Studien wurde die Gesamtzahl der ENS-Neurone bei der Maus auf 2,6 Millionen, beim Meerschweinchen auf 14,5 Millionen und beim Menschen auf 168 Millionen interpoliert (Michel *et al.* 2022). Die ermittelte neuronale Zelldichte in der Darmwand wies bei allen drei untersuchten Spezies ähnliche Werte auf. Dies weist darauf hin, dass die unterschiedliche Neuronenanzahl der analysierten Säugetierspezies sich in erster Linie von der Darmgröße und nicht von der Nervenzelldichte herleitet (Michel *et al.* 2022).

In Hinblick auf die Diversität der Nervenzellen können im ENS mindestens 17 verschiedene Subtypen an Neuronen in Bezug auf deren Zellmorphologie, elektrophysiologische Charakteristika oder Neurotransmitterausstattung unterschieden werden, die teilweise je nach der wissenschaftlichen Betrachtungsweise weiter unterteilt werden können (Furness 2000, Furness 2006). Zu den sekretierten Neurotransmittern und Neuropeptiden der exzitatorischen und inhibitorischen Neurone des ENS gehören unter anderem Acetylcholin, Noradrenalin, Stickstoffmonoxid, Serotonin, vasoaktives intestinales Peptid, Dopamin, Neuropeptid Y,

Substanz P, Adenosintriphosphat, Gamma-Aminobuttersäure, Enkephalin oder Cholecystokinin (Furness 2000, Benarroch 2007).

In Analogie zum zentralen Nervensystem finden sich im ENS sensorische Neurone, Interneurone sowie Effektor- bzw. Motorneurone, die spezifische neuronale Schaltstellen für intramurale Regelkreise im gastrointestinalen System bilden und an extramuralen Reflexbögen mit parasympathischen und sympathischen Ganglien und höheren Schaltstellen des zentralen Nervensystems über die sogenannte „Gut-Brain-Achse“ beteiligt sind (Konturek *et al.* 2004, Schemann und Neunlist 2004, Furness 2006, Schneider *et al.* 2019). Darüber hinaus steht das ENS mit dem ZNS über das endokrine System in Verbindung (Schneider *et al.* 2019).

Enterische Gliazellen stehen im engen Kontakt mit Nervenzellen und nicht-neuronalen Zellen und sind im Zusammenspiel mit den Neuronen für die Funktionalität des ENS im Gastrointestinaltrakt essentiell (Pawolski und Schmidt 2020).

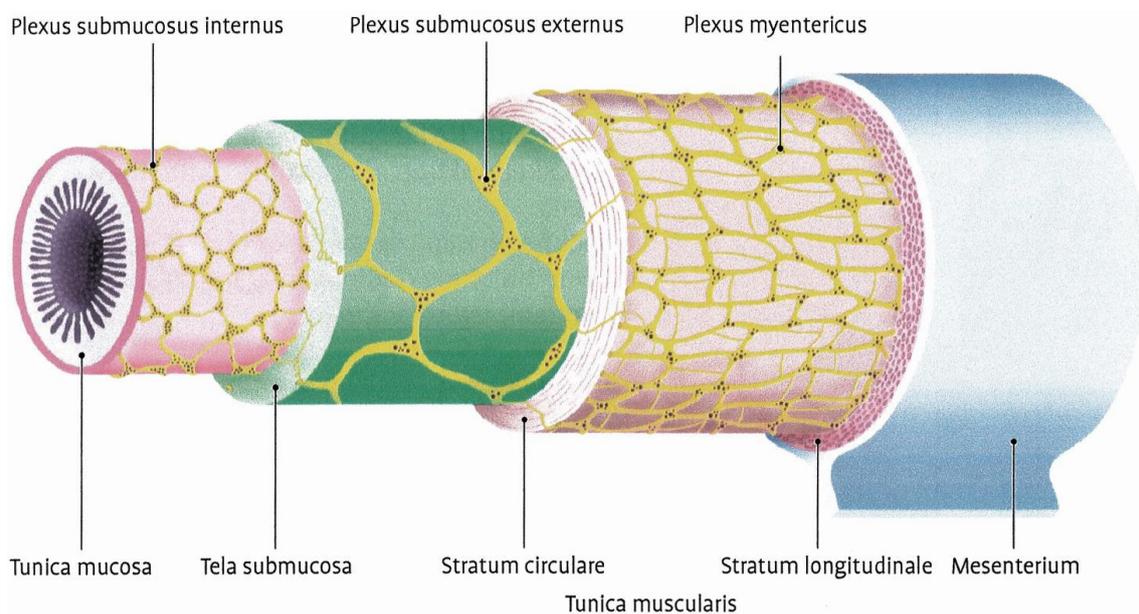


Abb. 1: Schematische Darstellung der Nervenplexus des enterischen Nervensystems in topographischer Beziehung zu den Darmwandschichten. Der *Plexus myentericus* liegt zwischen dem *Stratum longitudinale* und dem *Stratum circulare* der *Tunica muscularis*. Der *Plexus submucosus* befindet sich in der *Tela submucosa*. In dieser Abbildung sind zwei Untereinheiten des *Plexus submucosus*, nämlich der *Plexus submucosus internus* und der *Plexus submucosus externus* dargestellt. Die Abbildung wurde entnommen aus: (Anderhuber *et al.* 2012).

Vier Subtypen an enterischen Gliazellen können über die Zellmorphologie und glialen Marker wie *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), S100 β oder SOX-10 im Gastrointestinaltrakt unterschieden werden (Boesmans *et al.* 2015).

Die Vielfalt und Anzahl der neuronalen und glialen Subtypen sowie die Komplexität des ENS-Netzwerks erklärt das hohe Maß an Autonomie des „Darmgehirns“ bei der Regulation intestinaler Funktionen (Gershon 1999, Furness 2000, Pawolski und Schmidt 2020).

Die Zellkörper der ENS-Neurone gruppieren sich gemeinsam mit Gliazellen überwiegend in Form von Ganglien, die zusammen mit den Nervenfasern und extraganglionären Gliazellen zwei Hauptplexus innerhalb der Wand des Verdauungstraktes bei Säugern bilden (Gershon 1999, Furness 2006, Heanue und Pachnis 2007). Die Ganglien des *Plexus myentericus* liegen in einer Bindegewebsschicht zwischen dem *Stratum circulare* (Ringmuskelschicht) und dem *Stratum longitudinale* (Längsmuskelschicht) der *Tunica muscularis* (Abb. 1). Demgegenüber finden sich die Ganglien des *Plexus submucosus* in der *Tela submucosa*, einer Wandschicht des Darmrohrs zwischen der *Tunica mucosa* und der *Tunica muscularis*.

Je nach Spezies können bei beiden Hauptplexus weitere Untereinheiten in den Wandschichten beschrieben werden. Der *Plexus submucosus* beim Menschen lässt sich beispielsweise in drei kleineren Plexus innerhalb der *Tela submucosa* unterteilen (Wedel *et al.* 1999).

Auch wenn die Ganglien der beiden Hauptplexus in der *Tunica muscularis* und *Tela submucosa* der Darmwand lokalisiert sind, innervieren diese Neurone mit ihren Zellausläufern im Verbund mit den Gliazellen alle Wandschichten inklusive der *Tunica mucosa* (Wedel *et al.* 1999, Furness 2006, Boesmans *et al.* 2015).

Je nach Neuronentyp stehen die Nervenzellen mit ihren Fortsätzen dabei in engem Kontakt mit neuronalen Zellen und verschiedenen nicht-neuronalen intestinalen Zellen wie Gefäßendothelzellen, Immunzellen, Drüsenzellen, Schleimhautepithelzellen, glatte Muskelzellen oder Schrittmacherzellen, die sogenannten interstitiellen Zellen von Cajal (Schneider *et al.* 2019, Chanpong *et al.* 2022).

Bei Betrachtung des gesamten Verdauungssystems erstreckt sich der *Plexus myentericus* bei den Säugetieren vom Ösophagus bis zum Analkanal, während der Plexus submucosus im Wesentlichen nur von Beginn des Darms bis zum Analkanal voll ausgeprägt ist. Im Ösophagus und Magen finden sich bei Kleinsäugetieren in der Regel keine und bei großen Säugetieren nur eine geringe Anzahl von Ganglien in der *Tela submucosa* (Furness 2006).

In diesem Zusammenhang ist es zu betonen, dass die Zusammensetzung der Neuronentypen und deren Innervationsmuster zwischen den Regionen des Verdauungstrakts innerhalb einer Spezies sowie zwischen verschiedenen Spezies erheblich variieren können (Furness 2006).

Funktionen des enterischen Nervensystems

Das ENS reguliert die Motorik, den Wasser- und Elektrolythaushalt sowie den intramuralen Blutfluss des Verdauungssystems (Schemann und Neunlist 2004, Furness 2006). Zusätzlich interagiert es mit dem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe und über diesen Weg auch mit dem intestinalen Mikrobiom (Schneider *et al.* 2019, Jacobson *et al.* 2021).

Darüber hinaus konnten in mehreren Arbeiten Effekte des ENS auf das Schleimhautepithel beschrieben werden. So steuern enterische Neurone die epitheliale Sekretion von Elektrolyten sowie die Freisetzung von Hormonen der enteroendokrinen Zellen. Ebenso lässt sich ein Einfluss auf das epitheliale Stammzellkompartiment der Schleimhaut und somit auf die Proliferation und Regeneration der Epithelzellen beobachten (Schneider *et al.* 2019, Chanpong *et al.* 2022).

Funktionsstörungen des ENS, die sich auf die Motilität, das Immunsystem, den intestinalen Blutfluss und/oder das Schleimhautepithel auswirken, können zu schwerwiegenden Erkrankungen des Verdauungssystems führen bzw. dazu beitragen. Beispielsweise sind hier die Ösophagusachalasie, Morbus Hirschsprung, die chronische intestinale Pseudoobstruktion oder die nekrotisierende Enterokolitis zu nennen (Schneider *et al.* 2019, Holland *et al.* 2021, Niesler *et al.* 2021).

Wie bereits zuvor ausgeführt, ist das ENS über extrinsische und intrinsische Verbindungen mit dem Parasympathikus und Sympathikus und damit mit dem ZNS verbunden. ENS und ZNS beeinflussen sich dabei über diese „Gut-Brain-Achse“ gegenseitig. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei distinkten Neuropathien des ZNS wie beispielsweise bei Morbus Parkinson, amyotropher Lateralsklerose oder Multiple Sklerose parallele Mechanismen und/oder Wechselwirkungen im Zusammenhang mit dem ENS diskutiert werden (Klingelhoefer und Reichmann 2015, Rao und Gershon 2016, Wunsch *et al.* 2017).

1.2 Entwicklung des enterischen Nervensystems

Die Neurone und Gliazellen des enterischen Nervensystems leiten sich von Stammzellen der Neuralleiste ab, eine transiente Zone, die sich während der frühen embryonalen Entwicklung bei der Formation des Neuralrohrs bildet (Goldstein *et al.* 2013).

Der überwiegende Teil der neuralen Zellen stammt dabei von vagalen Neuralleistenzellen und ein kleinerer Anteil von trunkalen sowie sakralen Neuralleistenzellen ab, die zunächst segmentabhängig in den Verdauungstrakt einwandern (Yntema und Hammond 1954, Le Douarin und Teillet 1973, Heanue und Pachnis 2007), (Abb. 2). Nach der Einwanderung der vagalen Neuralleistenzellen in den Vorderdarm migrieren diese Zellen von rostral nach kaudal und besiedeln in zeitlicher Reihenfolge alle Bereiche des embryonalen Verdauungstrakts (Lake und Heuckeroth 2013, Kang *et al.* 2021). Demgegenüber besiedeln die trunkalen und sakralen Neuralleistenzellen ihr entsprechendes Zielsegment, d.h. die trunkalen Zellen den Vorderdarm und die sakralen Zellen den Hinterdarm des Embryos (Heanue und Pachnis 2007), (Abb. 2).

Während der Migration in der embryonalen Darmwand findet dabei ein fortlaufender Prozess der Zellproliferation und Zelldifferenzierung der Neuralleistenabkömmlinge statt (Heanue und Pachnis 2007). Bei der Maus verlassen die vagalen Neuralleistenstammzellen die Neuralleiste zum Stadium Embryonaltag 8,5 (E8,5) und erreichen an E9,0 bis E9,5 den Vorderdarm (Durbec *et al.* 1996, Anderson *et al.* 2006). Die Besiedlung aller Darmabschnitte von rostral nach

kaudal ist zwischen den Zeitpunkten E13,5 und E14,0 abgeschlossen (Young *et al.* 1998, Goldstein *et al.* 2013). Beim Menschen erfolgt die Einwanderung und die vollständige Besiedlung des Darms durch die vagalen Neuralleistenzellen zwischen der vierten und siebten Schwangerschaftswoche. (Wallace und Burns 2005, Goldstein *et al.* 2013).

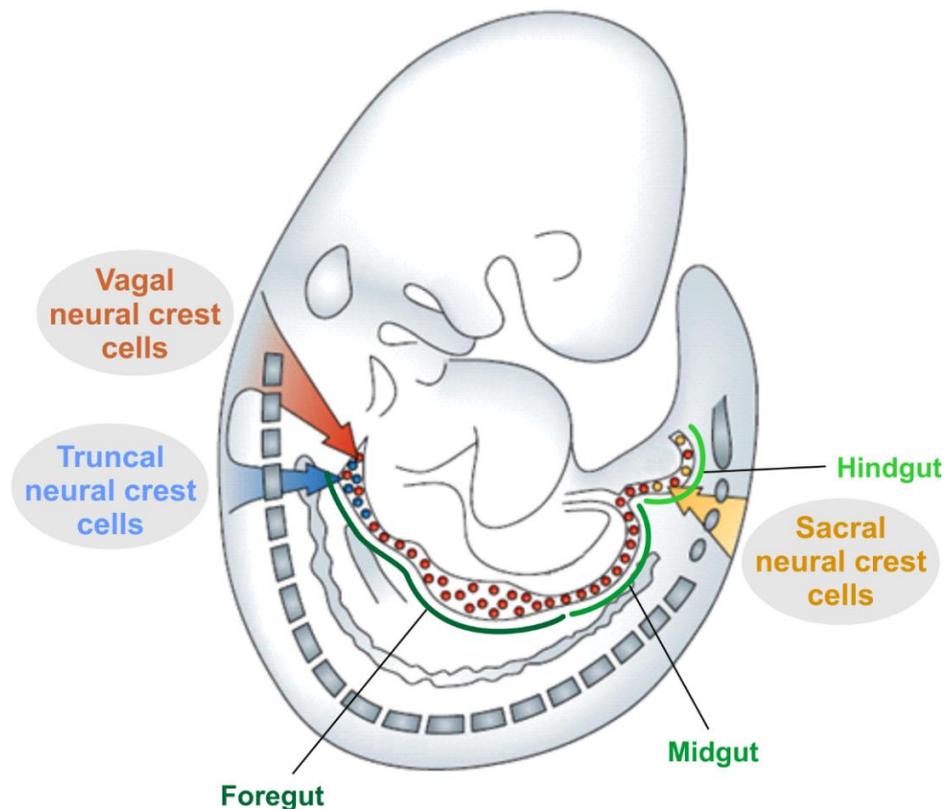


Abb. 2: Schematische Darstellung zur Entwicklung des ENS im Säugetierembryo. Der embryonale Darm lässt sich in Vorderdarm, Mitteldarm und Enddarm (*Foregut, Midgut, Hindgut*) einteilen. Die neuronalen Zellen des Verdauungstrakts stammen von vagalen, trunkalen und sakralen Neuralleistenzellen (*vagal, truncal, sacral neural crest cells*) ab. Die vagalen Neuralleistenzellen (roter Pfeil) wandern zunächst in den Vorderdarm ein und besiedeln zeitabhängig den kompletten Darm von rostral nach kaudal. Eine kleinere Population von trunkalen Neuralleistenzellen (blauer Pfeil) besiedeln darüber hinaus Teilbereiche des Vorderdarms. Die sakralen Neuralleistenzellen (gelber Pfeil) besiedeln zusätzlich zu den vagalen Neuralleistenzellen den Hinterdarm. Modifizierte Abbildung entnommen aus: (Heanue und Pachnis 2007).

Während der intestinalen Wanderung exprimieren die von der Neuralleiste abstammenden undifferenzierten Progenitoren an der Migrationsfront typische Marker wie SOX-10, die Rezeptortyrosinkinase Ret, p75, Phox2b, Mash1 und den

Endothelinrezeptor B (Goldstein *et al.* 2013). Mit zunehmender Differenzierung ändert sich dieses Expressionsmuster und es werden in zeitabhängiger Weise von den sich entwickelten Tochterzellen neuronale und gliale Differenzierungsmarker während der fortschreitenden embryonalen und frühpostnatalen Entwicklung heraufreguliert (Goldstein *et al.* 2013, Kang *et al.* 2021). Neben dem Auswachsen von Neuriten erfolgt dabei die Bildung und Strukturierung der Ganglien in der Darmwand (Uesaka *et al.* 2016). Dabei formieren sich bei den Säugetieren zuerst die Ganglienzellen des *Plexus myentericus* und zeitversetzt die Ganglien des *Plexus submucosus* (Nagy und Goldstein 2017).

Die Migration, Zellproliferation und Differenzierung der eingewanderten Neuralleistenabkömmlinge wird dabei über ein komplexes Muster im Zusammenspiel mit unterschiedlichen Faktoren wie zum Beispiel SOX-10, Endothelin-3, Semaphorin-3A, *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) oder der Rezeptortyrosinkinase Ret gesteuert (Goldstein *et al.* 2013, Lake und Heuckeroth 2013, Obermayr *et al.* 2013).

Postnatal erfolgen weitere Differenzierungsschritte sowohl der neuronalen als auch der glialen ENS-Zellen (Hao *et al.* 2013, Pawolski und Schmidt 2020). Gleichzeitig findet in der frühen postnatalen Entwicklung die weitergehende Formierung der synaptischen Verbindungen des neuronalen Netzwerks statt. Damit verbunden manifestiert sich die neuronale Steuerung der Darmfunktionen wie beispielsweise die Feinregulation der Darmmotorik (Hao *et al.* 2013, Pawolski und Schmidt 2020).

Mutationen derjenigen Gene, deren Proteine bei den Entwicklungsprozessen eine Schlüsselrolle spielen, können zu einer Reduktion oder zu einem Fehlen enterischer Ganglienzellen in den entsprechenden Darmabschnitten wie beispielsweise bei Morbus Hirschsprung führen (Lake und Heuckeroth 2013, Obermayr *et al.* 2013). Morbus Hirschsprung mit einer Inzidenz von 1:5000 ist eine angeborene Fehlbildung des ENS. Dabei tritt während der Embryonalentwicklung eine segmentale Hypo- und Aganglionose überwiegend im Enddarm auf, die über einen erhöhten Einfluss parasymphathischer Nervenfasern zu einer

chronischen Obstruktion des betroffenen Darmabschnittes führt (Heuckeroth 2018). Proximal der Obstruktion kommt es zu einer Aufstauung der Fäzes und zur Ausbildung eines Megakolons (Heuckeroth 2018). Über 12 Mutationen werden in Zusammenhang mit Morbus Hirschsprung gebracht, die überwiegend eine Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellabkömmlinge spielen (Obermayr *et al.* 2013).

1.3 Stamm- und Progenitorzellen des enterischen Nervensystems

Wie in Abschnitt 1.2 dargelegt, stammen die neuronalen und glialen Zellen des enterischen Nervensystems von Stammzellen der Neuralleiste ab, die während der embryonalen Entwicklung in den Darm einwandern und diesen besiedeln. Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten deutet darauf hin, dass ein Anteil der Zellabkömmlinge der Neuralleistenzellen ihren Stammzell- oder Progenitorstatus in den verschiedenen Entwicklungsstadien des ENS bis hin zum Erwachsenenalter behalten. So können ENS-Progenitorzellen aus embryonalem, frühpostnatalem und adultem intestinalem Gewebe von unterschiedlichen Spezies wie der Maus, der Ratte oder dem Menschen isoliert werden (Kruger *et al.* 2002, Bondurand *et al.* 2003, Suarez-Rodriguez und Belkind-Gerson 2004, Rauch *et al.* 2006, Lindley *et al.* 2009, Metzger *et al.* 2009a, Metzger *et al.* 2009b, Rollo *et al.* 2016). Diese Zellen lassen sich in der Zellkultur unter Verwendung von Wachstumsfaktoren zur Proliferation anregen und nachfolgend zu enterischen Neuronen und Gliazellen differenzieren. Dabei konnten selbst aus Darmbiopsien von über 50-jährigen Patienten adulte humane ENS-Progenitoren gewonnen und *in vitro* vermehrt werden (Metzger *et al.* 2009a).

Transplantationsstudien in verschiedenen Tiermodellen belegen, dass isolierte ENS-Progenitorzellen nach deren Implantation das Potential aufweisen, sich in das intestinale Empfängergewebe zu integrieren (Almond *et al.* 2007, Pan *et al.* 2011, Hotta *et al.* 2013, Hetz *et al.* 2014). Diese vielversprechenden Experimente bilden eine Ausgangsbasis für die Entwicklung von zukünftigen Zelltherapien bei bestimmten intestinalen Neuropathien (Burns *et al.* 2016).

In Bezug auf eine postnatale Neurogenese im Verdauungstrakt *in vivo* deuten tierexperimentale Daten darauf hin, dass unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei inflammatorischen Ereignissen, neue Nervenzellen gebildet werden können (Laranjeira *et al.* 2011, Belkind-Gerson *et al.* 2015, Jonscher und Belkind-Gerson 2019).

Zurzeit werden drei Wege für eine postnatale Neurogenese bei regenerativen Prozessen *in vivo* postuliert: Erstens - wie zuvor beschrieben - über eine Population von persistierten neuralen Progenitoren, die bei der embryonalen Bildung des ENS nicht differenzierten; zweitens über enterische Gliazellen, die sich über ein Zwischenzellstadium, sogenannte Intermediärzellen, zu Neuronen transdifferenzieren und drittens über extramurale Schwann-Zell-Vorläuferzellen, die in den Darm einwandern und sich ebenfalls zu Neuronen entwickeln können (Jonscher und Belkind-Gerson 2019, Pawolski und Schmidt 2020).

Inwieweit eine Neurogenese unter normalen physiologischen Bedingungen im adulten Gastrointestinaltrakt stattfindet, ist noch nicht eindeutig geklärt und wird derzeit kontrovers diskutiert (Kulkarni *et al.* 2017, Jonscher und Belkind-Gerson 2019, Virtanen *et al.* 2022).

1.4 Wnt-Signalwege

Die Wnt-Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, bei der sie die Determination, Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen bzw. Geweben mitbeeinflussen (Willert und Nusse 2012, Clevers *et al.* 2014, Ji *et al.* 2019, Rim *et al.* 2022). Postnatal sind sie im Verbund mit weiteren Signalwegen unter anderem an der Steuerung von Regenerationsprozessen und Stammzellnischen beteiligt. Beispielsweise werden durch Wnt-Moleküle die Homöostase von adulten Stammzellen aus verschiedenen Geweben wie bei der Epidermis, bei der Brustdrüse, beim intestinalen Schleimhautepithel, beim Haarfollikel oder beim Hippocampus reguliert (Clevers *et al.* 2014, Arredondo *et al.* 2020). Störungen oder Mutationen, die die Wnt-Signalkaskade betreffen, beispielsweise Mutationen des *Adenomatous Polyposis Coli*-Gens (APC-Gens), können zu einer Dysbalance bei der Regulation der Zellproliferation und damit

verbunden zur Bildung von malignen Tumoren führen (Ng *et al.* 2019).

Die verschiedenen Wnt-Signalwege werden durch Wnt-Proteine aktiviert (Rim *et al.* 2022). Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die mit etwa 350 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 40 kDa untereinander eine ähnliche molekulare Struktur aufweisen (Schuijers und Clevers 2012, Willert und Nusse 2012). Bisher sind 19 unterschiedliche hochkonservierte Wnt-Moleküle bei den Säugtieren beschrieben worden, die an 10 verschiedene spezifische Frizzled-Rezeptoren binden können (Rim *et al.* 2022).

Neben den Frizzled-Rezeptoren binden Wnt-Proteine an weitere Rezeptoren bzw. Ko-Rezeptoren, zu denen die *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Proteins* (LRP-Rezeptoren), die *Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptors* (ROR-Rezeptoren) oder die *Receptor-Like Tyrosine Kinase* (RYK-Rezeptor) gehören (Inestrosa und Varela-Nallar 2015). Es ist jedoch zu betonen, dass nicht nur die Wnt-Proteine die Wnt-Signalkaskaden beeinflussen, sondern beispielsweise auch die Proteinfamilie der R-Spondine, Norrin oder die Wnt-Antagonisten *Dickkopf-Related Proteins* (DKKs), (Willert und Nusse 2012).

Generell lassen sich die Wnt-Signalkaskaden in die kanonischen und die nicht-kanonischen Signalwege einteilen, die bei der Regulation der Zellproliferation, Zelldetermination, Differenzierung, Zellpolarisierung oder Migration beteiligt sind (Clevers *et al.* 2014, Bengoa-Vergniory und Kypta 2015, Inestrosa und Varela-Nallar 2015, Rim *et al.* 2022). Beim β -Catenin-abhängigen (kanonischen) Signalweg führt eine Aktivierung von Wnt zu einer intrazellulären Akkumulation des Proteins β -Catenin, welches im Zellkern die Genexpression über eine Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren induziert (Rim *et al.* 2022). Die nicht-kanonischen Signalwege sind β -Catenin-unabhängig. Zu ihnen gehören beispielsweise der Wnt/Calciumionen-Signalweg, der Wnt/PCP-Signalweg oder der Wnt/RTK-Signalweg (Bengoa-Vergniory und Kypta 2015). Der in der Vergangenheit vorgenommene Versuch einzelne zelluläre Prozesse einer bestimmten Wnt-Signalkaskade zuzuordnen, hat aufgrund neuerer Erkenntnisse häufig keinen Bestand mehr, da die unterschiedlichen Signalwege miteinander vernetzt sind. Beispielsweise wird in Bezug auf die Neurogenese im zentralen Nervensystem darauf hingewiesen, dass bei der Zellhomöostase der Stammzellnischen sowohl

kanonische als auch nicht-kanonische Wnt-Signalwege beteiligt sind (Bengoa-Vergniory und Kypta 2015).

Die in der Promotionsarbeit verwendeten Pharmaka wirken, wenn auch nicht bei jedem Wirkstoff exklusiv, auf den kanonischen Signalweg. In Abbildung 3 wird daher nachfolgend dieser Wnt-Signalweg, für den in der Literatur die meisten Erkenntnisse vorliegen, näher illustriert (Abb. 3), (Rim *et al.* 2022).

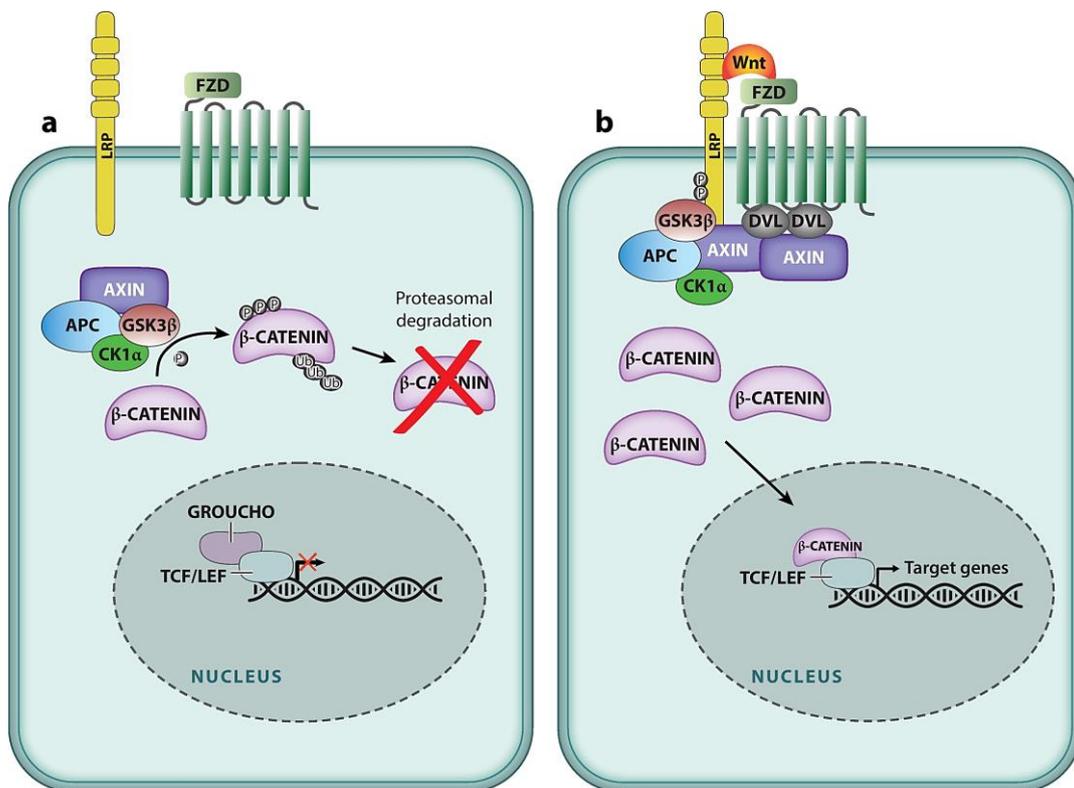


Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung zum kanonischen Wnt-Signalweg.

Auf der linken Seite der Abbildung (a) sind die intrazellulären Verhältnisse skizziert, wenn kein Wnt-Ligand am Frizzled-Rezeptor (FZD) und *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-Ko-Rezeptor* (LRP) bindet. Unter diesen Bedingungen phosphorylieren in einem Komplex mit dem AXIN-Protein und dem *Adenomatous Polyposis Coli-Protein* (APC) die Caseinkinase 1 alpha (CK1α) und die Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK3β) das Protein β-Catenin. Die Phosphorylierung von β-Catenin führt nachfolgend zu seiner proteasomalen Degradation. Dadurch steht es für eine Genaktivierung im Zellkern (*Nucleus*) nicht zur Verfügung. Auf der rechten Seite der Abbildung (b) ist die Genaktivierung durch einen Wnt-Liganden illustriert. Durch Bindung von Wnt an FZD und LRP5/6 kommt es zur Phosphorylierung von LRP5/6 und zur Rekrutierung von Dishevelled (DVL) und AXIN an die Wnt-gebundenen Rezeptoren. Dies führt zu einer Hemmung der GSK3β-getriebenen Phosphorylierung von β-Catenin. Dadurch kann sich β-Catenin im Zytoplasma akkumulieren und in den Zellkern transportiert werden, wo es die Blockade von Groucho auf die Transkriptionsfaktor-Familie *T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor* (TCF/LEF) aufhebt und die Wnt-spezifische Genexpression aktiviert. Die Abbildung wurde entnommen aus: (Rim *et al.* 2022).

Beim kanonischen Wnt-Signalweg führt die Bindung eines Wnt-Liganden an einen Frizzled-Rezeptor und *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein*-Ko-Rezeptor über mehrere Zwischenschritte zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma (Abb. 3), (Rim *et al.* 2022). Nach seinem Transport in den Zellkern kann β -Catenin dort über eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der *T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*-Familie die Expression von spezifischen Genen des kanonischen Signalwegs initiieren. Findet keine Bindung von Wnt-Molekülen an die Wnt-Rezeptoren statt, wird β -Catenin durch die Caseinkinase 1 alpha und die Glykogensynthase-Kinase 3 beta phosphoryliert und dadurch nachfolgend im Proteasom abgebaut (Abb. 3), (Rim *et al.* 2022).

1.5 Fragestellung

Die Isolation und Kultivierung von neuronalen Progenitoren des enterischen Nervensystems bieten eine interessante Option, mit diesem *In vitro*-Modell Fragestellungen zur Regulation der entwicklungsabhängigen Neurogenese und zu Zell-Zellinteraktion zwischen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen des Gastrointestinaltrakts zu erforschen.

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden diesbezüglich zwei Hauptziele verfolgt: Zum einen sollten die Protokolle zur Isolation und Kultivierung von fötalen und neonatalen ENS-Progenitoren der Maus weiterentwickelt und das Neurogenese-Potential der Vorläuferzellen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium ermittelt werden.

Zum anderen sollte der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Neurogenese von neonatalen murinen Progenitoren des ENS *in vitro* untersucht werden. Dabei sollten bekannte Faktoren, die den Wnt-Signalweg beeinflussen, in den Zellkultur-Experimenten eingesetzt werden.

Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurden verschiedene Zellkulturverfahren, BrdU-Markierungsmethoden und Immunfluoreszenztechniken zur Detektion und Auswertung der intestinalen Zellen angewandt.

Die Erkenntnisse aus der Promotionsarbeit sollen dazu beitragen, die Mechanismen zur Regulation der Proliferation und Differenzierung von neuronalen Progenitoren des gastrointestinalen Systems besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerätetyp	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Brutschrank Cytoperm 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dampfsterilisator 5075 ELV	Systec, Linden, Deutschland
Eismaschine AF103	Scotsman, Ipswich, UK
Heizrührer, Ikamag RCT	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Hybridisierungsöfen, Hybaid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Observer.Z1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
PC-Workstation	Dell Technologies, Round Rock, USA
pH-Meter	Innolab WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten 1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Powerette Plus	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwannenhalslampe KL1500	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Spülmaschine G 7783	Miele, Gütersloh, Deutschland
Stereolupe M 205	Leica, Wetzlar, Deutschland
Stereolupe Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Sterilbank HeraGuard HPH 18/95	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank T6200 Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Gerätetyp	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Ultraschallbad Elma S10	Elmasonic, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Vortexer, Genie 2, Scientific Industries	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waage (Feinwaage) AZ214	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage CP3202P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad WNB10	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler DRS-12	neoLap Migge, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Computer-Software

Software-Bezeichnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Axio Vision 4.8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Corel Draw XI	Corel, München, Deutschland
Endnote X7	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
MS Excel 2007	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
MS Office 2007	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
SigmaStat 3.5	Systat Software, Chicago, USA
ZEN 2	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Materialien	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Bechergläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Glasflaschen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Klingen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Messzylinder	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Petrischalen 35 mm, 94 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
6-Well-Multiwell-Platte Costar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
12-Well-Multiwell-Platte Costar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
24-Well-Multiwell-Platte Costar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
48-Well-Multiwell-Platte Costar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Well-Platte mit rundem Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellsiebe 30 µm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Chemikalienbezeichnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua. dest.	Apotheke des UKT Tübingen, Deutschland
Ascorbat-2-phosphat	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
B27 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Biozytin	Tocris Biosciences, USA
<i>basic Fibroblast Growth Factor</i> (bFGF)	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Kollagenase Typ XI	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dickkopf-Related Protein 1 (DKK1)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Dinatriumtetraborat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dispase II	Roche, Mannheim, Deutschland
DMEM/F12-Zellkulturmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNase I	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
SYTOX™ Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF)	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
<i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i> (GDNF)	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS) mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland

Chemikalienbezeichnung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Kaisers Glycerin-Gelatine	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen Typ I	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
N2-Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Norrin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	PAA, Cambridge, UK
Rinderserumalbumin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
R-Spondin1	R&D Systems, Minneapolis, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SB216763	Enzo life sciences, Lörrach, Deutschland
Streptavidin-Cy3 (500 x)	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
Streptomycin	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Triton™ X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Wnt3a	R&D Systems, Minneapolis, USA
Ziegenserum	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller
Anti-BrdU	Ratte	1:50	AbD Serotec, Oxford, UK
Anti-GFAP	Kaninchen	1:500	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-HuC/D	Maus	1:100	Molecular Probes, Leiden, NL
Anti-NOS1	Kaninchen	1:5000	R&D Systems, Las Vegas, USA
Anti-PGP 9.5	Kaninchen	1:500	AbD Serotec, Oxford, UK
Anti-S100 β	Kaninchen	1:5000	Swant, Bellinzona, Schweiz
Anti-Smooth Muscle Actin	Kaninchen	1:100	Spring Bioscience, Fremont, USA
Anti- β -Tubulin III	Kaninchen	1:2000	Covance, Emeryville, USA.
Anti- β -Tubulin III	Maus	1:500	Covance. Emeryville, USA

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Verdünnung	Hersteller	Fluorophor
Anti-Maus IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	Cy3
Anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	Cy3
Anti-Ratte IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	Cy3
Anti-Ratte IgG	1:500	Invitrogen, Carlsbad, USA	Alexa 488
Anti-Maus IgG	1:500	Invitrogen, Carlsbad, USA	Alexa 488
Anti-Kaninchen IgG	1:500	Invitrogen, Carlsbad, USA	Alexa 488

2.1.6 Zusammensetzung der Lösungen und Zellkulturmedien

Präparationsmedium

- 1x *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml)

Gewebedissoziationslösung

- 1x *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- 750 U/ml Kollagenase (Typ XI)
- 250 µg/ml Dispase II

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch frisch angesetzt und sterilfiltriert.

Proliferations-Zellkulturmedium

- DMEM/F12 ohne L-Glutamin
- 2 mM L-Glutamin
- Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml)
- 1 % (v/v) N2 Supplement (100 X)
- 20 ng/ml EGF, tägliche Zugabe
- 20 ng/ml bFGF, tägliche Zugabe
- 2 % (v/v) B-27 Supplement (50 X); Zugabe erfolgt nur am ersten Tag

Differenzierungs-Zellkulturmedium

- DMEM/F12 ohne L-Glutamin
- 2 mM L-Glutamin
- Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml)
- 1 % (v/v) N2 Supplement (100 X)
- 200 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
- 2 % (v/v) *Fetal Calf Serum*

Boratpufferlösung (0,1 M, pH 8,5)

Herstellungsprotokoll für einen Liter

- 38,14 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
- zunächst in 0,75 l Aqua dest. lösen
- pH-Wert auf pH 8,5 mit 1 N HCL einstellen und die Lösung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Phosphatpufferlösung (10x PBS, pH 7,4)

Herstellungsprotokoll für einen Liter 10 X PBS:

- 81,8 g NaCl
- 2,0 g KCl
- 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat
- 17,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
- zunächst in 0,75 l Aqua dest. lösen
- pH-Wert auf pH 7,4 mit 1 N HCl einstellen und die Lösung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
- vor Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und pH-Wert kontrollieren

Formaldehydfixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4)

Herstellungsprotokoll für einen Liter:

- 100 ml 10 X PBS
- 800 ml Aqua dest.
- Lösung auf 60 °C erhitzen
- 40 g Paraformaldehyd unter einem Abzug abwiegen, zugeben und lösen
- zunächst 1 - 2 ml 10 N NaOH zugeben
- Danach die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- pH-Wert auf pH 7,4 mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl einstellen und die Lösung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
- mit Papierfilter filtrieren

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Isolierung von murinen ENS-Zellen

Die Zellisolierung von ENS-Zellen erfolgte unabhängig vom Geschlecht aus Dünndärmen von spätfötalen (embryonales Stadium E18) und neonatalen (P0) C57BL/6 Mäusen. Die trächtigen Weibchen, Muttertiere und neugeborenen Mäuse wurden in Standardkunststoffkäfigen im 12-Stunden-Licht-Dunkel-Zyklus bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C und bei einer Luftfeuchtigkeit von $60 \% \pm 5 \%$ gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Die Haltung und Tötung der Tiere erfolgte gemäß den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes und der Universität Tübingen, die den internationalen Richtlinien entsprechen. Die entsprechende Anzeige nach § 4 Abs. 3 (02/04/09) „Tötung von Wirbeltieren zur Organentnahme“ wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

Die Sakrifizierung der trächtigen Mäuse erfolgte durch eine verlängerte CO₂-Inhalationsnarkose und nachfolgendem Überstrecken des Genicks. Die fötalen und neonatalen Mäuse wurden mittels einer fachgerechten Dekapitation getötet. Die Präparation, Zellisolierung und Zellaussaat erfolgten jeweils unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank oder unter Verwendung von sterilen geschlossenen Gefäßen.

Für die Zellisolation aus den murinen Föten wurde das trächtige Tier getötet und das Abdomen mit einer 70 %igen (v/v) Ethanollösung desinfiziert. Nach Öffnung der Hautschichten und des Abdomens erfolgte die Resektion des Uterus und die Entnahme der Föten, die nachfolgend fachgerecht dekapitiert wurden. Die neonatalen Mäuse wurden ebenfalls dekapitiert und danach die Hautoberfläche mit einer 70 %igen (v/v) Ethanollösung desinfiziert.

Anschließend wurde bei beiden Entwicklungsstadien das Abdomen eröffnet und der Darm nach dessen Resektion in eine Petrischale mit gekühltem Präparationsmedium überführt.

Nachfolgend wurden die Mesenterien mit einer Mikroschere von der Darmwand entfernt und der Dünndarm in eine neue mit gekühltem Präparationsmedium gefüllte Petrischale transferiert. Mit Hilfe von zwei Mikropinzetten ließ sich die *Tunica muscularis* mit den enthaltenen *Plexus myentericus* von den übrigen

Dünndarmschichten abtrennen. Anschließend wurde das abgezogene Gewebe mit zwei Skalpellern zerkleinert und in eine Kollagenase/Dispase-haltigen Gewebedissoziationslösung überführt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Gewebedissoziationslösung DNase I (Endkonzentration: 0,05 % (w/v)) zugegeben und das Gewebe mit abgeflamten Pipettenspitzen vorsichtig trituiert. Durch Zugabe von *Fetal Calf Serum* (Endkonzentration: 2 % (v/v)) wurde der enzymatische Verdauungsprozess gehemmt. Danach wurden die Zellen durch einen zweimaligen Zentrifugationsschritt bei jeweils 200 x g mit frischer HBSS-Lösung gewaschen und anschließend über ein Zellsieb mit einem Porendurchmesser von 30 µm aufgereinigt. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und in entsprechende Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.2 Kultivierung von murinen ENS-Zellen

Nach der Gewebe- und Zellpräparation ließen sich die aus der *Tunica muscularis* vereinzelt Zellen mit Hilfe eines definierten Proliferations-Zellkulturmediums für mehrere Wochen in der Zellkultur expandieren oder durch Verwendung eines Differenzierungs-Zellkulturmediums differenzieren. Für die Experimente im Rahmen der Promotionsarbeit erfolgte die Differenzierung der ENS-Zellen in der Regel nach einer zuvor durchgeführten Proliferationsphase. Die Kultivierung der Zellen wurde in Inkubatoren bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 37 °C durchgeführt.

Grundprotokoll zur Zellexpansion

Für die Zellexpansion wurden die isolierten Zellen in Proliferations-Zellkulturmedium mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in Zellkulturwellplatten ausgesät. Bei der Aussaat wurde dem Medium einmalig B27-Supplement (1:50) zugegeben. Die Gabe der Wachstumsfaktoren *Epidermal Growth Factor* (EGF), (20 ng/ml) und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), (20 ng/ml) erfolgte täglich

und der Austausch des Proliferationsmediums wurde alle drei Tage für bis zu zwei Wochen durchgeführt.

Unter den gewählten proliferativen Kulturbedingungen bildeten sich zunächst kleinere Zellverbände in Form von Sphäroiden, die mit fortschreitender Kulturdauer an Größe zunahmen. Die so generierten Sphären sind Mischkulturen, die in der Dissertationsschrift als „Enterosphären“ bezeichnet werden. Sie weisen neben neuronalen Progenitoren auch nicht-neurale Zellen auf.

Grundprotokoll zur Zelldifferenzierung

Zur Einleitung der Zelldifferenzierung nach einer Zellproliferationsphase wurden die Zellen mit dem Differenzierungs-Zellkulturmedium inkubiert und die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF dem Kulturmedium nicht mehr zugesetzt. Innerhalb von 24 Stunden adhärten die Enterosphären auf der Zellkulturplattenoberfläche, flachten sich ab und breiteten sich in der Fläche aus. Mit Beginn der Differenzierung formten die ENS-Progenitoren typische neurale Zellausläufer aus und bildeten innerhalb einer Woche ein komplexes neurales Netzwerk. Das Differenzierungsmedium wurde alle 3 Tage zu zweidrittel erneuert.

Zellkultivierungen für elektrophysiologische Untersuchungen

Abweichend von dem oben beschriebenen Grundprotokoll wurden für diejenigen Zellkulturexperimente, bei denen elektrophysiologische Analysen durchgeführt wurden, die expandierten Enterosphären auf mit Kollagen-Typ1-beschichtete Deckgläschen transferiert und differenziert. Dazu wurden zuvor die mit Aceton gereinigten und autoklavierten kreisrunden Deckgläschen mit einer Kollagen-Typ1-Lösung (5 µg/cm²) für 2 Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgte die Differenzierung der auf den Deckgläschen transferierten Enterosphären bis zu 36 Tage. Aufgrund der ausgedehnten Differenzierungsphase wurde dem Differenzierungs-Zellkulturmedium der neuroprotektive Wachstumsfaktor *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF), (10 ng/ml) zugesetzt.

Kultivierung und pharmakologische Behandlung von einzelnen selektierten Enterosphären

Die Methode der Einzelkultivierung von Enterosphären wurde etabliert, um für spezifische Fragestellungen mögliche Wechselwirkungen und Fusionen, die bei der gemeinsamen Kultivierung mehrerer Sphären auftreten können, auszuschließen.

Für diese Zellkulturexperimente wurden zunächst Enterosphären nach dem Grundprotokoll zur Zellproliferation generiert.

Am 5. Tag in der Expansionsphase wurden Einzelsphären mit einer ähnlichen Größe unter der Stereolupe selektiert und jeweils einzeln mit Hilfe einer Mikropipette in einem Well mit rundem Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte platziert. Pro Einzelsphäre wurde 50 µl Proliferations-Zellkulturmedium in das Well mit den entsprechenden Pharmaka zugegeben, die den Wnt-Signalweg beeinflussen.

Zu diesen Wirkstoffen gehören SB216763, Wnt3a und R-Spondin1, Norrin und *Dickkopf-Related Protein 1* (DKK1). Von SB216763, Wnt3a und R-Spondin1 ist bekannt, dass sie über verschiedene Mechanismen den Wnt-Signalweg stimulieren und/oder verstärken (Guezguez *et al.* 2014). Norrin bindet spezifisch mit hoher Affinität an den Wnt-Rezeptorsubtyp Frizzled-4 (Shen *et al.* 2015) und DKK1 hemmt den Wnt-Signalweg über eine Interaktion mit dem Wnt-Ko-Rezeptor LRP6 (Semënov *et al.* 2001).

Die mikroskopischen Aufnahmen zur Bestimmung des mittleren Sphärendurchmessers und der damit verbundenen Ermittlung des Enterosphärenwachstums wurden am 5. und 9. Tag durchgeführt.

Zur Analyse des Differenzierungspotentials der Einzelsphären wurde nach der 9-tägigen Expansionsphase die Zelldifferenzierung eingeleitet. Dazu wurde jede Enterosphäre aus der 96-Well-Mikrotiterplatte einzeln mit einer Mikropipette unter visueller Kontrolle einer Stereolupe in jeweils einem Well einer mit Kollagen-Typ1-beschichteten 48-Well-Zellkulturplatte (5 µg/cm²) transferiert. Jede einzelne Enterosphäre wurde mit 200 µl Differenzierungs-Zellkulturmedium für weitere 7 Tage kultiviert. Das Differenzierungs-Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage zu zweidritteln erneuert.

2.2.3 Grundprotokoll zur Immunzytochemie

Die Durchführung der nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte erfolgte bis auf die gekennzeichneten Ausnahmen bei Raumtemperatur. Für eine immunzytochemische Detektion wurden die Zellkulturen zunächst mit einer Formaldehyd-fixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) für 20 Minuten fixiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren und um die Antikörperpenetration zu erleichtern, wurden die Zellen zunächst für 30 Minuten mit PBS inkubiert, dem Ziegenserum (Endkonzentration: 4 % (v/v)), Rinderserumalbumin (Endkonzentration: 0,1 % (w/v)) und Triton X-100 (Endkonzentration: 0,1 % (v/v)) zugesetzt wurde.

Die nachfolgende Inkubation der in PBS verdünnten primären Antikörper mit 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin und 0,1 % (v/v) Triton X-100 erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C.

Anschließend wurden 5 Waschschriffe für jeweils 10 Minuten durchgeführt und den Kulturen die in PBS verdünnte sekundäre Antikörperlösung mit 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin und 0,1 % (v/v) Triton X-100 für 30 Minuten zugegeben. Nach 5 weiteren Waschschriffen mit PBS erfolgte zur Darstellung der Zellkerne die Inkubation mit einer DAPI-Lösung (200 ng/ml) oder einer SYTOX Green-Lösung (Endkonzentration: 1 µM) für 15 Minuten. Anschließend wurden die Zellen nochmals dreimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen.

Die unterschiedlichen primären und sekundären Antikörper sind mit den entsprechenden Verdünnungen in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt.

2.2.4 *Whole mount*-Immunhistochemie

Die *Whole mount*-Immunhistochemie von Darmgewebe basiert auf einigen Modifikationen des Grundprotokolls zur Immunzytochemie. Dabei wurden zum einen die Konzentrationen des Triton X-100 erhöht und zum anderen die Inkubationsdauer der verwendeten Lösungen inklusive der Waschschriffe verlängert.

Die Durchführung der nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte erfolgte bis auf die gekennzeichneten Ausnahmen bei Raumtemperatur.

Das Darmgewebe wurde mit einer Formaldehydfixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) für 2 Stunden fixiert und anschließend sechsmal für jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren und um die Antikörperpenetration zu erleichtern, wurde das Gewebe zunächst über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C mit PBS inkubiert, dem Ziegenserum (Endkonzentration: 4 % (v/v)), Rinderserumalbumin (Endkonzentration: 0,1 % (w/v)) und Triton X-100 (Endkonzentration: 0,3 % (v/v)) zugesetzt wurde.

Die nachfolgende Inkubation der in PBS verdünnten primären Antikörper mit 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin und 0,1 % (v/v) Triton X-100 erfolgte ebenfalls über Nacht bei 4 °C.

Anschließend wurden 10 Waschschriffe für jeweils 15 Minuten durchgeführt und dem Gewebe die in PBS verdünnte sekundäre Antikörperlösung mit 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin und 0,1 % (v/v) Triton X-100 für 2 Stunden zugegeben. Nach 10 weiteren Waschschriffen mit PBS für jeweils 15 Minuten erfolgte zur Darstellung der Zellkerne die Inkubation mit einer DAPI-Lösung (200 ng/ml) für 1 Stunde. Abschließend wurde das Gewebe nochmals fünfmal mit PBS und einmal mit Aqua dest. für jeweils 15 Minuten gewaschen und mit Kaisers Glycerin-Gelatine auf einen Objektträger eingebettet.

2.2.5 BrdU-Proliferationsassay

Die Durchführung der nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte erfolgte bis auf die gekennzeichneten Ausnahmen bei Raumtemperatur. In der Regel wurden bei immunzytochemischen Doppelfärbungen, die BrdU-Detektion nach der immunzytochemischen Färbung gegen zellspezifische Marker durchgeführt.

Zur Identifizierung von teilenden Zellen mittels des BrdU-Proliferationsassays wurde den Zellen das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) in einer Endkonzentration von 1 µM oder 10 µM zugegeben. Nach Beendigung der Zellkultur wurden die Zellen mit einer Formaldehydfixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) für 20 Minuten fixiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im Falle, dass keine weitere Kofärbung mit zellspezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, erfolgte im weiteren Schritt die Vorbehandlung

für den BrdU-Nachweis. Dazu wurden die Kulturen für 30 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C mit 2 N Salzsäure inkubiert und anschließend zweimal mit einer Boratpufferlösung (0,1 M) und einmal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren und um die Penetration der Antikörper zu erleichtern, wurden die Zellen nachfolgend für 30 Minuten mit PBS inkubiert, dem Ziegenserum (Endkonzentration: 4 % (v/v)), Rinderserumalbumin (Endkonzentration: 0,1 % (w/v)) und Triton X-100 (Endkonzentration: 0,1 % (v/v)) zugesetzt wurde.

Die Inkubation des primären Anti-BrdU-Antikörpers (1:50 in PBS mit 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin und 0,1 % (v/v) Triton X-100) erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C. Anschließend wurden 5 Waschschrte für jeweils 10 Minuten durchgeführt und den Kulturen die in PBS verdünnten sekundäre Antikörperlösung mit 0,1 % (w/v) Rinderserumalbumin und 0,1 % (v/v) Triton X-100 für 30 Minuten zugegeben. Nach 5 weiteren Waschschrten mit PBS wurden die Kulturen mit einer DAPI-Lösung (200 ng/ml in PBS) zur Darstellung der Zellkerne für 15 Minuten inkubiert und nachfolgend nochmals dreimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen.

2.2.6 Detektion von Biozytin-gelabelten Zellen

In einem Kooperationsprojekt mit dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut in Reutlingen wurden an ENS-Kulturen elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Diese Kulturen stammten von proliferierenden Sphären ab, denen während der Proliferationsphase BrdU im Zellkulturmedium angeboten wurde und die anschließend auf Kollagen-Typ-1-beschichteten Deckgläschen differenziert wurden. Während der Patch-Clamp-Ableitung erfolgte die Markierung der untersuchten Zellen mit Biozytin, welches der Elektrolytlösung in einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) zugegeben wurde. Nach Beendigung der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Zellen fixiert und mittels einer kombinierten BrdU/Biozytin-Fluoreszenzfärbung analysiert. Die Durchführung der nachfolgenden Arbeitsschrte erfolgte bis auf die gekennzeichneten

Ausnahmen bei Raumtemperatur. Dazu wurden die Zellen mit einer Formaldehydfixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) für 20 Minuten fixiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Danach erfolgte ein Blockierungsschritt für 30 Minuten mit PBS, dem Ziegen Serum (Endkonzentration: 4 % (v/v)), Rinderserumalbumin (Endkonzentration: 0,1 % (w/v)) und Triton X-100 (Endkonzentration: 0,1 % (v/v)) zugesetzt wurde. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen für 30 Minuten mit einer Streptavidin-Cy3-Lösung (1:500 in PBS) inkubiert und anschließend 5 weitere Waschschriffe mit jeweils 10 Minuten durchgeführt.

Nachfolgend erfolgte die Vorbehandlung und immunzytochemische Detektion des BrdUs in Analogie zum zuvor beschriebenen Grundprotokoll.

Nach Beendigung der BrdU-Immunzytochemie und DAPI-Färbung wurden die Zellen auf den Deckgläschen dreimal mit PBS und einmal mit Aqua dest. für jeweils 5 Minuten gewaschen und abschließend mit Kaisers-Glycerin-Gelatine auf einen Objektträger eingebettet.

2.2.7 Datenauswertung und Statistik

Zur Quantifizierung der BrdU-positiven, Zellmarker-positiven sowie doppelgefärbten Zellen wurden die fluoreszenzmarkierten Kulturen randomisiert mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Observer Z1, Zeiss, Jena) bei einer Objektivvergrößerung von 10 x aufgenommen und der jeweilige Anteil der unterschiedlich gefärbten Zellpopulationen im jeweiligen Bildabschnitt ausgezählt. Zur weiteren Berechnung wurde der prozentuale Anteil der BrdU-kogefärbten Zellen zur Gesamtzahl des jeweiligen Zelltyps oder zur Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen in Beziehung gesetzt.

Um das Wachstum von Einzelsphären zu ermitteln, wurde der mittlere Sphärendurchmesser an zwei verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung berechnet.

Dazu wurde von jeder Sphäre eine mikroskopische Hellfeldaufnahme erstellt. Mit Hilfe der Axiovision-Software (Zeiss, Jena) ließ sich die entsprechende Fläche

(A) der abgebildeten Sphäre ermitteln und aus diesem Parameter der mittlere Durchmesser (D) mit der Formel: $D = 2 \cdot \sqrt{\frac{A}{\pi}}$ berechnen.

Bei der Auswertung der erhobenen Daten aus den verschiedenen Experimenten wurden bei normalverteilten Werten der Mittelwert mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes (Mittelwert \pm SEM) kalkuliert und in einem Säulendiagramm dargestellt. Bei nicht normalverteilten Werten wurden der Median, das erste und dritte Quartil sowie der zugehörige Maximal- und Minimalwert berechnet und in einem Box-Plot-Diagramm wiedergegeben.

Die Anzahl der ermittelten Werte und die Anzahl der unabhängigen Experimente sind jeweils im Ergebnisteil dargestellt. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, USA). Ein p -Wert kleiner 0,05 ($p < 0,05$) wurde als signifikant beurteilt.

Für den Vergleich von zwei Gruppen, die normalverteilte Werte aufwiesen, wurde der t-Test durchgeführt. Für die statistische Auswertung mehrerer Gruppen mit normalverteilten Werten wurde ein *One-way ANOVA* mit nachfolgendem *Fisher LSD Post Hoc*-Test verwendet und für den Vergleich von mehreren Gruppen mit nicht normalverteilten Werten ein *One-way ANOVA on Ranks* mit nachfolgendem *Dunn's Post-Hoc-Test* angewandt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten die Protokolle zur Isolation und Kultivierung von fötalen und neonatalen ENS-Vorläuferzellen der Maus in Abhängigkeit von den Fragestellungen weiterentwickelt und das Proliferations- und Differenzierungspotential der Progenitoren in Hinblick auf das Entwicklungsstadium der Zellen bestimmt werden. Ein weiteres Ziel der Promotionsarbeit bestand darin, den Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Proliferation und Zelldifferenzierung von neonatalen neuronalen Progenitoren des Gastrointestinaltrakts in der Zellkultur zu untersuchen. Dabei sollten bekannte Faktoren, die den Wnt-Signalweg aktivieren oder inhibieren, in den Zellkultur-Experimenten eingesetzt werden.

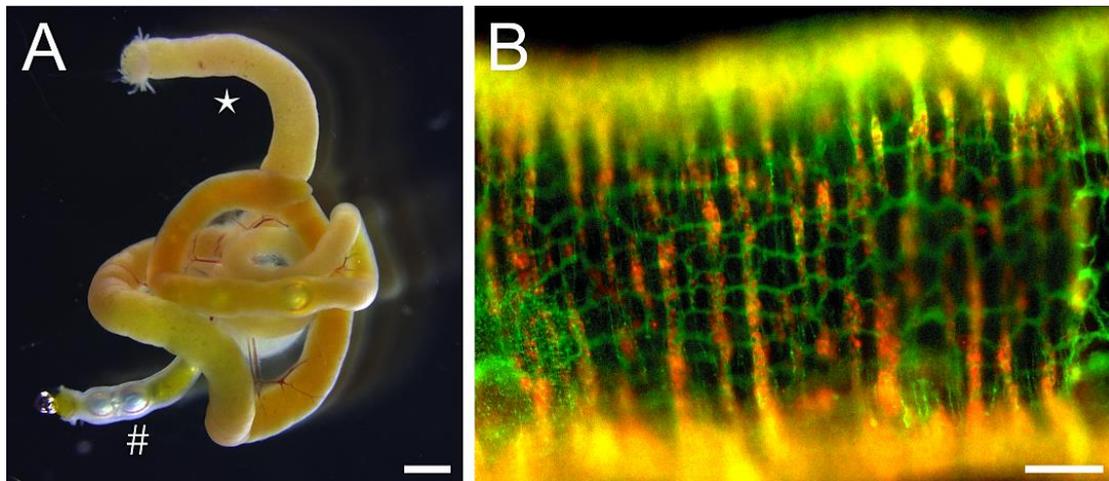


Abb. 4: Isolierter Darm einer neonatalen Maus. A: Übersichtsaufnahme eines präparierten Darms. ★ Jejunum, # Dickdarm. B: *Whole mount*-Färbung der *Tunica muscularis* des Dünndarms. Kombinierte Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung der neuronalen Marker β -Tubulin III (grün) und HuC/D (rot). Größenbalken: 1 mm in (A), 100 μ m in (B).

3.1 Isolation und Expansion von ENS-Zellen in der Zellkultur

Eine akkurate und rasche Präparation der murinen Darmsegmente und die Verwendung von standardisierten Protokollen zur enzymatischen Dissoziation des Gewebes ist unabdingbar, um für die anschließende Kultivierung eine hohe Ausbeute an vitalen ENS-Zellen zu erhalten. Abbildung 4A zeigt in einer Hellfeldaufnahme einen frisch isolierten Darm einer neu geborenen Maus (Abb. 4A).

Nach der Resektion des Darms wurde in den nachfolgenden präparativen Schritten das Dünndarmkonvolut durch Abtrennen der Mesenterien vom Darmrohr aufgelöst und die äußeren Muskelschichten (*Tunica muscularis*) mit dem integrierten *Plexus myentericus* von den übrigen Darmwandschichten des Dünndarms präparativ separiert (siehe Material und Methoden). In der Abbildung 4B ist das komplexe neuronale Netzwerk des ENS einer präparierten *Tunica muscularis* einer neugeborenen Maus mittels einer spezifischen *Whole mount*-Immunhistochemie dargestellt (Abb. 4B). Die Detektion der in der Abbildung 4B visualisierten neuronalen Zellen des *Plexus myentericus* erfolgte über eine kombinierte Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die neuronalen Marker HuC/D und β -Tubulin III.

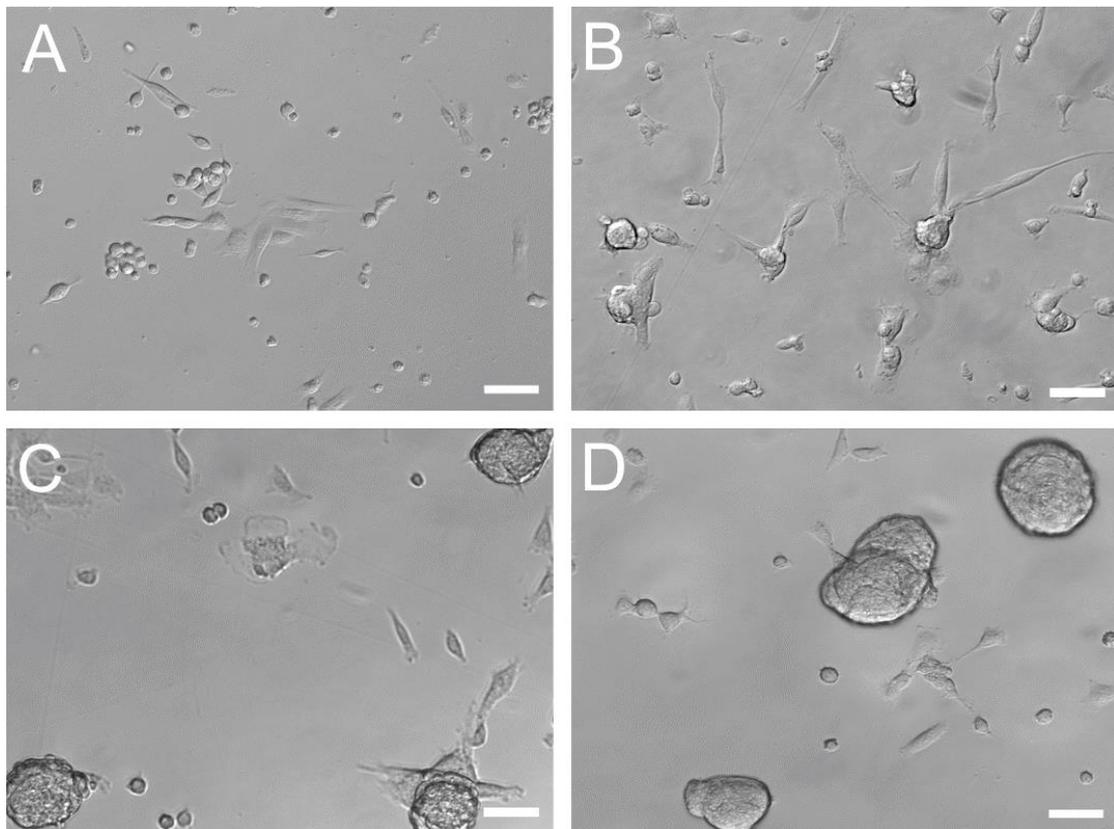


Abb. 5: Kultivierung von ENS-Zellen unter Proliferationsbedingungen. Die Zellen wurden aus Dünndärmen (*Tunica muscularis*) neonataler Mäuse isoliert und anschließend für 10 Tage unter Proliferationszellkulturbedingungen kultiviert. Während der Kultivierung bildeten sich zunächst kleinere Sphäroide, die mit fortschreitender Kulturdauer an Größe zunahmten. A: Hellfeldaufnahme kultivierter Zellen 24 h nach der Zellaussaat. B: Zellkultur nach 4 Tagen *in vitro*. C: Zellkultur nach 7 Tagen *in vitro*. D: Zellkultur nach 10 Tagen *in vitro*. Größenbalken: 50 μm in (A-D).

Für die Zellkulturexperimente wurden die Zellen aus dem Gewebeverband der präparierten *Tunica muscularis* mittels enzymatischen Verdaus unter Verwendung der Enzyme Kollagenase und Dispase herausgelöst. Die so vereinzelt Zellen ließen sich anschließend mit Hilfe eines definierten Proliferations-Zellkulturmediums und unter standardisierten Kulturbedingungen für bis zu vier Wochen in der Zellkultur expandieren.

Innerhalb der ersten 4 Tage bildeten sich während der Kultivierung zunächst kleinere Zellverbände in Form von Sphäroiden, die mit fortschreitender Dauer an Größe zunahmten (Abb. 5).

Die so generierten Sphären sind Mischkulturen und weisen neben neuronalen Progenitoren auch mesenchymale Zellen auf (Abb. 5, 11). Nach der Differenzierung dieser Sphären-Kulturen ließen sich immunzytochemisch neben Neuronen und Gliazellen auch *Smooth Muscle Actin*-positive Zellen detektieren.

Die hier im Rahmen der Promotion generierten Sphären werden deshalb nachfolgend in dieser Dissertationsschrift nicht als „Neurosphären“, sondern als „Enterosphären“ bezeichnet.

Eine zusätzliche methodische Bestätigung des in der Hellfeldmikroskopie beobachteten zeitabhängigen Sphärenwachstums konnte mittels eines BrdU-Proliferationsassays erbracht werden (Abb. 6).

Dazu wurden die aus der *Tunica muscularis* vereinzelt Zellen für 4 Tage unter proliferativen Zellkulturbedingungen unter täglicher Zugabe der Wachstumsfaktoren *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und *Epidermal Growth Factor* (EGF) kultiviert. Während der letzten 24 h der Expansionsphase wurde dem Zellkulturmedium das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) zugegeben. Proliferierende Zellen, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befinden, inkorporieren BrdU in die Zellkern-DNA und können nachfolgend mittels Immunfluoreszenz detektiert werden.

Die zahlreichen visualisierten BrdU-positiven Zellkerne in der Abbildung 6 verdeutlichen die hohe Proliferationsrate der kultivierten enterischen Zellen unter den expansiven Zellkulturbedingungen (Abb. 6).

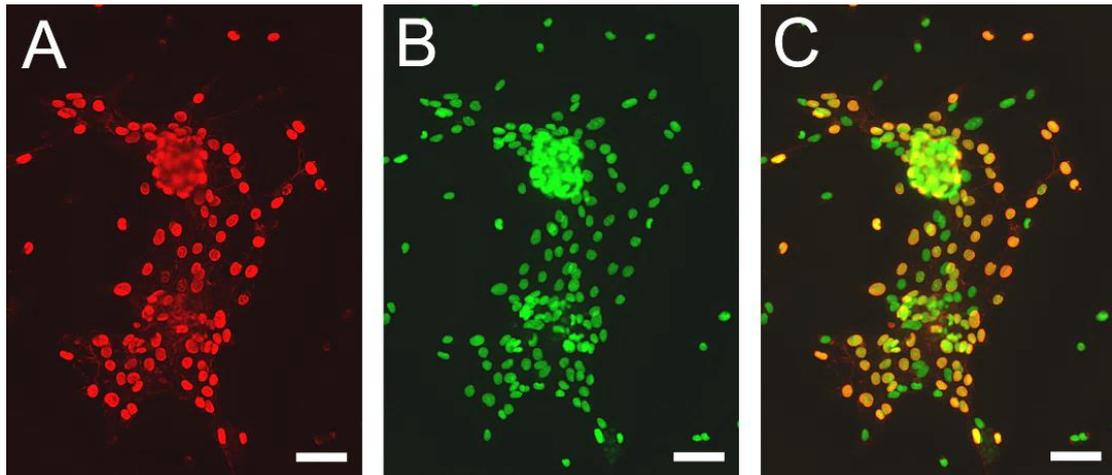


Abb. 6: BrdU-Proliferationsnachweis von sich teilenden ENS-Zellen *in vitro*. Die Zellen wurden aus Dünndärmen neonataler Mäuse isoliert und anschließend für 4 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert. 24 h vor der Fixierung wurde BrdU (10 μ M) dem Zellkulturmedium zugegeben. Der überwiegende Teil der kultivierten Zellen befand sich in der Synthesephase des Zellzyklus. Im oberen Bereich der Abbildung ist deutlich ein neu gebildeter BrdU-positiver Sphäroid zu erkennen. A, B und C stellen jeweils den gleichen Ausschnitt dar. A: Immunzytochemische Färbung BrdU-positiver Zellkerne (rot). B: Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Sytox Green (grün). C: Kombinierte Darstellung von (A) und (B). Größenbalken: 50 μ m in (A-C).

3.2 *In vitro*-Differenzierung von zuvor proliferierten ENS-Progenitoren

Um das Differenzierungspotential der expandierten ENS-Progenitoren näher zu untersuchen, wurden die Enterosphären für bis zu vier Wochen unter Differenzierungskulturbedingungen kultiviert.

Die Initialisierung der Zelldifferenzierung erfolgte durch den Austausch des Proliferations-Zellkulturmediums gegen ein Differenzierungs-Zellkulturmedium. Darüber hinaus wurden die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF dem Kulturmedium nicht mehr zugesetzt. Innerhalb von 24 Stunden adhärten die Sphären auf der Zellkulturplattenoberfläche, flachten sich ab und breiteten sich mit fortschreitender Kulturdauer in der Fläche aus. Mit Beginn der Differenzierung formten die ENS-Progenitoren typische neurale Zellausläufer aus und bildeten ein komplexes neurales Netzwerk (Abb. 7).

Immunzytochemische Untersuchungen belegten, dass die entwickelten neuronalen Progenitoren während ihrer Differenzierung typische neuronale ENS-Marker wie Stickstoffmonoxidsynthase 1 (NOS1), β -Tubulin III (TuJ1) und HuC/D oder die

glialen Marker *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) und S100 β exprimierten (Abb. 7, 11).

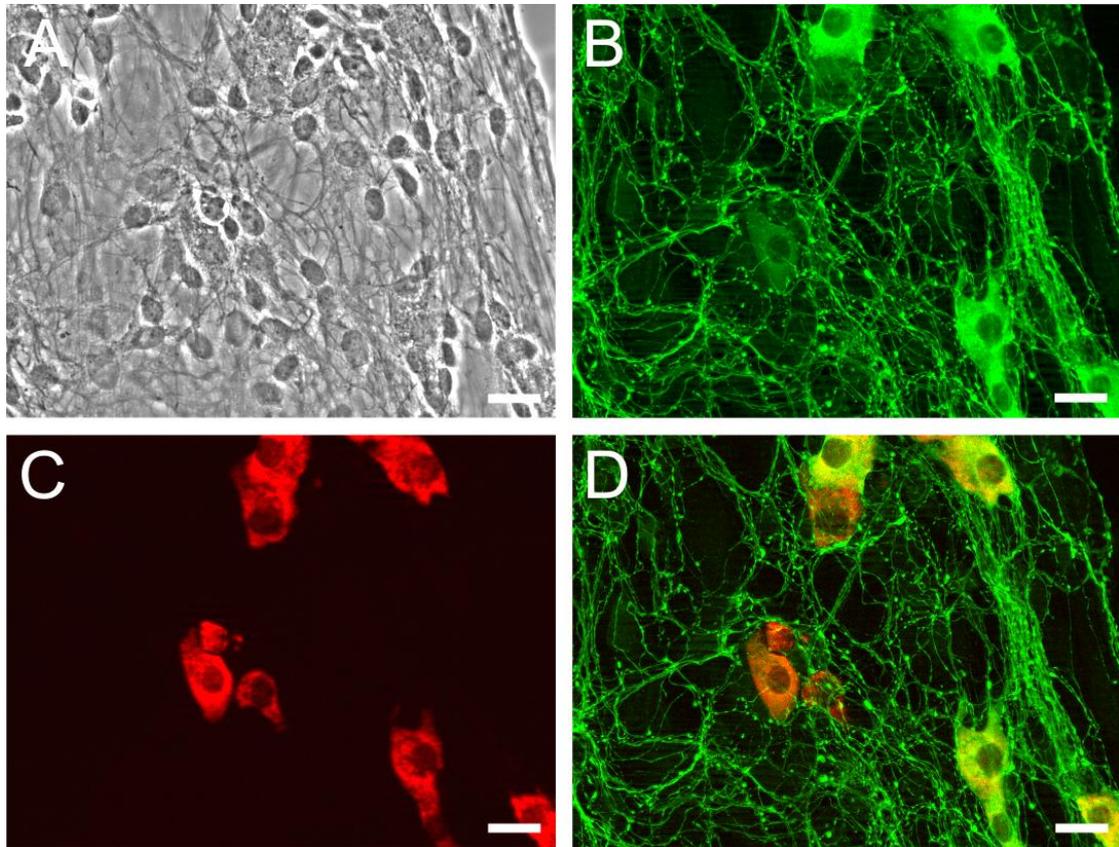


Abb. 7: Immunzytochemische Darstellung von differenzierten enterischen Neuronen aus der neonatalen Maus. Die Zellen wurden zunächst für eine Woche proliferiert und anschließend für 20 Tage in der Zellkultur differenziert. A, B, C und D stellen jeweils den gleichen Ausschnitt der Zellkultur dar. A: Phasenkontrastaufnahme. B: Immunfluoreszenzdarstellung von NOS1-positive Zellen (grün). C: Immunfluoreszenz gegen HuC/D (rot). D: Kombinierte Darstellung von (B) und (C). Größenbalken: 20 μm in (A-D).

In einer weiteren Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kraushaar vom Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut in Reutlingen mittels elektrophysiologischer Ableitungen ein funktionaler Nachweis der differenzierten Neurone erbracht.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Reutlingen ergaben, dass die in der Promotionsarbeit kultivierten Neurone funktionale, neuronenspezifische spannungsabhängige Natriumkanäle exprimierten (Dettmann *et al.* 2014).

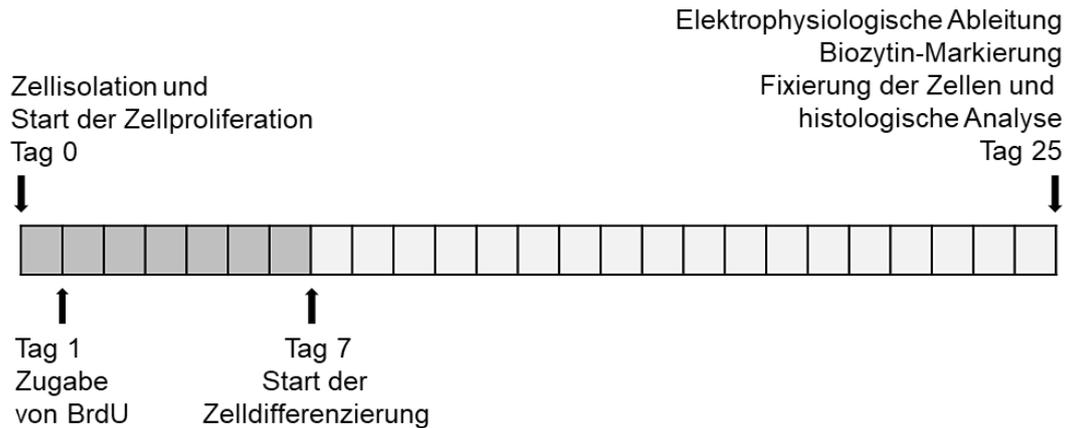


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsplans zum elektrophysiologischen Nachweis von Neuronen, die sich aus proliferierenden neuralen Vorläuferzellen differenzierten. Die aus der *Tunica muscularis* von neonatalen Mäusen isolierten neuronalen Zellen wurden für 7 Tage in der Zellkultur expandiert und anschließend für weitere 18 Tage differenziert. Zwischen dem 1. Tag und 7. Tag der Zellexpansionsphase wurde die Zellkultur mit BrdU inkubiert, um nachfolgend die sich teilenden Progenitoren nachweisen zu können. Nach Beendigung der Zelldifferenzierungsphase wurden die elektrophysiologisch abgeleiteten und mit Biozytin markierten Zellen fixiert und anschließend immunzytochemisch charakterisiert.

Darüber hinaus konnte in dem Kooperationsprojekt erstmals belegt werden, dass die elektrophysiologisch abgeleiteten postnatalen Nervenzellen sich aus proliferierenden Progenitoren entwickelt hatten (Abb. 8, 9). Für diese Experimente wurden die analysierten Neurone während der Patch-Clamp-Ableitung mit Biozytin markiert. Diese Kulturen stammten von proliferierenden Sphären ab, denen während der Proliferationsphase BrdU im Zellkulturmedium angeboten wurde. Nach Beendigung der elektrophysiologischen Untersuchungen und Biozytinmarkierung wurde die Zellkultur fixiert und in Tübingen im Rahmen der Promotionsarbeit mittels BrdU- und Biozytin-Fluoreszenzfärbungen analysiert (Abb. 8, 9). Das in Abbildung 9 dargestellte elektrophysiologisch analysierte Neuron zeigt eine BrdU/Biozytin-Kofärbung (Abb. 9). Die Doppelmarkierung beweist, dass die in der mikroskopischen Aufnahme dargestellte Zelle sich definitiv aus einem zuvor in der Zellkultur teilenden ENS-Progenitor differenziert hatte.

Hinweis: Die elektrophysiologischen Daten sind hier nicht dargestellt. Sie wurden zusammen mit den hier gezeigten Ergebnissen zur Zellkultur und immunzytochemischen Charakterisierung in einer Originalpublikation in der Zeitschrift PLoS One publiziert (Dettmann et al. 2014).

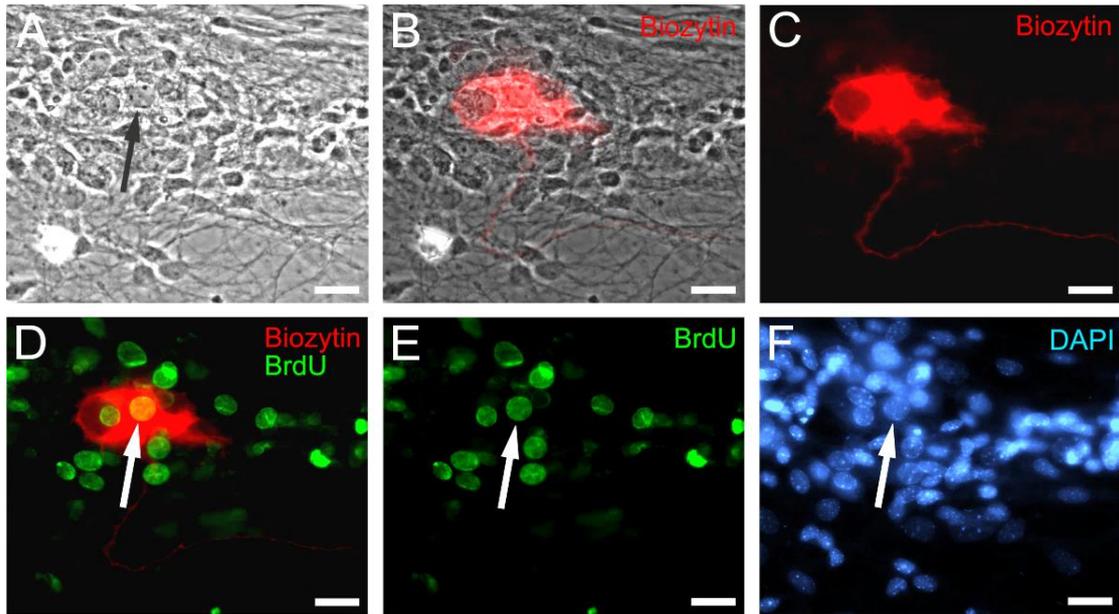


Abb. 9: Kombierter immunzytologischer und elektrophysiologischer Nachweis von aus ENS-Progenitoren differenzierten Neuronen. Biozitin/BrdU-Fluoreszenzdetektion eines differenzierten ENS-Neurons in der Zellkultur. Die Zellen wurden zunächst für 7 Tage proliferiert und anschließend für 18 Tage differenziert. Zwischen dem 1. Tag und 7. Tag der Proliferationsphase erfolgte die Inkubation mit BrdU (1 μ M). Nach der Differenzierungsphase wurden in einem Kooperationsprojekt Patch-Clamp-Analysen durchgeführt und dabei den untersuchten Neuronen Biozitin injiziert, das anschließend nach einer histologischen Aufarbeitung mittels Fluoreszenzmikroskopie (rot) detektiert werden konnte. Der Nachweis von funktionalen spannungsabhängigen Natriumkanälen ließ sich von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kraushaar am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut in Reutlingen zeigen. Die hier nicht dargestellten Patch-Clamp-Analysen wurden zusammen mit der hier gezeigten Zellkultur und histologischen Charakterisierung in der Zeitschrift PLoS One publiziert (Dettmann *et al.* 2014). Die BrdU/Biozitin-Kofärbung belegt, dass das elektrophysiologisch analysierte Neuron sich aus einer zuvor proliferierten Vorläuferzelle differenziert hatte. A-F stellen den gleichen mikroskopischen Ausschnitt der Zellkultur dar. A: Phasenkontrastaufnahme. B: Kombinierte Phasenkontrast-/Biozitin-Fluoreszenzaufnahme. C: Biozitin-Fluoreszenzaufnahme (rot). D: Kombinierte Fluoreszenzdarstellung von Biozitin (rot) und BrdU (grün). E: BrdU-Immunfluoreszenzaufnahme (grün). F: DAPI-Kernfärbung (blau). Die Pfeile in (A), (D), (E) und (F) zeigen auf denselben Zellkern des biozitinmarkierten und elektrophysiologisch untersuchten Neurons. Größenbalken: 20 μ m in (A-F).

3.3 Entwicklungsabhängige Unterschiede zum Proliferations- und Differenzierungspotential von ENS-Progenitoren *in vitro*

Um zu klären, inwieweit das Wachstumsverhalten von neuronalen Vorläuferzellen des murinen Darms vom Entwicklungsstadium abhängt, wurden das Stadium zum Embryonaltag 18 (E18) mit dem Stadium zur Geburt (P0) verglichen. Für die

Untersuchungen wurde unter Berücksichtigung der bisherigen Literatur bewusst ein enges Zeitfenster gewählt: Zwischen dem spätfötalen Stadium (E18) und dem Stadium der Geburt (P0) liegen bei der Maus zwei Entwicklungstage.

Zur Durchführung der Zellkulturexperimente wurden die Zellen aus dem Darm jeweils zum Zeitpunkt E18 und P0 isoliert und die sich bildenden Enterosphären unter den gleichen Zellkulturbedingungen für 5 Tage in der Zellkultur expandiert. Anschließend erfolgte durch Umstellung des Zellkulturmediums die Differenzierung der Kulturen für 7 weitere Tage. Zwischen dem 1. Tag und 5. Tag der Zellexpansionsphase wurde die Zellkultur mit BrdU inkubiert, um nach der Differenzierung die sich teilenden Progenitoren nachweisen zu können. Nach Beendigung der Zellkultivierung erfolgte die immunzytochemische Charakterisierung der Zellen in Bezug auf in den Zellkern inkorporiertes BrdU sowie auf neuronale, gliale und glattmuskuläre Marker (Abb. 10).

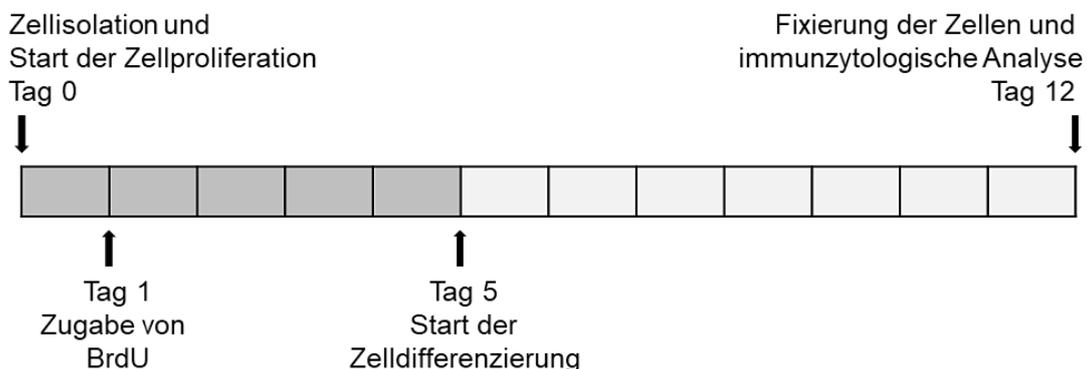


Abb. 10: Schematische Darstellung des Versuchsplans zur Analyse der entwicklungsabhängigen Neurogenese von neuronalen Progenitoren. Die aus der *Tunica muscularis* von fötalen (E18) und neonatalen Mäusen isolierten neuronalen Zellen wurden für 5 Tage in der Zellkultur expandiert und anschließend durch Wechsel des Kulturmediums für weitere 7 Tage differenziert. Die Inkubation mit BrdU erfolgte zwischen dem 1. Tag und 5. Tag der Zellkultivierung, um nachfolgend die sich teilenden Progenitoren nachweisen zu können. Nach Beendigung der Zelldifferenzierungsphase wurden die Zellen fixiert und anschließend immunzytochemisch charakterisiert.

Am Beispiel des Stadiums P0 sind in der Abbildung 11 die jeweiligen immunzytochemischen BrdU-Kofärbungen von differenzierten Zellen dargestellt, die in der ersten Phase des Zellkultivierungsverfahrens proliferiert und anschließend durch Austausch des Zellkulturmediums differenziert wurden (Abb. 11).

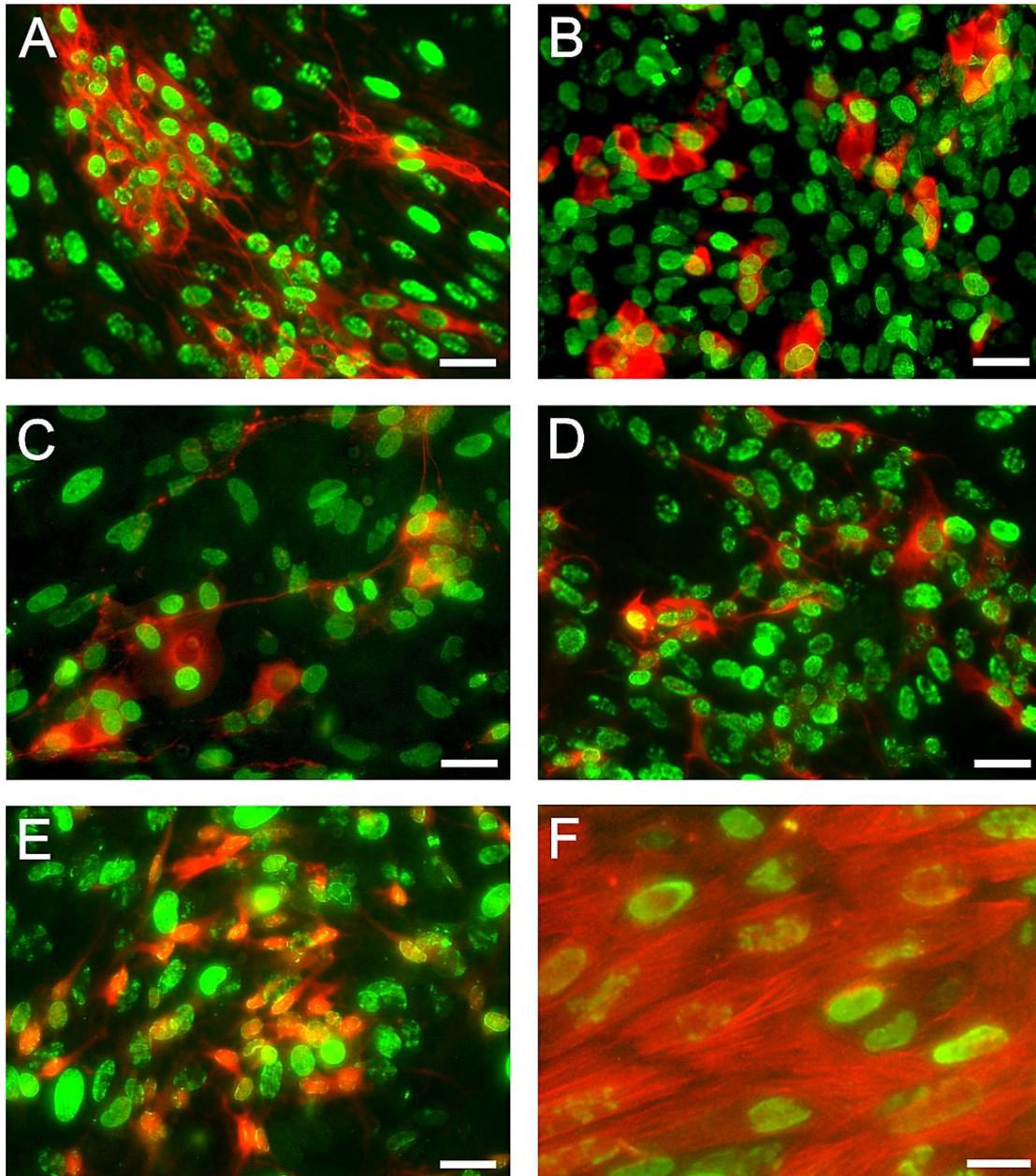


Abb. 11: Proliferation und Differenzierung von glatten Muskelzellen und neuronalen intestinalen Zellen der Maus *in vitro*. Die Zellen wurden zunächst aus den Dünndärmen neonataler Mäuse isoliert und anschließend für 5 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Die Inkubation mit BrdU (1 μ M) erfolgte zwischen dem 1. Tag und 5. Tag der Zellkultivierung. Nach der Proliferationsphase wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel unter Differenzierungsbedingungen für weitere 7 Tage kultiviert und anschließend immunzytochemisch analysiert. A: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU (grün) und β -Tubulin III (rot). B: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU (grün) mit HuC/D (rot). C: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU (grün) mit NOS1 (rot). D: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU (grün) mit GFAP (rot). E: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU (grün) mit S100 β (rot). F: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU (grün) mit *Smooth Muscle Actin* (rot). Größenbalken: 20 μ m in (A-F).

Zur Detektion der Neurone wurden Antikörper gegen β -Tubulin III (TuJ1), HuC/D und NOS1, zur Detektion der intestinalen Gliazellen Antikörper gegen GFAP und S100 β und zur Detektion glatter Muskelzellen Antikörper gegen *Smooth Muscle Actin* verwendet.

Die BrdU-kogefärbten Zellen zeigen an, dass der jeweilige differenzierte Zelltyp sich während der Expansionsphase der Zellkultivierung geteilt hat. Sowohl bei den glatten Muskelzellen als auch bei den Gliazellen und Neuronen ließen sich in der Fluoreszenzmikroskopie BrdU-positive Zellkerne nachweisen (Abb. 11).

In der Abbildung 12 sind in einem Säulendiagramm die quantifizierte Daten BrdU-komarkierter Zellen in Bezug auf die Entwicklungsstadien P0 und E18 zusammengefasst (Abb. 12).

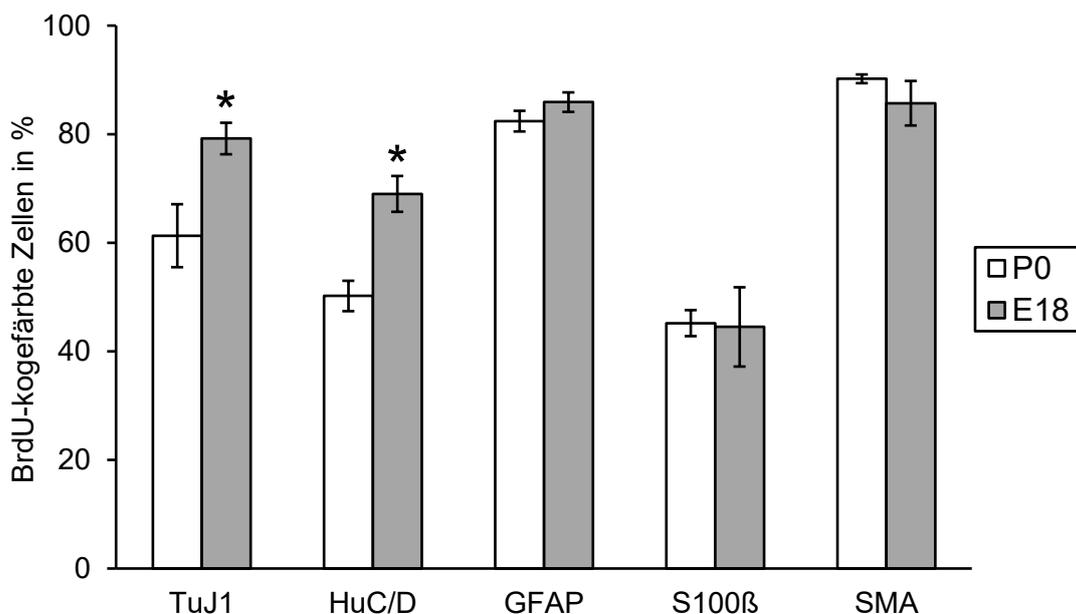


Abb. 12: Entwicklungsabhängige Unterschiede des Proliferationspotentials von neuronalen Progenitoren und glatten Muskelzellen. Für die Experimente wurden die Zellen zunächst aus den Därmen neonataler (P0) und fötaler (E18) Mäuse isoliert und anschließend für 5 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Die Inkubation mit BrdU (1 μ M) erfolgte zwischen dem 1. Tag und 5. Tag der Zellkultivierung. Nach der Proliferation wurden die Zellen nach dem Mediumwechsel unter Differenzierungsbedingungen für weitere 7 Tage kultiviert und anschließend immunzytochemisch gegen β -Tubulin III (TuJ1), HuC/D, GFAP, S100 β und *Smooth Muscle Actin* (SMA) analysiert. Für die Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil der BrdU-doppelgefärbten Zellen zur Gesamtzahl des jeweiligen Zelltyps gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen E18- und der P0-Gruppe sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$; t-Test).

Dazu wurde für jeden Marker der prozentuale Anteil der BrdU-komarkierten Zellen zur Gesamtzahl des jeweiligen Zelltyps bestimmt. Insgesamt wurden in der E18-Gruppe 31 und in der P0-Gruppe 39 Zellkulturen aus 3 unabhängigen Experimenten ausgewertet. Für die nachfolgenden Ergebnisse sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM angegeben:

Zum Zeitpunkt der Geburt beträgt der prozentuale Anteil der β -Tubulin III/BrdU-kogefärbten Zellen zur Gesamtzahl der β -Tubulin III-positiven Zellen $61,3 \pm 5,8$ %, für den neuronalen Marker HuC/D: $50,2 \pm 2,8$ %, für den glialen Marker GFAP: $82,4 \pm 1,9$ %, für den glialen Marker S100 β : $45,2 \pm 2,4$ % und für den glatten Muskelzellmarker *Smooth Muscle Actin*: $90,2 \pm 0,8$ %.

Für das fötale Entwicklungsstadium E18 wurden folgende Mittelwerte mit den entsprechenden SEM ermittelt: β -Tubulin III: $79,2 \pm 2,9$ %, HuC/D: $69,0 \pm 3,3$ %, GFAP: $85,9 \pm 1,8$ %, S100 β : $44,5 \pm 7,3$ %, *Smooth Muscle Actin*: $85,7 \pm 4,1$ %.

Zusammenfassend verdeutlichen die Daten, dass im Vergleich zu neonatalen ENS-Zellen das Proliferationspotential der neuronalen Vorläuferzellen bei E18-Mäusen um 29 % (β -Tubulin III-positiv Neurone) bzw. 37 % (HuC/D-positiv Neurone) deutlich erhöht ist ($p < 0,05$, t-Test).

Bei den untersuchten GFAP-positiven und S100 β -positiven glialen Zellen sowie bei den glatten Muskelzellen ließen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Entwicklungsstadien feststellen.

3.4 Einfluss des Wnt-Signalwegs auf das Wachstum von Enterosphären

Ziel der folgenden Experimente war es zu untersuchen, inwieweit Faktoren bzw. Pharmaka, die einen Effekt auf den Wnt-Signalweg ausüben, die Proliferation von ENS-Vorläuferzellen in der Zellkultur beeinflussen. Dazu wurden die Kulturen mit den Substanzen SB216763, Wnt3a, R-Spondin1, Norrin und *Dickkopf-Related Protein 1* (DKK1) inkubiert und anschließend das Sphärenwachstum anhand von mikroskopischen Aufnahmen analysiert. SB216763, Wnt3a und R-Spondin1 stimulieren und/oder verstärken über verschiedene Mechanismen den Wnt-Signalweg. Norrin bindet spezifisch mit hoher Affinität an den Wnt-

Rezeptorsubtyp Frizzled-4 und DKK1 hemmt den Wnt-Signalweg über eine Interaktion mit dem Wnt-Ko-Rezeptor LRP6 (siehe: Material und Methoden).

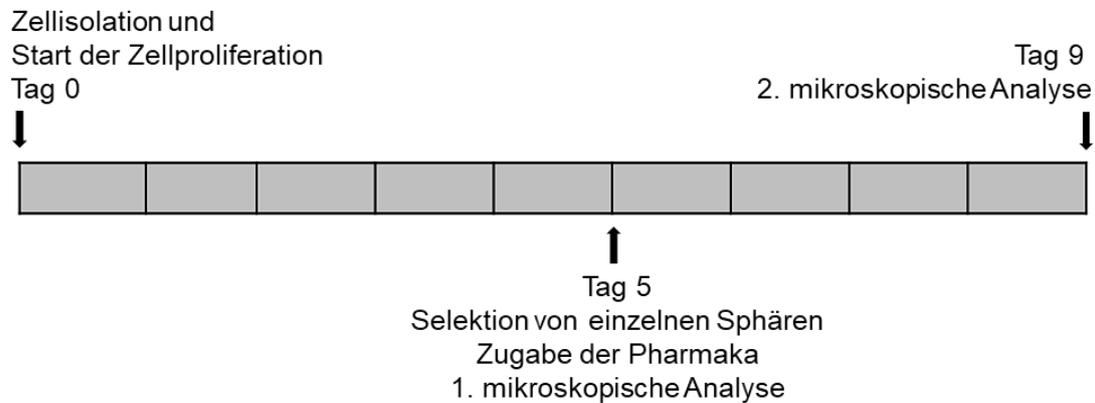


Abb. 13: Schematische Darstellung des Versuchsplans zur Analyse des Wnt-abhängigen Wachstumspotentials von Enterosphären. Die aus der *Tunica muscularis* von neonatalen Mäusen isolierten Zellen wurden für 9 Tage in der Zellkultur expandiert und als Sphären kultiviert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden Einzelsphären selektiert und die entsprechenden Pharmaka zugegeben. Die mikroskopischen Aufnahmen und die Auswertung der jeweiligen Einzelsphäre erfolgten am 5. und 9. Tag des Kultivierungszeitraums.

Die oben genannten Substanzen wurden jeweils an einzeln kultivierten Sphären während der Proliferationsphase untersucht. Die Zugabe der Pharmaka erfolgte ab dem 5. Tag der Zellkultivierung für 4 weitere Tage (Abb. 13). Durch die Methode der Einzelkultivierung wurden mögliche Wechselwirkungen und Fusionen, die bei der gemeinsamen Kultivierung mehrerer Sphären auftreten können, ausgeschlossen. Das Verfahren zur Einzelsphären-Generierung und Kultivierung wurde im Rahmen der Promotionsarbeit im Vorfeld der Kultivierungsexperimente etabliert.

Hinweis: Das Verfahren zur Einzelsphären-Generierung und Kultivierung wurde am Kongress „4th Congress on Regenerative Biology and Medicine“ 2010 in Stuttgart präsentiert und das Abstract in der Zeitschrift „Tissue Engineering Part A“ veröffentlicht (Zhang et al. 2011). Darüber hinaus wurde diese Technik in einer Originalpublikation in der Zeitschrift „Gastroenterology“ publiziert (Zhang et al. 2017).

In Abbildung 14 sind exemplarisch mikroskopische Hellfeldaufnahmen einzeln kultivierter Sphären nach einer 5- und 9-tägigen Kultivierungsperiode dargestellt, die mit Wnt3a (20 ng/ml) und SB216763 (2,5 μ M in 0,1 % (v/v) DMSO) behandelt wurden; als Kontrollen dienten unbehandelte Sphären und Sphären, die mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 % (v/v)) inkubiert wurden (Abb. 14).

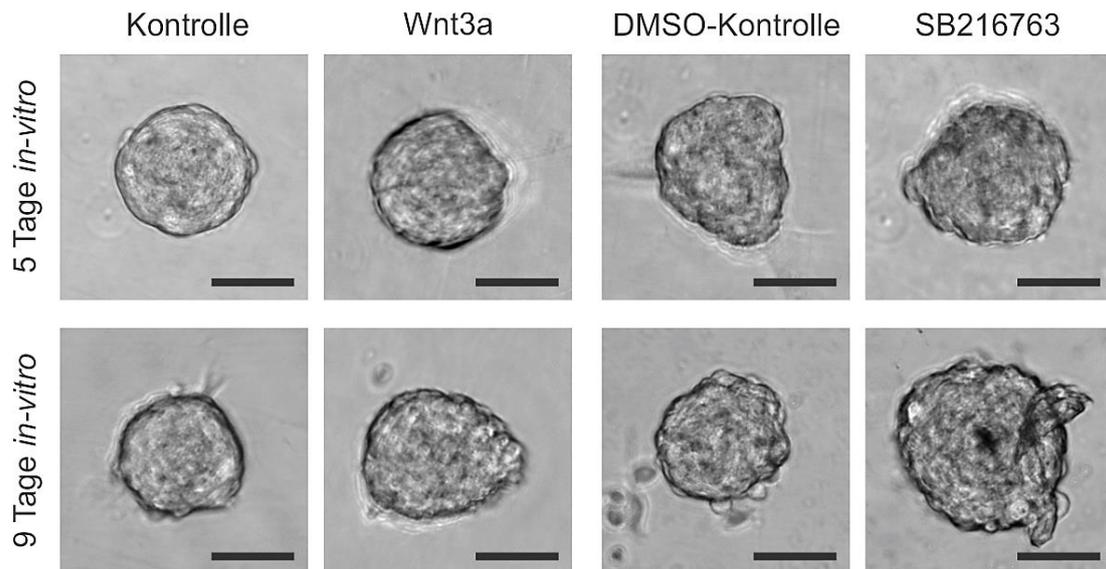


Abb. 14: Einfluss des Wnt-Signalwegs auf das Wachstumsverhalten von Enterosphären. Die enterischen Zellen wurden zunächst aus den Därmen neonataler Mäuse isoliert und anschließend für 9 Tage unter Proliferationsbedingungen als Sphären kultiviert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden aus den Kulturen einzelne Enterosphären selektiert und die Einzelsphären für 4 weitere Tage entweder unbehandelt oder mit den folgenden Substanzen kultiviert: DMSO (0,1 % (v/v)), SB216763 (2,5 μ M in 0,1 % (v/v) DMSO), Wnt3a (20 ng/ml). Die mikroskopischen Hellfeldaufnahmen der jeweiligen Einzelsphären erfolgten nach 5 Tagen in Kultur (obere Reihe) und nach 9 Tagen *in vitro* (untere Reihe). Größenbalken: 50 μ m in allen Aufnahmen.

Zur Quantifizierung des Sphärenwachstums wurde die prozentuale Änderung des mittleren Sphärendurchmessers zwischen dem Kulturtag 5 und Tag 9 berechnet. Bei diesen Experimenten wurden die Einzelsphären entweder unbehandelt kultiviert oder mit den folgenden Substanzen inkubiert: DMSO (0,1 % (v/v)), SB216763 (2,5 μ M in 0,1 % (v/v) DMSO), Wnt3a (20 ng/ml), R-Spondin1 (500 ng/ml), Norrin (25 ng/ml), DKK1 (0,1 μ g/ml).

In der Abbildung 15 sind die entsprechenden Mittelwerte \pm SEM von jeweils 26 bis 30 Sphären aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

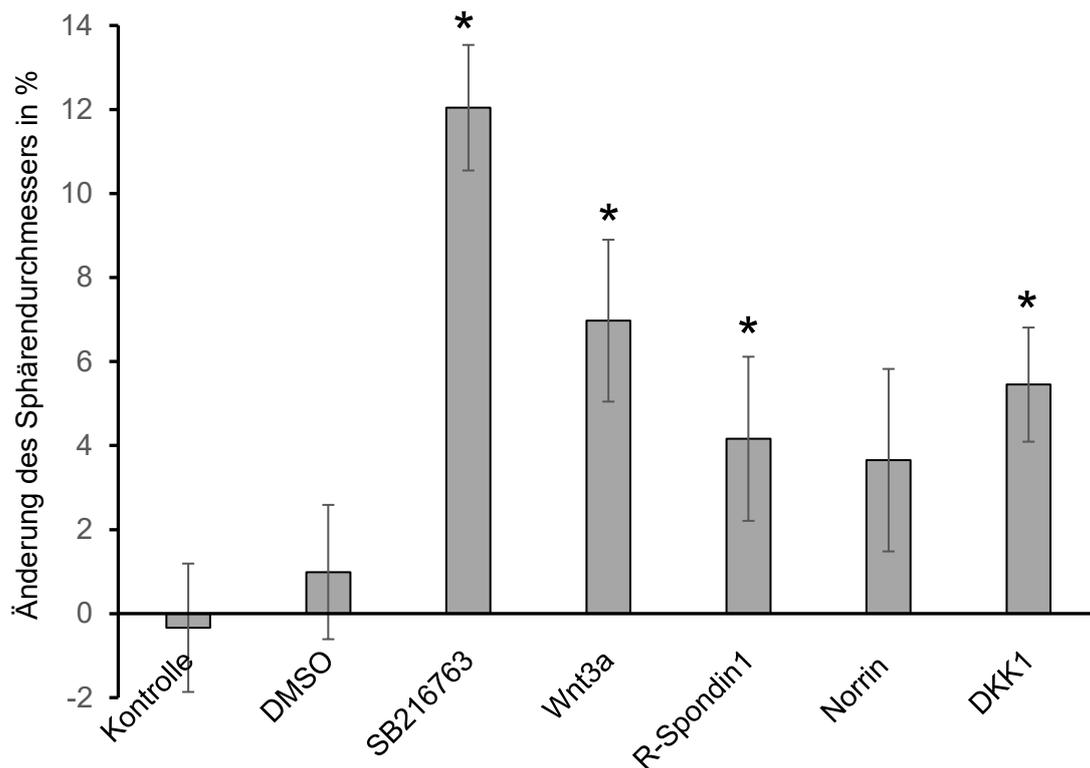


Abb. 15: Änderung des Durchmessers von Enterosphären durch Wnt-Signalweg-beeinflussende Faktoren in der Proliferationsphase. Analyse der Änderung des mittleren Sphärendurchmessers während einer 4-tägigen Kultivierung unter Proliferationsbedingungen. Die Zellen wurden zunächst aus den Därmen neonataler Mäuse isoliert und anschließend für 9 Tage unter Proliferationsbedingungen als Sphären kultiviert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden Einzelsphären selektiert und die Einzelsphären für 4 weitere Tage entweder unbehandelt kultiviert oder mit den folgenden Substanzen inkubiert: DMSO (0,1 % (v/v)), SB216763 (2,5 μ M in 0,1 % (v/v) DMSO), Wnt3a (20 ng/ml), R-Spondin1 (500 ng/ml), Norrin (25 ng/ml), DKK1 (0,1 μ g/ml). Für die Quantifizierung wurde die jeweilige prozentuale Änderung des mittleren Sphärendurchmessers zwischen dem Kulturtag 5 und Tag 9 bei den verschiedenen Behandlungen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 26 bis 30 ausgewerteten Einzelsphären aus 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der jeweiligen Behandlung mit Wnt3a, R-Spondin1, Norrin, DKK1 bzw. zwischen der DMSO-Kontrollgruppe und SB216763 sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$; *One-way ANOVA* mit nachfolgendem *Fisher LSD Post Hoc-Test*).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die jeweilige Behandlung mit Wnt3a, SB216763 oder DKK1 in den eingesetzten Konzentrationen signifikant das Sphärenwachstum gegenüber den entsprechenden Kontrollen stimulierte ($p < 0,05$; *One-way ANOVA* mit nachfolgendem *Fisher LSD Post Hoc-Test*), (Abb. 15).

Die ermittelten Mittelwerte \pm SEM zur jeweiligen Gruppe sind: Kontrolle: $-0,3 \pm 1,5$ %; DMSO-Kontrolle: $1,0 \pm 1,6$ %; SB216763: $12,0 \pm 1,5$ %; Wnt3a: $7,0 \pm 1,9$ %; R-Spondin1: $4,2 \pm 2,0$ %; Norrin: $3,7 \pm 2,2$ %. DKK1: $5,5 \pm 1,4$ % (Abb. 15). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sowohl SB216763 und Wnt3a, die den Wnt-Signalweg stimulieren, als auch der Wnt-Antagonist DKK1 zu einem erhöhten Sphärendurchmesser in der Expansionsphase führten. Der Frizzled-4-Agonist Norrin zeigte keinen Effekt in der verwendeten Konzentration. Darüber hinaus ist auffällig, dass bei den Kontrollen die einzeln kultivierten Enterosphären, im Gegensatz zu den in Abbildung 5 dargestellten Sphärenmassenkulturen, trotz der Zugabe von bFGF und EGF nicht an Größe zunahmten.

Hinweis: Experimentelle Daten zum Einfluss des Wnt-Signalwegs auf das Wachstum von Enterosphären wurden am Kongress „4th Congress on Regenerative Biology and Medicine“ 2010 in Stuttgart präsentiert und das Abstract in der Zeitschrift „Tissue Engineering Part A“ veröffentlicht (Zhang et al. 2011). Darüber hinaus wurden Teilergebnisse in einer Originalpublikation in der Zeitschrift „Gastroenterology“ publiziert (Zhang et al. 2017).

3.5 Einfluss des Wnt-Signalwegs in der Proliferationsphase auf die Differenzierung von ENS-Vorläuferzellen

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit der Wnt-Signalweg in der Proliferationsphase einen Einfluss auf die anschließende Differenzierung der neuronalen ENS-Vorläuferzellen ausübt. Dazu wurden die ENS-Zellen zunächst aus den Därmen neonataler Mäuse isoliert und anschließend für 9 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden Einzelsphären selektiert und in Analogie zu den Experimenten in Abschnitt 3.4 mit den Pharmaka SB216763, Wnt3a, R-Spondin1, Norrin und DKK1 behandelt. Am 8. Tag erfolgte die Zugabe von BrdU für 24 h. Nach der Proliferationsphase wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel unter Differenzierungsbedingungen für weitere 7 Tage kultiviert und anschließend immunzytochemisch gegen BrdU und β -Tubulin III gefärbt und analysiert (Abb. 16).

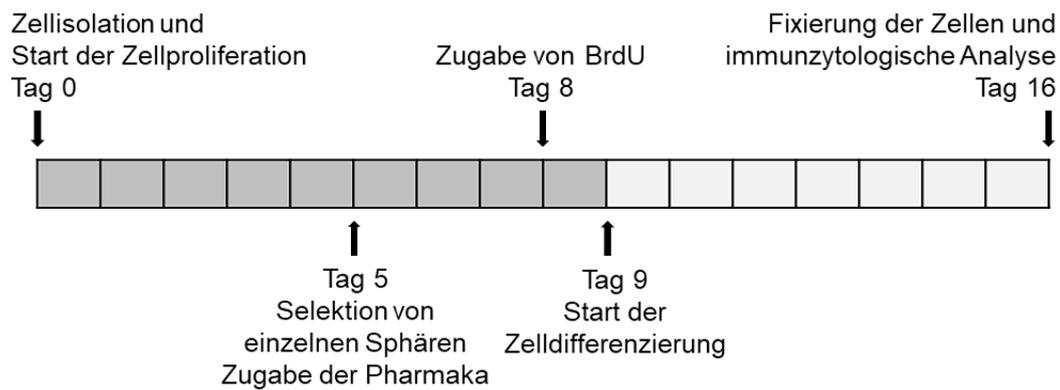


Abb. 16: Schematische Darstellung des Versuchsplans zur Analyse der Wnt-abhängigen Neurogenese *in vitro*. Die aus der *Tunica muscularis* von neonatalen Mäusen isolierten Zellen wurden zunächst für 9 Tage expandiert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden Einzelsphären selektiert und die entsprechenden Pharmaka für 4 Tage während der Proliferationsphase zugegeben. Am 8. Tag erfolgte die Zugabe von BrdU für 24 h. Nach dem 9. Tag wurden die Kulturen nach einem Mediumwechsel für 7 Tage differenziert und anschließend immunzytochemisch analysiert.

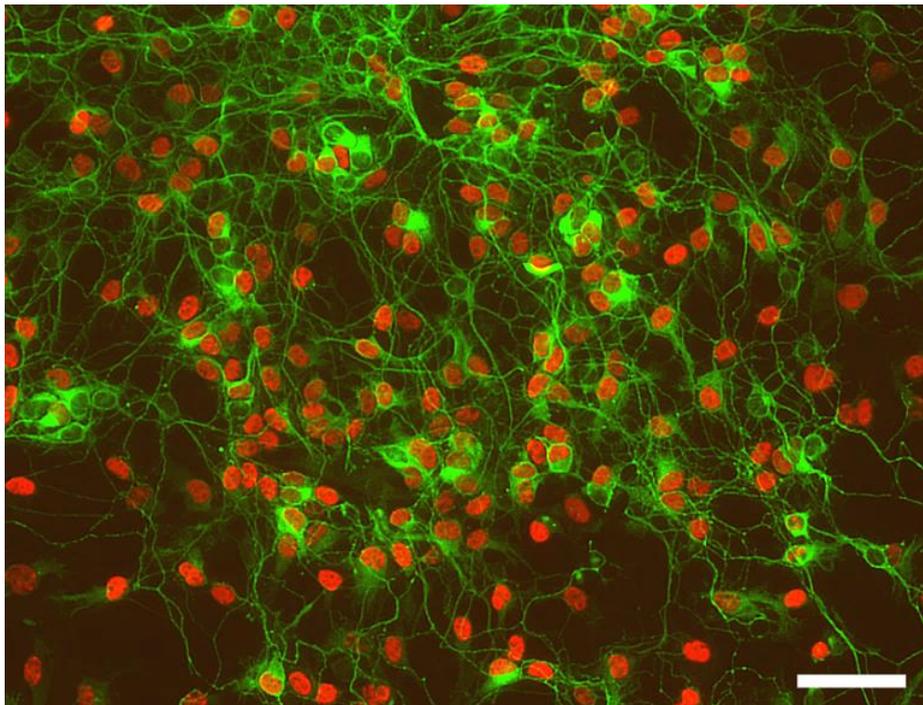


Abb. 17: Immunzytochemische β -Tubulin III/BrdU-Doppelfärbung nach Ausdifferenzierung einer einzelnen Enterosphäre, die während der Proliferation mit Wnt3a stimuliert wurde. Die aus der *Tunica muscularis* von neonatalen Mäusen isolierten Zellen wurden zunächst für 9 Tage expandiert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden Einzelsphären selektiert und die entsprechenden Pharmaka für 4 Tage zugegeben. Am 8. Tag erfolgte die Zugabe von BrdU ($1 \mu\text{M}$) für 24 h. Nach der Proliferation wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel unter Differenzierungsbedingungen für weitere 7 Tage kultiviert und anschließend immunzytochemisch analysiert. Die Abbildung hier zeigt eine mit Wnt3a (20 ng/ml) behandelte Kultur, die gegen BrdU (rot) und β -Tubulin III (grün) gefärbt wurde. Größenbalken: $100 \mu\text{m}$.

In Abbildung 17 ist exemplarisch eine mit Wnt3a behandelte Einzelsphärenkultur von einer neonatalen Maus dargestellt, welche nach der Proliferationsphase differenziert und abschließend immunzytochemisch gefärbt wurde (Abb. 17).

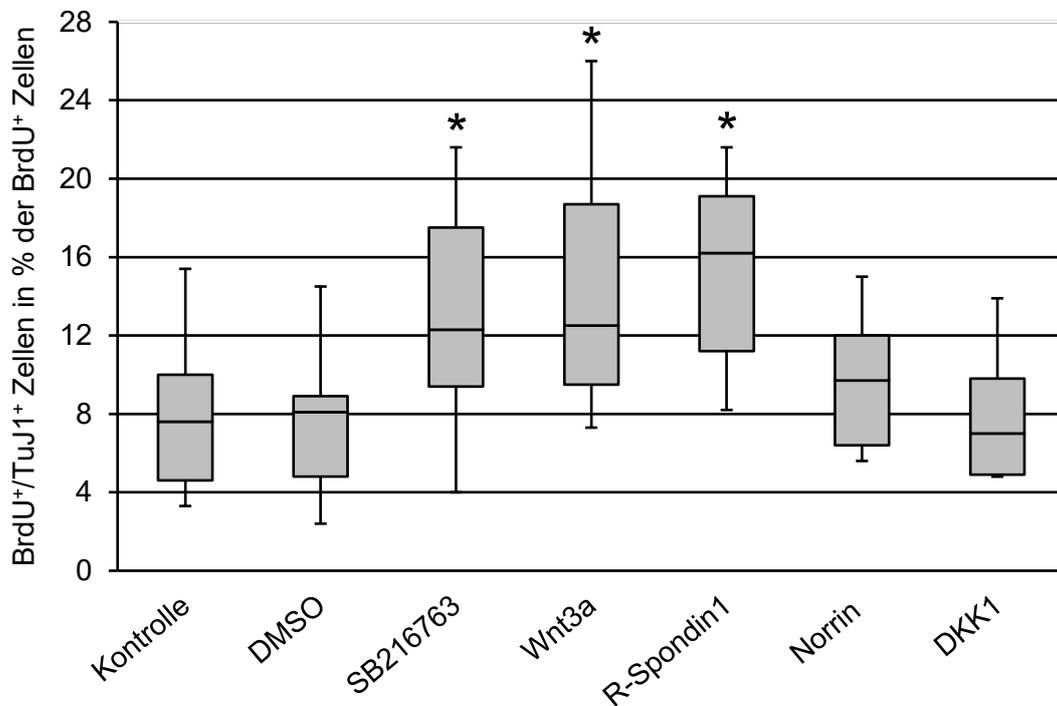


Abb. 18: Quantifizierung von β -Tubulin III/BrdU-positiven Zellen nach Ausdifferenzierung einzelner Enterosphären, die in der Proliferationsphase mit Wnt-Signalweg-beeinflussenden Faktoren behandelt wurden. Die aus der *Tunica muscularis* von neonatalen Mäusen isolierten Zellen wurden zunächst für 9 Tage unter Proliferationsbedingungen expandiert. Ab dem 5. Tag der Zellkultivierung wurden Einzelsphären selektiert und die Einzelsphären für 4 weitere Tage entweder unbehandelt kultiviert oder mit den folgenden Substanzen inkubiert: DMSO (0,1 % (v/v)), SB216763 (2,5 μ M in 0,1 % (v/v) DMSO), Wnt3a (20 ng/ml), R-Spondin1 (500 ng/ml), Norrin (25 ng/ml) und DKK1, (0,1 μ g/ml). Am 8. Tag erfolgte die Zugabe von BrdU (1 μ M) für 24 h und die weitere Kultivierung der Einzelsphären nach einem Mediumwechsel für 7 Tage unter Differenzierungsbedingungen. Danach wurden die Kulturen fixiert, immunzytochemisch gegen BrdU (rot) und β -Tubulin III (grün) gefärbt und anschließend ausgewertet. Quantifiziert wurde der jeweilige prozentuale Anteil der BrdU/ β -Tubulin III-doppelgefärbten Zellen zur Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. Im Boxplot dargestellt sind jeweils der Median, das erste und dritte Quartil sowie der zugehörige Maximal- und Minimalwert. Signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Behandlung und der Kontrollgruppe bzw. zwischen SB216763 und der DMSO-Gruppe sind mit einem Stern gekennzeichnet. ($p < 0,05$; One-way ANOVA on Ranks mit nachfolgendem *Dunn's Post-Hoc-Test*).

Zur Quantifizierung der ermittelten Werte wurde der prozentuale Anteil der BrdU/ β -Tubulin III-doppelmarkierten Zellen zur Gesamtzahl der BrdU-positiven

Zellen in den jeweiligen Pharmaka-behandelten Gruppen ausgewertet (Abb. 18).
Nachfolgend sind die entsprechenden Mediane von jeweils 11 bis 19 Sphären aus drei unabhängigen Experimenten aufgelistet: Kontrolle 7,6 %; DMSO-Kontrolle: 8,1 %; SB216763: 12,3 %; Wnt3a: 12,5 %; R-Spondin1: 16,2 %; Norrin: 9,7 %; DKK1: 7 % (Abb. 18).

In der Zusammenfassung zeigen die Ergebnisse, dass die jeweilige Behandlung mit SB216763, Wnt3a oder R-Spondin1 in der Proliferationsphase signifikant den Anteil der BrdU/ β -Tubulin III-doppelmarkierten neuralen Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen nach der Differenzierung erhöhte (SB216763 + 52 %, Wnt3a + 64 %, R-Spondin1 + 113 % ($p < 0,05$; *One-way ANOVA on Ranks* mit nachfolgendem *Dunn's Post-Hoc-Test*), (Abb. 18).

Die Experimente belegen, dass eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in der Proliferationsphase die intestinale Neurogenese nach der Differenzierung *in vitro* stimuliert.

Der Frizzled-4-Agonist Norrin hatte keine signifikante Wirkung in der verwendeten Konzentration.

Interessanterweise zeigte der Wnt-Antagonist DKK1, der in den zuvor durchgeführten Untersuchungen das Sphärenwachstum förderte, keinen Effekt auf die Neurogenese der ENS-Progenitoren.

Hinweis: Die experimentellen Daten zum Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Neurogenese von ENS-Progenitoren wurden am Kongress „4th Congress on Regenerative Biology and Medicine“ 2010 in Stuttgart präsentiert und das Abstract in der Zeitschrift „Tissue Engineering Part A“ publiziert (Zhang et al. 2011).

4. Diskussion

4.1 Expansion, Differenzierung und Charakterisierung von neo- und postnatalen ENS-Vorläuferzellen des Darms

Zwei Hauptziele wurden im Rahmen der Promotionsarbeit verfolgt: Zum einen sollte in der Zellkultur das Proliferations- und Differenzierungspotential von ENS-Progenitoren vergleichend bei zwei Entwicklungsstadien der Maus bestimmt werden. Zum anderen wurde der Einfluss des kanonischen Wnt-Signalwegs auf die Proliferation von neonatalen murinen ENS-Vorläuferzellen *in vitro* untersucht.

Zellkultivierung von neo- und postnatalen ENS-Progenitoren der Maus und der Ratte

Für die Bearbeitung der beiden Hauptarbeitsziele wurden ausgehend von den vorhandenen Protokollen zunächst die notwendigen präparativen Techniken und Zellkulturverfahren für die jeweiligen Fragestellungen weiterentwickelt.

Unter Verwendung eines definierten serumfreien Basalmediums und durch den Zusatz von spezifischen Wachstumsfaktoren wie *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und *Epidermal Growth Factor* (EGF) bildeten die aus der *Tunica muscularis* enzymatisch vereinzelt Zellen in der Zellkultur zunächst kleinere Zellverbände in Form von Sphäroiden, die mit fortschreitender Kulturdauer an Anzahl und Größe zunahmten. Der in der Promotionsarbeit verwendete BrdU-Proliferationsassay belegte dabei die Zellproliferation in den enterischen Sphäroiden während der Expansionsphase. Um bei den pharmakologischen Untersuchungen mögliche Wechselwirkungen und Fusionen mehrerer zusammen kultivierter Sphären auszuschließen, wurde im Zusammenhang mit der Promotionsarbeit ein Verfahren zur Einzelsphären-Generierung und Kultivierung etabliert (Zhang *et al.* 2017).

Die Expansion von Sphäroiden bzw. neuralen ENS-Progenitoren aus Darmgewebe postnataler Mäuse und Ratten wurde bereits in der ersten Dekade des 21. Jahrhunderts von mehreren Arbeitsgruppen unter Einsatz unterschiedlicher Verfahren und Zellkulturmedien beschrieben (Kruger *et al.* 2002, Bondurand *et al.* 2003, Suarez-Rodriguez und Belkind-Gerson 2004). Das in der Promotionsarbeit

verwendete Grundprotokoll der Arbeitsgruppe am Anatomischen Institut in Tübingen zur Isolation und Kultivierung von murinen enterischen Progenitoren wurde erstmals 2007 publiziert und abhängig von den Zellsystemen in einem stetigen Prozess weiterentwickelt (Metzger *et al.* 2007a, Metzger *et al.* 2007b, Mohr *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2017).

Die in der Promotionsarbeit genutzte Methode zur Generierung der Sphären aus der *Tunica muscularis* bedingt, dass diese Kulturform eine „Mischkultur“ mit unterschiedlichen Zellpopulationen darstellt. Diese Sphären, die sich überwiegend aus Nestin- und/oder p75^{NTR}-positiven ENS-Zellen zusammensetzen, beinhalten ebenfalls mesenchymale Zellen, die nach einer Differenzierung unter anderem den glattmuskulären Marker *Smooth Muscle Actin* exprimieren (Kruger *et al.* 2002, Suarez-Rodriguez und Belkind-Gerson 2004, Dettmann *et al.* 2014). Die „Mischsphären“ wurden in der Dissertationsschrift daher als „Enterosphären“ und nicht als „Neurosphären“ bezeichnet.

Transgene Reporter-Maus-Systeme bieten eine Option, mittels *FACS-Sorting* neurale Zellen über spezifische Neuralleisten-Marker wie *Ednr β* , *Wnt1* oder *RET* aus dem Darmgewebe aufzureinigen (Hotta *et al.* 2013, Binder *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2017). Mit dieser Technik können mit den so selektierten Zellen enterische Neurosphären mit einem hohen Gehalt an neuronalen Progenitoren in der Zellkultur generiert werden.

Es ist jedoch zu betonen, dass je nach Fragestellung beide *In vitro*-Modelle sowohl Vorteile als auch Nachteile aufweisen:

Enterosphären sind in Bezug auf die *In vivo*-Situation organotypischer und bieten die Option, Wechselwirkungen innerhalb der Sphäre zwischen neuronalen und mesenchymalen Zellen mit zu erfassen. Gerade in Hinblick auf neurale Entwicklungsprozesse spielen Interaktionen von Zellen aus der neuroektodermalen Linie mit mesenchymalen Zellabkömmlingen eine wichtige Rolle (Hao *et al.* 2016, York und McCauley 2020).

Andererseits kann es je nach der Fragestellung beim Gewebemodell der Enterosphären von Nachteil sein, dass die gewonnenen Erkenntnisse aufgrund des komplexeren Modells im direkten Vergleich zu aufgereinigten ENS-Neurosphären eine höhere Varianz aufweisen. Eine weitere Limitation der Enterosphären-

Kulturen liegt naturgemäß darin, dass die beobachteten Effekte nicht ausschließlich neuronalen Zellen zugeordnet werden können.

Idealerweise ist es daher sinnvoll, beide *In vitro*-Modelle für grundlegende Aspekte der ENS-Stammzellforschung zu nutzen.

Im Allgemeinen besitzen die *in vitro* expandierten ENS-Progenitoren sowohl in Enterosphären als auch in ENS-Neurosphären die multipotente Fähigkeit, sich in gliale und neuronale Zellsubtypen zu differenzieren (Burns *et al.* 2016). Die Zelldifferenzierung der ENS-Progenitoren zu enterischen Neuronen und Gliazellen kann dabei durch Austausch des Expansions-Zellkulturmediums mit einem Differenzierungs-Zellkulturmedium, welches eine unterschiedliche Komponentenzusammensetzung aufweist, zielgerichtet induziert werden (Kruger *et al.* 2002, Metzger *et al.* 2007b, Mohr *et al.* 2013).

Charakterisierung kultivierter ENS-Progenitoren der Maus und Ratte

Durch Modifikation der Zellkulturbedingungen lassen sich verschiedene neuronale Subtypen aus den expandierten enterischen Sphären differenzieren. Von mehreren Arbeitsgruppen konnten dabei folgende neuronale Marker bei Nagern mittels Immunzytochemie identifiziert werden: PGP9.5, HuC/D, β -Tubulin III, Peripherin, vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Acetylcholinesterase, neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS1), Serotonin, Tyrosinhydroxylase, *Calcitonin Gene-Related Peptide*, Substanz P sowie Peptid YY (Kruger *et al.* 2002, Bondurand *et al.* 2003, Suarez-Rodriguez und Belkind-Gerson 2004, Hegewald *et al.* 2011, Hotta *et al.* 2013, Dettmann *et al.* 2014, Binder *et al.* 2015).

In der Promotionsarbeit wurden zur Identifizierung der Neurone Antikörper gegen die NOS1, HuC/D sowie β -Tubulin III und für die Detektion der Gliazellen Antikörper gegen GFAP und S100 β verwendet.

Neben den immunzytochemischen Untersuchungen tragen mRNA-Genexpressionsstudien unter Verwendung von quantitativer RT-PCR- und DNA-Microarrayanalysen dazu bei, postnatale ENS-Progenitoren weitergehend zu charakterisieren (Hegewald *et al.* 2011, Mohr *et al.* 2013, Di Liddo *et al.* 2015, Neckel *et al.*

2016). Ausgehend von dem von der Tübinger Arbeitsgruppe erarbeiteten Protokoll zur Zellisolierung und Kultivierung der Enterosphären wurde beispielsweise der Einfluss des Schilddrüsenhormons Triiodthyronin auf die frühe Differenzierung von murinen Enterosphären mit einem Affymetrix-Gene-Chip-System untersucht (Mohr *et al.* 2013). Dabei konnten 338 durch Triiodthyronin regulierte Gene erfasst werden, von denen 67 Gene bekannt sind, die direkt an der Entwicklung und Funktion des Nervensystems beteiligt sind (Mohr *et al.* 2013).

In einer zweiten nachfolgenden Arbeit unter Verwendung von Microarraychips wurden proliferierende Enterosphären im Vergleich zu differenzierenden Zellkulturen auf Genexpressionsebene analysiert. In dieser Studie ließen sich insgesamt 1333 regulierte Gene detektieren, die mit dem Zellzyklus, der Apoptose, der neuronalen Proliferation und neuronalen Differenzierung in Verbindung stehen. Wie zu erwarten, waren viele aus der Literatur bekannte Proliferationsmarker in der Expansionsphase der Enterosphären hochreguliert, während neuronale und gliale Differenzierungsmarker nur gering exprimiert wurden (Neckel *et al.* 2016).

Elektrophysiologische Analysen bieten die Möglichkeit, funktional die in der Zellkultur zu Neuronen differenzierten ENS-Progenitoren zu charakterisieren. In Zusammenarbeit mit dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut in Reutlingen wurde mittels elektrophysiologischer Ableitungen der Nachweis erbracht, dass die in Tübingen kultivierten murinen Neurone funktionale neuronenspezifische spannungsabhängige Natriumkanäle exprimierten (Dettmann *et al.* 2014). Darüber hinaus konnte im Rahmen der Promotionsarbeit mittels BrdU-Komarkierungstechniken erstmals belegt werden, dass die elektrophysiologisch abgeleiteten Nervenzellen sich definitiv aus proliferierenden ENS-Progenitoren differenziert hatten.

Untersuchungen zum Integrationspotential von kultivierten ENS-Progenitoren in ein Empfängergewebe stellen eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung dieses Zellpools dar. Dazu wurden unterschiedliche Transplantationsstudien in Gewebekultur- und Tiermodellen durchgeführt (Burns *et al.* 2016). In diesen Studien ließ sich zeigen, dass postnatale ENS-Progenitoren *per se* das Potential

aufweisen, sich im Empfängergewebe zu differenzieren und sogar neuronale Netzwerke im Tiermodell ausbilden können (Pan *et al.* 2011, Hotta *et al.* 2013, Dettmann *et al.* 2014). Hotta und Mitarbeiter konnten durch aufwendige elektrophysiologische Ableitungen von implantierten ENS-Progenitoren belegen, dass sich die embryonalen und postnatalen Vorläuferzellen im Empfängergewebe in elektrophysiologisch aktive Neurone differenzierten (Hotta *et al.* 2013). In dieser Arbeit wurden nach einem *FACS-Sorting* von Ednr^b^{Kik}- oder Ret^{TGM}-positiven neuronalen Progenitoren fötale und postnatale Neurosphären der Maus in der Zellkultur generiert und nachfolgend in den Dickdarm von postnatalen Mäusen transplantiert. Die aus den transplantierten Zellen differenzierten Neurone wiesen dabei neurochemische und elektrophysiologische Merkmale auf, die denen der enterischen Neurone *in vivo* ähneln (Hotta *et al.* 2013).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus den Implantationsexperimenten bedarf es noch umfangreiche tierexperimentelle Studien, um zu evaluieren, inwieweit diese Transplantate zuverlässig einen funktionalen Anschluss an das ENS in allen Darmwandschichten des Empfängergewebes eingehen und somit in der Lage sind, intestinale Drüsen, Blutgefäße sowie die Muskulatur adäquat zu regulieren.

Humane ENS-Vorläuferzellen

Nicht nur bei Mäusen und Ratten, sondern auch im humanen System ließen sich von mehreren Arbeitsgruppen postnatale neurale Progenitoren in der Zellkultur nachweisen (Burns *et al.* 2016). Neben immunzytochemischen Charakterisierungen wurden in Analogie zu den Experimenten bei den Nagern ebenfalls Genexpressionsanalysen sowie Transplantationsstudien in Gewebe- und Tiermodellen durchgeführt (Almond *et al.* 2007, Lindley *et al.* 2009, Hetz *et al.* 2014, Binder *et al.* 2015, Schmitteckert *et al.* 2019). In den ersten publizierten Arbeiten wurden zunächst Zellkulturen von früh postnatalen humanen Geweben angelegt (Rauch *et al.* 2006, Almond *et al.* 2007).

In einer im Jahr 2009 später erschienenen Publikation wurde experimentell belegt, dass auch aus einer Biopsieprobe der Darmschleimhaut eines 17-jährigen Patienten neurale Progenitoren isoliert werden konnten, die sich nachfolgend in

der Zellkultur proliferieren und sich zu unterschiedlichen neuronalen Subtypen differenzieren ließen (Metzger *et al.* 2009b). Darüber hinaus konnten die Autoren exemplarisch zeigen, dass die in der Zellkultur expandierten humanen Progenitoren in aganglionären Explantatdarmgewebekulturen, welche von Resektaten von Hirschsprungpatienten präpariert wurden, einwanderten und sich im Empfängergewebe differenzierten. Die Ergebnisse aus dieser Publikation sind in Bezug auf zwei Aspekte bedeutsam: Erstens ließ sich beweisen, dass sich aus der kindlichen menschlichen Darmschleimhaut (*Tunica mucosa*) ENS-Progenitoren isolieren lassen; bei den meisten Arbeiten werden die ENS-Progenitoren aus der *Tunica muscularis* gewonnen. Zweitens eröffnen diese Erkenntnisse eine weitergehende Option für vereinfachte autologe Zelltherapien am menschlichen Darm. Mittels endoskopischer Verfahren wäre es damit möglich, zellschonend und weniger aufwendig Gewebeproben der Darmschleimhaut für zelltherapeutische Verfahren zu gewinnen. Somit könnte dem Problem einer limitierten Verfügbarkeit von geeignetem Gewebematerial für propagierte autologe Zelltransplantationen bei ENS-abhängigen Erkrankungen wie beispielsweise bei der Hirschsprungerkrankung begegnet werden.

Für eine erfolgreiche Etablierung einer Zelltherapie unter Verwendung von ENS-Progenitoren müssen jedoch noch weitere wichtige Aspekte betrachtet werden: 1. Die Standardisierung der Zellkulturprotokolle, die eine Generierung von ausreichendem Zellmaterial implementieren, 2. Die zellbiologische Sicherheit der expandierten Vorläuferzellen, 3. Das Differenzierungspotential der Progenitorzellen in unterschiedliche neuronale und gliale Zellsubtypen, 4. Die ortsspezifische funktionale Integrationsleistung in das Empfängerdarmgewebe sowie 5. Die zellschonende und zielgerichtete Applikation der Zellen in das Empfängergewebe.

Eine weitere Zellkulturstudie unter Verwendung von humanen Gewebeproben von 37 adulten Patienten wurde ebenfalls 2009 publiziert (Metzger *et al.* 2009a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich ENS-Progenitoren auch aus Darmgewebe von Patienten mit einem Alter von über 50 Jahren isolieren lassen. Neben der Detektion der neurospezifischen Marker auf Protein- und mRNA-Ebene ließen sich mittels elektrophysiologischer Ableitungen neuronenspezifische spannungsabhängige Natriumkanäle auf den differenzierten Nervenzellen

nachweisen (Metzger *et al.* 2009a).

Interessanterweise gelang die Proliferation der ENS-Progenitoren aus adultem Material nur, wenn dem Proliferationsmedium konditioniertes Medium von fötalen ENS-Zellkulturen zugesetzt wurde. Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass im Zellkulturmedium fötaler ENS-Zellen sekretierte Wachstumsfaktoren vorliegen, die für die Proliferation von adulten ENS-Progenitoren vorteilhaft sind. In diesem Zusammenhang wurde in einer Genexpressionsstudie an ZNS-Stammzellen von Deleyrolle und Mitarbeitern gezeigt, dass kultivierte neurale Stammzellen aus dem Rückenmark etwa 50 verschiedene Zytokine und weitere sezernierte Faktoren exprimieren (Deleyrolle *et al.* 2006).

4.2 Entwicklungsabhängige Unterschiede zum Proliferations- und Differenzierungspotential von ENS-Progenitoren *in vitro*

Eine Fragestellung der Promotionsarbeit lag darin zu klären, in welchem Ausmaß das Wachstumsverhalten von neuronalen Vorläuferzellen des Darms in der Zellkultur vom Entwicklungsstadium des Organismus abhängt. ENS-Progenitoren können als zelluläre Abkömmlinge von Neuralleisten-Zellen sowohl von embryonalem als auch von postnatalem Gewebe *in vitro* expandiert und zu glialen und neuronalen Zellen differenziert werden (Burns *et al.* 2016).

In verschiedenen Studien wurde in der Zellkultur das Entwicklungspotential von ENS-Progenitoren aus embryonalen und postnatalen Geweben von Nagern mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen untereinander verglichen (Kruger *et al.* 2002, Bondurand *et al.* 2003, Hotta *et al.* 2013, Tian *et al.* 2021).

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten wurde bei der Konzeption der Promotionsarbeit bewusst ein enges Entwicklungszeitfenster um den Zeitpunkt der Geburt für die vergleichenden Untersuchungen gewählt. Dazu wurden die Zellkulturen aus murinen Darmgeweben des spätfötalen Entwicklungsstadiums (E18) und neugeborener Mäuse (P0) angelegt. Zwischen beiden Entwicklungsstadien liegen bei der Maus lediglich zwei Entwicklungstage.

Zur Durchführung der Zellkulturexperimente wurden die sich bildenden Entero­sphären expandiert und mit dem Proliferationsmarker BrdU inkubiert. Nach einer

anschließenden Differenzierungsphase erfolgte die immunzytochemische Analyse der BrdU-positiven Neurone, Gliazellen und glatten Muskelzellen.

Die quantifizierten Daten der Promotionsarbeit ergaben, dass die neuronalen Vorläuferzellen aus den fötalen E18-Mäusen gegenüber neonatalen ENS-Zellen ein deutlich höheres proliferatives Potential in der Zellkultur aufwiesen. Der prozentuale Anteil der BrdU/ β -Tubulin III-doppelmarkierten Neurone zur Gesamtanzahl der β -Tubulin III-positiven Neurone lag bei der E18-Gruppe um 29 % höher im Vergleich zur P0-Gruppe. Bei den Analysen der HuC/D-positiven Neurone betrug der Unterschied zwischen den Entwicklungsstadien E18 und P0 37 %.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *in vivo* zum Zeitpunkt der Geburt (P0) im Gegensatz zum spätfötalen Stadium (E18) der Anteil an neuronalen Progenitoren im Darmgewebe signifikant vermindert ist.

Bei den nicht-neuronalen Zellen konnte der oben beschriebene Zusammenhang mit den verwendeten Methoden in der Promotionsarbeit nicht nachgewiesen werden. Sowohl bei den untersuchten GFAP- und S100 β -positiven glialen Zellen als auch bei den *Smooth Muscle Actin*-positiven glatten Muskelzellen ließen sich bei beiden untersuchten Entwicklungsstadien keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der BrdU-positiven Zellen zur jeweiligen Gesamtzellzahl feststellen.

Diesbezüglich muss hier auch auf die Limitation der verwendeten BrdU-Markierungsmethode hingewiesen werden. Im Gegensatz zu den Neuronen zeigen differenzierte Gliazellen und glatte Muskelzellen eine mitotische Aktivität. Deshalb können sich bei diesen Zelltypen BrdU-positiv Zellen auch in der Differenzierungsphase weiter teilen und das in der Expansionsphase inkorporierte BrdU an die Tochterzellen weitergeben. Dies führt zu Verschiebungen bei der BrdU-positiven Zellpopulation in der Differenzierungsphase. Es kann somit nicht unterschieden werden, ob die detektierten BrdU-positiven Gliazellen oder glatten Muskelzellen sich ausschließlich in der Expansionsphase oder zusätzlich auch während der Differenzierung geteilt haben. Dessen ungeachtet kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Entwicklungsstadium zwischen den Zeiträumen E18 und der Geburt einen Einfluss auf die Proliferationsrate von nicht-neuronalen Zellen in der Expansionsphase der Zellkultur ausübt.

Das in der Promotionsarbeit beobachtete Phänomen, dass mit zunehmendem Entwicklungsstadium das Proliferationspotential von neuronalen ENS-Progenitoren in der Zellkultur abnimmt, ließ sich ebenfalls in weiteren Publikationen belegen. In diesen Arbeiten wurden jedoch im Gegensatz zu den Untersuchungen der Promotionsarbeit Entwicklungsstadien mit größeren Intervallen miteinander verglichen (postnatale Stadien P2 - P15 versus embryonale Stadien E11 - E14), (Kruger *et al.* 2002, Bondurand *et al.* 2003, Tian *et al.* 2021). Es war daher zu Beginn der Promotionsarbeit nicht abzusehen, dass sich bereits bei einem Unterschied von zwei Entwicklungstagen (E18 versus P0) ein deutlicher Effekt auf die Neurogenese in der Zellkultur nachweisen ließ.

Eine umfangreiche Analyse zum Differenzierungspotential von embryonalen und postnatalen ENS-Progenitoren zu neuronalen Subtypen wurde von Kruger und Mitarbeiter durchgeführt (Kruger *et al.* 2002). Im Vergleich zum embryonalen Entwicklungsstadium E14 konnte ein deutlich reduziertes Differenzierungspotential von postnatalen ENS-Stammzellen zu noradrenergen und serotonergen Neuronen beobachtet werden, während sich bei der Differenzierung zu VIP-, NOS1- und Neuropeptid Y-positiven Nervenzellen keine Unterschiede feststellen ließen. Das Differenzierungspotential der Progenitoren wurde ebenfalls in zwei ausführlichen tierexperimentellen Implantationsstudien untersucht. Dazu wurden embryonale und postnatale ENS-Vorläuferzellen in adulte Därme der Maus bzw. der Ratte implantiert. Bei beiden Tiermodellen konnten keine entwicklungsabhängigen Unterschiede zum allgemeinen Differenzierungspotential der ENS-Vorläuferzellen *in vivo* zu Peripherin-, Acetylcholinesterase- und NOS1-positiven Neuronen beobachtet werden (E13/14 versus P4, Maus), (Hotta *et al.* 2013) und (E14 versus P2; Ratte), (Tian *et al.* 2021).

Die tierexperimentelle Studie von Tian und Mitarbeiter zeigte aber, dass im Unterschied zum Differenzierungspotential die implantierten embryonalen ENS-Progenitoren eine höhere Überlebens- und Migrationsrate im adulten Empfängergewebe im Vergleich zu den postnatalen ENS-Vorläuferzellen aufweisen (Tian *et al.* 2021).

4.3 Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Proliferation von ENS-Progenitoren *in vitro*

Der Wnt-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Stammzellhomöostase verschiedener Gewebe und beeinflusst dabei in hohem Maße zelluläre Prozesse der Gewebeerneuerung und Regeneration (Clevers *et al.* 2014).

In Bezug auf das enterische Nervensystem *in vivo* wurde in der Vergangenheit vor allem der Wnt-Einfluss auf die embryonale und fötale Entwicklung wissenschaftlich betrachtet. In Kombination mit unterschiedlichen Signalmolekülen wie beispielsweise *Bone Morphogenetic Proteins*, FGF's, Notch, Retinolsäure, Neurotrophin3 oder GDNF steuert der Wnt-Signalweg die Induktion und Determination der Neuralleiste sowie die embryonale Neurogenese des ENS (Schmidt und Patel 2005, Basch und Bronner-Fraser 2006). Der Einfluss des Wnt-Signalwegs in diesem System wird exemplarisch bei *Knockout*-Mäusen deutlich, bei denen der Wnt-Rezeptor Frizzled-3 ausgeschaltet ist. Diese Tiere zeigen in der Embryogenese des ENS deutliche Störungen in der Ausbildung des neuronalen Netzwerks (Sasselli *et al.* 2013).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte in der Promotionsarbeit der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Proliferation von postnatalen ENS-Vorläuferzellen in der Zellkultur untersucht werden.

Dazu wurden einzeln kultivierte Enterosphären in der Expansionsphase mit BrdU und mit stimulierenden und hemmenden Substanzen des Wnt-Signalwegs wie SB216763, Wnt3a, R-Spondin1, Norrin und *Dickkopf-Related Protein 1* (DKK1) inkubiert. Anschließend wurde das Sphärenwachstum sowie in einem weiteren Ansatz nach der Differenzierungsphase die Neubildung der Neurone analysiert. Wnt3a, SB216763, R-Spondin1 und Norrin können über verschiedene Mechanismen den Wnt-Signalweg aktivieren bzw. verstärken (Guezguez *et al.* 2014), während DKK1 ein Wnt-Antagonist darstellt (Semënov *et al.* 2001).

Wnt3a gehört zur Gruppe der Wnt-Moleküle, die *in vivo* über Frizzled-Rezeptoren den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren (He *et al.* 2015). SB216763 ist ein Inhibitor der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3), erhöht dadurch intrazellulär die β -Catenin-Konzentration und stimuliert somit ebenfalls den kanonischen Wnt-Signalweg (Kirby *et al.* 2012). R-Spondine verstärken die Wnt-Signalwege über

Interaktionen mit LGR-Rezeptoren oder Heparansulfat-Proteoglykanen (Dubey *et al.* 2020, Rim *et al.* 2022). Das sekretorische Protein Norrin aktiviert über eine Bindung an Frizzled-4 den kanonischen Wnt-Signalweg (Ohlmann und Tamm 2012).

Die Untersuchungen aus der Promotionsarbeit ergaben, dass sowohl Wnt3a, R-Spondin1 und SB216763 als auch überraschenderweise der Wnt-Antagonist DKK1 in den eingesetzten Konzentrationen signifikant das Sphärenwachstum von einzeln kultivierten Enterosphären gegenüber den entsprechenden Kontrollen steigerten.

Di Liddo und Mitarbeiter beschrieben bei der Ratte ebenfalls einen Wachstumsfördernden Effekt von Wnt3a in Sphärenkulturen (Di Liddo *et al.* 2015). Im humanen System konnte der Einfluss des Wnt-Signalweges gleichfalls bestätigt werden. Über eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch Verwendung des GSK3-Inhibitors CHIR-99021 ließ sich die Proliferationsrate von kultivierten humanen P75-selektierten-Progenitoren deutlich erhöhen (Rollo *et al.* 2016).

Die in der Promotionsarbeit erarbeiteten Daten zum Sphärenwachstum legten die Grundlage für weitergehende Untersuchungen der Tübinger Arbeitsgruppe am Anatomischen Institut, die 2017 publiziert wurden (Zhang *et al.* 2017):

RT-PCR-Analysen an murinen Enterosphären belegten die Expression der Frizzled-Rezeptoren 1 bis 10 und der Ko-Rezeptoren LRP 5 und 6. Die Zugabe von Wnt3a und SB 216763 führte zu einer intrazellulären Akkumulation von β -Catenin in den Zellen der Enterosphären, was auf die Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalweges hinweist. Des Weiteren zeigten Genexpressionsanalysen, dass Wnt3a bekannte Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges wie Axin2, LEF1 und LGR5 hochreguliert. Die quantitative Auswertung von immunhistologischen Färbungen zum Zellproliferationsmarker Ki67 bestätigten zudem die proliferative Wirkung von Wnt3a in der Expansionsphase der Kultivierung (Zhang *et al.* 2017).

Interessanterweise konnte bei den Experimenten in der Promotionsarbeit, bei denen einzeln kultivierte Enterosphären untersucht wurden, beobachtet werden, dass bei den unbehandelten Kontrollen die einzeln kultivierten Enterosphären

trotz der Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF nicht an Größe zunah-
men; im Gegensatz zu ENS-Kulturverfahren, bei denen eine Vielzahl von Sphä-
ren zusammen in einem Kulturgefäß kultiviert werden (Mohr *et al.* 2013).

Dies könnte möglicherweise darin begründet sein, dass bei der Einzelsphären-
kultivierung auf Grund der zu geringen Zellmasse nicht ausreichend autosekre-
tierende Wachstumsfaktoren gebildet werden, die die Proliferation stimulieren
und/oder eventuell eine Apoptose der Zellen hemmen. Bei diesen autosekretie-
renden Faktoren könnten möglicherweise auch Wnt-Rezeptorliganden beteiligt
sein. In diesem Zusammenhang wurde in DNA-Microarrayanalysen die mRNA-
Genexpression von Wnt-Molekülen in proliferierenden Enterosphären nachge-
wiesen (Neckel *et al.* 2016).

In Bezug auf die Neurogenese ließ sich in der Promotionsarbeit ein stimulieren-
der Effekt von Wnt3a, SB216763 und R-Spondin1 auf den prozentualen Anteil
der neugebildeten Neurone in Bezug zur Gesamtzahl der proliferierenden Zellen
in den Enterosphären feststellen, wenn die Substanzen in der Proliferationspha-
se zugegeben wurden. In einer nachfolgenden Studie konnte dieser Wnt-Effekt
ebenfalls in „aufgereinigten“ ENS-Sphären bestätigt werden. In diesen Experi-
menten wurden die intestinalen Neurosphären von Wnt1-Cre2-Reporter-mäusen
generiert (Zhang *et al.* 2017). Bei diesen transgenen Tieren sind alle neuronalen
Zellabkömmlinge der embryonalen Neuralleistenzellen im Darm fluoreszenzmar-
kiert und können somit über *FACS-Sorting* für die Zellkulturexperimente aufge-
reinigt werden. Mit dieser Methode wurde ausgeschlossen, dass die in den
Enterosphären beobachteten Wnt-Effekte von Bindegewebs- und glatten Muskel-
zellen abhängig sind.

Darüber hinaus belegten weiterführende Experimente, dass die Neubildung von
Neuronen nicht nur bei murinen ENS-Progenitoren, sondern auch bei humanen
ENS-Vorläuferzellen durch Wnt3a stimuliert werden kann (Zhang *et al.* 2017).

In der Promotionsarbeit zeigte der Frizzled-4-Rezeptor-Agonist Norrin weder
beim Sphärenwachstum noch bei der Neurogenese einen signifikanten Effekt.
Ausführliche Dosis-Wirkungsanalysen sind nötig, um definitiv eine proliferative
Wirkung von Norrin auf ENS-Progenitoren auszuschließen. Andererseits könnten

hier auch andere zelluläre Prozesse eine Rolle spielen. So wird Norrin in der Retina nicht nur mit der Zellproliferation, sondern auch mit der Zellmigration und einer neuroprotektiven Wirkung in Zusammenhang gebracht (Ohlmann und Tamm 2012). Die Untersuchungen zu Norrin sind deswegen interessant, da das Protein hochspezifisch an den Frizzled-4-Rezeptor bindet. Die Expression von Frizzled-4 konnte sowohl in murinen als auch in menschlichen Enterosphären aus dem Darm nachgewiesen werden (Zhang *et al.* 2017, Neckel *et al.* 2019). Antikörperfärbungen gegen Frizzled-4 belegten dabei eine Anfärbung von neuronalen Zellpopulationen des humanen ENS (Nothelfer *et al.* 2016). FACS-Analysen bestätigten die immunhistologischen Daten, dass Frizzled-4-positive ENS-Zellen eine Subpopulation der p75^{NTR}-exprimierenden Zellen darstellen. In pathologischem Hirschsprunggewebe, bei dem die Ganglienzellen des Dickdarms von oral nach anal abnehmen, konnte dabei ebenfalls eine Reduktion der Frizzled-4-positiven ENS-Zellen beobachtet werden (Nothelfer *et al.* 2016).

Darüber hinaus gelang es mittels *FACS-Sorting*, Frizzled-4-positive Zellen aus kindlichem Darmgewebe zu isolieren, die sich in der Zellkultur zu ENS-Sphären entwickelten und nachfolgend zu Gliazellen und Neuronen differenzieren ließen (Neckel *et al.* 2019).

Ein interessanter Aspekt in der Promotionsarbeit stellt die Beobachtung dar, dass der Wnt-Antagonist DKK1, der in den Experimenten das Enterosphärenwachstum förderte, keinen Effekt auf die Neurogenese der ENS-Progenitoren in der Zellkultur ausübte. Diese Diskrepanz könnte auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. Einerseits wäre es denkbar, dass DKK1 die Proliferation vorzugsweise von nicht-neuralen Zellpopulationen in den Enterosphären stimuliert. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass in der Expansionsphase durch Induktion der Apoptose der Anteil der differenzierenden Neurone beeinflusst wird.

Zusammenfassend ergeben die experimentellen Daten aus der Promotionsarbeit und der Literatur, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Proliferationsphase die Neurogenese von postnatalen ENS-Progenitoren stimuliert. Inwieweit sowohl der kanonische β -Catenin-abhängige Signalweg als auch

nicht-kanonische Wnt-Signalwege *in vitro* weitere zelluläre Prozesse wie die Differenzierung oder Migration beeinflussen, sind für das postnatale Entwicklungsstadium noch weitgehend ungeklärt. Ebenso ist der Einfluss des Wnt-Signalwegs *in vivo* auf den postnatalen ENS-Progenitorzellpool sowie auf Regenerationsprozesse des ENS im Darm größtenteils unerforscht.

Deutlich fortgeschrittener sind die Erkenntnisse zu den Wnt-Signalwegen in Bezug auf die Regulation von postnatalen neuronalen Stammzellen und Stammzellnischen des zentralen Nervensystems wie beispielsweise bei der Subventrikularzone oder beim Hippocampus (Prakash und Wurst 2007, Michaelidis und Lie 2008, Inestrosa und Varela-Nallar 2015, Hirota *et al.* 2016, Rosenbloom *et al.* 2020).

Die in der Vergangenheit häufig verwendete vereinfachte Darstellung, dass Zellfunktionen wie die Zellproliferation, Determination, Migration und Differenzierung entweder dem kanonischen oder einem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zugeordnet werden können, lässt sich aufgrund neuerer Erkenntnisse nicht aufrechterhalten, da die verschiedenen Wnt-Signalwege sich gegenseitig beeinflussen können und mit weiteren entwicklungsbeeinflussenden Signalwegen stark vernetzt sind (Bengoa-Vergniory und Kypta 2015). Daher wird postuliert, dass für die Regulation der Stammzell- und Progenitorpopulationen ein Zusammenspiel zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen zwingend erforderlich ist (Bengoa-Vergniory und Kypta 2015).

In diesem Bezug ist ebenfalls zu betonen, dass selbst bei Betrachtung der kanonischen Wnt-Signalkaskade verschiedene Publikationen belegen, dass dieser Signalweg sowohl die Proliferation als auch die Zelldetermination und Differenzierung von ZNS-Progenitoren aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien aktivieren kann (Bengoa-Vergniory und Kypta 2015).

Möglicherweise hängt dieses Phänomen damit zusammen, dass die Zellen unterschiedliche entwicklungsabhängige Expressionsmuster der Wnt-Rezeptoren aufweisen. Dies führt dazu, dass verschiedene Wnt-Signalwege bzw. weitere Signalkaskaden, die wiederum miteinander wechselseitig kommunizieren können, bei der Zellregulation angeschaltet werden. Zusätzlich spielen die verschiedenen zellulären Interaktionspartner und die Zusammensetzung der extrazellulären

Matrix eine nicht zu vernachlässigende Rolle bei der Regulation von Stammzell-nischen (Michaelidis und Lie 2008, Bengoa-Vergniory und Kypta 2015, Inestrosa und Varela-Nallar 2015, Hirota *et al.* 2016, Rosenbloom *et al.* 2020).

Die oben beschriebene Komplexität macht es beispielsweise sowohl beim ZNS als auch beim ENS nicht einfach, Erkenntnisse über Stammzellen von einem Entwicklungsstadium auf ein anderes Entwicklungsstadium auch aufgrund des unterschiedlichen *Microenvironments* zu übertragen. Daher ist es von Bedeutung, jedes zu erforschende Zellsystem in Bezug auf den Einfluss der Wnt-Signalwege gesondert zu betrachten bzw. zu analysieren.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Isolation von neuronalen ENS-Progenitoren aus Darmgeweben und deren Expansion in sogenannten Enterosphärenkulturen bietet die Option, wissenschaftliche Fragestellungen zu den Mechanismen der Regulation von Stamm- und Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems zu erforschen.

Mit diesen Zellkulturverfahren ließ sich in der Promotionsarbeit mit Hilfe von BrdU-Komarkierungstechniken im Rahmen eines Kooperationsprojekts belegen, dass sich elektrophysiologisch abgeleitete funktionale Nervenzellen der Maus definitiv aus proliferierenden ENS-Progenitoren gebildet hatten (Dettmann *et al.* 2014). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die so charakterisierten Neurone sich ausschließlich aus determinierten nicht mehr teilenden unreifen Nervenzellen entwickelten.

Des Weiteren wurden in der Promotionsarbeit vergleichende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von neuronalen Vorläuferzellen in der Zellkultur in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium beim Modellorganismus der Maus durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass neuronale Vorläuferzellen aus fötalen E18-Mäusen gegenüber neonatalen ENS-Zellen in der Zellkultur ein deutlich höheres proliferatives Potential selbst in diesem engen Entwicklungszeitfenster aufwiesen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zum Zeitpunkt der Geburt (P0) im Gegensatz zum zwei Tage früheren spätfötalen Stadium (E18) die Anzahl der neuronalen Progenitoren in der Darmwand signifikant vermindert ist. Dieses beobachtete

Phänomen ist im Einklang mit Befunden aus der Literatur, dass das Neurogenese-Potential mit zunehmendem Entwicklungsstadium abnimmt (Kruger *et al.* 2002, Bondurand *et al.* 2003, Tian *et al.* 2021).

Die in der Promotionsarbeit durchgeführten Experimente zum Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Enterosphärenkulturen zeigten, dass R-Spondin1, SB216763 und Wnt3a sowohl das Wachstum der Enterosphären als auch die Neurogenese von neonatalen ENS-Progenitoren stimulierten. Überraschenderweise förderte der Wnt-Antagonist DKK1 ebenfalls das Enterosphärenwachstum; es konnte jedoch kein Effekt des Antagonisten auf die Neubildung von Neuronen beobachtet werden.

Die erhobenen Daten zum Wnt-Einfluss legten die Grundlage für weitergehende zellbiologische und molekulare Analysen zur Charakterisierung des β -Catenin-abhängigen kanonischen Signalwegs bei postnatalen ENS-Progenitoren *in vitro* (Zhang *et al.* 2017). Dabei konnte die Neubildung von Neuronen über den Wnt-Signalweg nicht nur bei murinen Progenitoren, sondern auch bei humanen ENS-Vorläuferzellen gezeigt werden.

Von Interesse sind zudem die in der Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse, dass durch eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs auch bei einer geringen Anzahl von Progenitoren ein proliferativer Stimulus in der Zellkultur ausgeübt werden konnte. Dies könnte besonders für Zellisolutions- und Zellexpansionsstrategien, bei denen nur wenig Biopsiematerial für die Zellkultivierung zur Verfügung steht, von Bedeutung sein, da über eine Zugabe von Wnt-Agonisten der zur Verfügung stehende Zellpool beispielsweise für zukünftige Zelltherapien vergrößert werden kann.

In weiterführenden Studien wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit die Wnt-Moleküle über die verschiedenen Wnt-Signalwege weitere zelluläre Prozesse wie die Migration oder die Zelldifferenzierung von postnatalen glialen und neuronalen Zellen des Gastrointestinaltrakts steuern. Diesbezüglich ist es aber auch relevant, Wechselwirkungen der neuralen Progenitoren mit dem *Microenvironment* sowie Interaktionen mit nicht-neuralen Zellen des Darms wie Immunzellen, Fibrozyten, Drüsenepithelzellen, glatte Muskelzellen oder Oberflächenepithelzellen im Detail zu analysieren, die möglicherweise das neurale Netzwerk des

„Darmgehirns“ über verschiedene Wnt-Signalwege beeinflussen.

Letztendlich würden diese Untersuchungen wichtige Erkenntnisse liefern, um in Verbindung mit tierexperimentellen Studien die Regulation der postnatalen ENS-Progenitoren sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen *in vivo* besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Das enterische Nervensystem (ENS) besteht aus einem weitgehend autonomen Netzwerk von neuronalen und glialen Zellen innerhalb der Wand des Verdauungssystems. ENS-Zellen stammen von Neuralleistenzellen ab, die während der Embryogenese in den Gastrointestinaltrakt einwandern. Eine Subpopulation dieser Neuralleistenzellabkömmlinge weisen auch noch im postnatalen Entwicklungsstadium Stammzeleigenschaften auf. Dies ermöglicht es, neurale Progenitoren aus der Darmwand zu isolieren, welche mit Hilfe von definierten Zellkulturverfahren in sogenannten Enterosphärenkulturen proliferiert und nachfolgend differenziert werden können. Dabei besitzen die *in vitro*-expandierten ENS-Progenitoren einer Enterosphäre die multipotente Fähigkeit, sich in verschiedene neuronale Subtypen und Gliazellen zu differenzieren.

Unter Verwendung dieser Zellkulturtechniken wurden im Rahmen der Promotionsarbeit zwei Hauptziele verfolgt: Zum einen sollte das Proliferations- und Differenzierungspotential von ENS-Progenitoren vergleichend zwischen dem spätfötalen und neonatalen Entwicklungsstadium der Maus bestimmt werden. Zum anderen wurde der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Neurogenese von neonatalen murinen ENS-Vorläuferzellen *in vitro* untersucht.

Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurden verschiedene Zellkulturverfahren, BrdU-Markierungsmethoden und Immunfluoreszenztechniken zur Detektion und Auswertung der intestinalen Zellen angewandt.

Im Rahmen eines Kooperationsprojekts konnte in der Promotionsarbeit mit Hilfe von BrdU-Komarkierungstechniken definitiv bewiesen werden, dass elektrophysiologisch abgeleitete funktionale Neurone der Maus sich aus proliferierenden ENS-Progenitoren und nicht ausschließlich aus determinierten nicht mehr teilenden Nervenzellen in der Zellkultur entwickelten.

Zudem zeigten die Experimente zum entwicklungsabhängigen Wachstumsverhalten, dass ENS-Progenitoren aus spätfötalen E18-Mäusen ein deutlich höheres proliferatives Potential in der Zellkultur gegenüber neonatalen ENS-Zellen aufwiesen.

Die Untersuchungen zum Einfluss des Wnt-Signalwegs ergaben, dass die in der Proliferationsphase applizierten Substanzen R-Spondin1, SB216763 und Wnt3a,

von denen bekannt ist, dass sie den kanonischen Wnt-Signalweg stimulieren bzw. verstärken, sowohl das Wachstum der Enterosphären als auch die Neurogenese der neonatalen ENS-Progenitoren förderten. Demgegenüber steigerte der Wnt-Antagonist DKK1 zwar das Enterosphärenwachstum, er zeigte jedoch keinen Effekt auf die Neubildung von Neuronen.

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs die Proliferation der kultivierten ENS-Progenitoren auch bei einer geringen Zellanzahl induzierte und aufrechterhielt. Dies könnte besonders für Implantationsexperimente und zukünftige Zelltherapien von Bedeutung sein, wenn nur wenig Biopsiematerial für Zellexpansionsverfahren zur Verfügung steht.

Die Erkenntnisse aus der Promotionsarbeit bildeten neue Ausgangspunkte für weitergehende molekular- und zellbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung des Wnt-Systems sowohl bei murinen als auch humanen postnatalen ENS-Progenitoren *in vitro*.

In zukünftigen Studien wäre es interessant zu evaluieren, inwieweit durch die unterschiedlichen Wnt-Signalkaskaden neben der Zellproliferation weitere zelluläre Prozesse wie die Zellmigration oder die Zelldifferenzierung im postnatalen ENS reguliert werden. Ebenso ist es aus wissenschaftlicher Sicht spannend, Wechselwirkungen der ENS-Zellen mit nicht-neuralen Zellen des Darms tiefergehend zu analysieren, die möglicherweise über verschiedene Wnt-Signalwege vermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

Almond, S., R. M. Lindley, S. E. Kenny, M. G. Connell and D. H. Edgar (2007). "Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells." *Gut* 56(4): 489-496.

Anderhuber, F., T. J. Filler, F. Pera und E. T. Peuker (2012). "Innere Organe in Thorax, Abdomen und Becken." S 570, Anderhuber, F., F. Pera und J. Streicher, Waldeyer - Anatomie des Menschen, Walter de Gruyter, Berlin/Boston.

Anderson, R. B., A. L. Stewart and H. M. Young (2006). "Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways." *Cell Tissue Res* 323(1): 11-25.

Arredondo, S. B., D. Valenzuela-Bezanilla, M. D. Mardones and L. Varela-Nallar (2020). "Role of Wnt Signaling in Adult Hippocampal Neurogenesis in Health and Disease." *Front Cell Dev Biol* 8: 860.

Basch, M. L. and M. Bronner-Fraser (2006). "Neural crest inducing signals." *Adv Exp Med Biol* 589: 24-31.

Belkind-Gerson, J., R. Hotta, N. Nagy, A. R. Thomas, H. Graham, L. Cheng, J. Solorzano, D. Nguyen, M. Kamionek, J. Dietrich, B. J. Cherayil and A. M. Goldstein (2015). "Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT4-dependent mechanism." *Inflamm Bowel Dis* 21(4): 870-878.

Benarroch, E. E. (2007). "Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications." *Neurology* 69(20): 1953-1957.

Bengoa-Vergniory, N. and R. M. Kypta (2015). "Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells." *Cell Mol Life Sci* 72(21): 4157-4172.

Binder, E., D. Natarajan, J. Cooper, R. Kronfli, M. Cananzi, J. M. Delalande, C. McCann, A. J. Burns and N. Thapar (2015). "Enteric neurospheres are not specific to neural crest cultures: implications for neural stem cell therapies." *PLoS One* 10(3): e0119467.

Boesmans, W., R. Lasrado, P. Vanden Berghe and V. Pachnis (2015). "Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system." *Glia* 63(2): 229-241.

Bondurand, N., D. Natarajan, N. Thapar, C. Atkins and V. Pachnis (2003). "Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures." *Development* 130(25): 6387-6400.

Burns, A. J., A. M. Goldstein, D. F. Newgreen, L. Stamp, K. H. Schafer, M. Metzger, R. Hotta, H. M. Young, P. W. Andrews, N. Thapar, J. Belkind-Gerson, N. Bondurand, J. C. Bornstein, W. Y. Chan, K. Cheah, M. D. Gershon, R. O. Heuckeroth, R. M. Hofstra, L. Just, R. P. Kapur, S. K. King, C. J. McCann, N. Nagy, E. Ngan, F. Obermayr, V. Pachnis, P. J. Pasricha, M. H. Sham, P. Tam and P. Vanden Berghe (2016). "White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies." *Dev Biol* 417(2): 229-251.

- Chanpong, A., O. Borrelli and N. Thapar (2022). "Recent advances in understanding the roles of the enteric nervous system." *Fac Rev* 11: 7.
- Clevers, H., K. M. Loh and R. Nusse (2014). "Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control." *Science* 346(6205): 1248012.
- Deleyrolle, L., S. Marchal-Victorion, C. Dromard, V. Fritz, M. Saunier, J. C. Sabourin, C. Tran Van Ba, A. Privat and J. P. Hugnot (2006). "Exogenous and fibroblast growth factor 2/epidermal growth factor-regulated endogenous cytokines regulate neural precursor cell growth and differentiation." *Stem Cells* 24(3): 748-762.
- Dettmann, H. M., Y. Zhang, N. Wronna, U. Kraushaar, E. Guenther, R. Mohr, P. H. Neckel, A. Mack, J. Fuchs, L. Just and F. Obermayr (2014). "Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system." *PLoS One* 9(5): e97792.
- Di Liddo, R., T. Bertalot, A. Schuster, S. Schrenk, A. Tasso, I. Zanusso, M. T. Conconi and K. H. Schäfer (2015). "Anti-inflammatory activity of Wnt signaling in enteric nervous system: in vitro preliminary evidences in rat primary cultures." *J Neuroinflammation* 12: 23.
- Dubey, R., P. van Kerkhof, I. Jordens, T. Malinauskas, G. V. Pusapati, J. K. McKenna, D. Li, J. E. Carette, M. Ho, C. Siebold, M. Maurice, A. M. Lebensohn and R. Rohatgi (2020). "R-spondins engage heparan sulfate proteoglycans to potentiate WNT signaling." *Elife* 9.
- Durbec, P. L., L. B. Larsson-Blomberg, A. Schuchardt, F. Costantini and V. Pachnis (1996). "Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts." *Development* 122(1): 349-358.
- Furness, J. B. (2000). "Types of neurons in the enteric nervous system." *J Auton Nerv Syst* 81(1-3): 87-96.
- Furness, J. B. (2006). "The Enteric Nervous System." S 1-274, Blackwell Publishing, Malden/Oxford/Carlton.
- Furness, J. B. (2012). "The enteric nervous system and neurogastroenterology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(5): 286-294.
- Gershon, M. D. (1999). "The enteric nervous system: a second brain." *Hosp Pract* (1995) 34(7): 31-32, 35-38, 41-32 passim.
- Goldstein, A. M., R. M. Hofstra and A. J. Burns (2013). "Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system." *Clin Genet* 83(4): 307-316.
- Guezguez, A., F. Paré, Y. D. Benoit, N. Basora and J. F. Beaulieu (2014). "Modulation of stemness in a human normal intestinal epithelial crypt cell line by activation of the WNT signaling pathway." *Exp Cell Res* 322(2): 355-364.
- Hao, M. M., J. C. Bornstein, P. Vanden Berghe, A. E. Lomax, H. M. Young and J. P. Foong (2013). "The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system." *Dev Biol* 382(1): 365-374.

- Hao, M. M., J. P. Foong, J. C. Bornstein, Z. L. Li, P. Vanden Berghe and W. Boesmans (2016). "Enteric nervous system assembly: Functional integration within the developing gut." *Dev Biol* 417(2): 168-181.
- He, S., Y. Lu, X. Liu, X. Huang, E. T. Keller, C. N. Qian and J. Zhang (2015). "Wnt3a: functions and implications in cancer." *Chin J Cancer* 34(12): 554-562.
- Heanue, T. A. and V. Pachnis (2007). "Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies." *Nat Rev Neurosci* 8(6): 466-479.
- Hegewald, C., R. Alt, S. Hetz, M. Cross, A. Acikgoez, H. Till, R. Metzger and M. Metzger (2011). "Reduced oxygen stress promotes propagation of murine postnatal enteric neural progenitors in vitro." *Neurogastroenterol Motil* 23(10): e412-424.
- Hetz, S., A. Acikgoez, U. Voss, K. Nieber, H. Holland, C. Hegewald, H. Till, R. Metzger and M. Metzger (2014). "In vivo transplantation of neurosphere-like bodies derived from the human postnatal and adult enteric nervous system: a pilot study." *PLoS One* 9(4): e93605.
- Heuckeroth, R. O. (2018). "Hirschsprung disease - integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(3): 152-167.
- Hirota, Y., M. Sawada, S. H. Huang, T. Ogino, S. Ohata, A. Kubo and K. Sawamoto (2016). "Roles of Wnt Signaling in the Neurogenic Niche of the Adult Mouse Ventricular-Subventricular Zone." *Neurochem Res* 41(1-2): 222-230.
- Holland, A. M., A. C. Bon-Frauches, D. Keszthelyi, V. Melotte and W. Boesmans (2021). "The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology." *Cell Mol Life Sci* 78(10): 4713-4733.
- Hotta, R., L. A. Stamp, J. P. Foong, S. N. McConnell, A. J. Bergner, R. B. Anderson, H. Enomoto, D. F. Newgreen, F. Obermayr, J. B. Furness and H. M. Young (2013). "Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon." *J Clin Invest* 123(3): 1182-1191.
- Inestrosa, N. C. and L. Varela-Nallar (2015). "Wnt signalling in neuronal differentiation and development." *Cell Tissue Res* 359(1): 215-223.
- Jacobson, A., D. Yang, M. Vella and I. M. Chiu (2021). "The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes." *Mucosal Immunol* 14(3): 555-565.
- Ji, Y., H. Hao, K. Reynolds, M. McMahon and C. J. Zhou (2019). "Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis." *Cells* 8(10).
- Jonscher, R. and J. Belkind-Gerson (2019). "Concise Review: Cellular and Molecular Mechanisms of Postnatal Injury-Induced Enteric Neurogenesis." *Stem Cells* 37(9): 1136-1143.

- Kang, Y. N., C. Fung and P. Vanden Berghe (2021). "Gut innervation and enteric nervous system development: a spatial, temporal and molecular tour de force." *Development* 148(3).
- Kirby, L. A., J. T. Schott, B. L. Noble, D. C. Mendez, P. S. Caseley, S. C. Peterson, T. J. Routledge and N. V. Patel (2012). "Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) Inhibitor, SB-216763, Promotes Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells." *PLoS One* 7(6).
- Klingelhoefler, L. and H. Reichmann (2015). "Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors." *Nat Rev Neurol* 11(11): 625-636.
- Konturek, S. J., J. W. Konturek, T. Pawlik and T. Brzozowski (2004). "Brain-gut axis and its role in the control of food intake." *J Physiol Pharmacol* 55(1 Pt 2): 137-154.
- Kruger, G. M., J. T. Mosher, S. Bixby, N. Joseph, T. Iwashita and S. J. Morrison (2002). "Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness." *Neuron* 35(4): 657-669.
- Kulkarni, S., M. A. Micci, J. Leser, C. Shin, S. C. Tang, Y. Y. Fu, L. Liu, Q. Li, M. Saha, C. Li, G. Enikolopov, L. Becker, N. Rakhilin, M. Anderson, X. Shen, X. Dong, M. J. Butte, H. Song, E. M. Southard-Smith, R. P. Kapur, M. Bogunovic and P. J. Pasricha (2017). "Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(18): E3709-E3718.
- Lake, J. I. and R. O. Heuckeroth (2013). "Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305(1): G1-24.
- Laranjeira, C., K. Sandgren, N. Kessaris, W. Richardson, A. Potocnik, P. Vanden Berghe and V. Pachnis (2011). "Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury." *J Clin Invest* 121(9): 3412-3424.
- Le Douarin, N. M. and M. A. Teillet (1973). "The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo." *J Embryol Exp Morphol* 30(1): 31-48.
- Lindley, R. M., D. B. Hawcutt, M. G. Connell, D. H. Edgar and S. E. Kenny (2009). "Properties of secondary and tertiary human enteric nervous system neurospheres." *J Pediatr Surg* 44(6): 1249-1255; discussion 1255-1246.
- Metzger, M., P. M. Bareiss, I. Nikolov, T. Skutella and L. Just (2007a). "Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system." *Dev Dyn* 236(1): 128-133.
- Metzger, M., S. Conrad, T. Skutella and L. Just (2007b). "RGMA inhibits neurite outgrowth of neuronal progenitors from murine enteric nervous system via the neogenin receptor in vitro." *J Neurochem* 103(6): 2665-2678.

Metzger, M., P. M. Bareiss, T. Danker, S. Wagner, J. Hennenlotter, E. Guenther, F. Obermayr, A. Stenzl, A. Koenigsrainer, T. Skutella and L. Just (2009a). "Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system." *Gastroenterology* 137(6): 2063-2073 e2064.

Metzger, M., C. Caldwell, A. J. Barlow, A. J. Burns and N. Thapar (2009b). "Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders." *Gastroenterology* 136(7): 2214-2225 e2211-2213.

Michaelidis, T. M. and D. C. Lie (2008). "Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web." *Cell Tissue Res* 331(1): 193-210.

Michel, K., B. Kuch, S. Dengler, I. E. Demir, F. Zeller and M. Schemann (2022). "How big is the little brain in the gut? Neuronal numbers in the enteric nervous system of mice, Guinea pig, and human." *Neurogastroenterol Motil* 34(12): e14440.

Mohr, R., P. Neckel, Y. Zhang, S. Stachon, K. Nothelfer, K. Schaeferhoff, F. Obermayr, M. Bonin and L. Just (2013). "Molecular and cell biological effects of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system in vitro." *Stem Cell Res* 11(3): 1191-1205.

Nagy, N. and A. M. Goldstein (2017). "Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon." *Semin Cell Dev Biol* 66: 94-106.

Neckel, P. H., R. Mohr, Y. Zhang, B. Hirt and L. Just (2016). "Comparative Microarray Analysis of Proliferating and Differentiating Murine ENS Progenitor Cells." *Stem Cells Int* 2016: 9695827.

Neckel, P. H., M. Scharr, K. Seid, K. Nothelfer, J. Fuchs, F. Obermayr, B. Hirt, S. M. Huber and L. Just (2019). "Wnt Receptor Frizzled-4 as a Marker for Isolation of Enteric Neural Progenitors in Human Children." *Cells* 8(8).

Ng, L. F., P. Kaur, N. Bunnag, J. Suresh, I. C. H. Sung, Q. H. Tan, J. Gruber and N. S. Tolwinski (2019). "WNT Signaling in Disease." *Cells* 8(8).

Niesler, B., S. Kuerten, I. E. Demir and K. H. Schafer (2021). "Disorders of the enteric nervous system - a holistic view." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18(6): 393-410.

Nothelfer, K., F. Obermayr, N. Belz, E. Reinartz, P. M. Bareiss, H. J. Bühring, R. Beschorner and L. Just (2016). "Expression of the Wnt Receptor Frizzled-4 in the Human Enteric Nervous System of Infants." *Stem Cells Int* 2016: 9076823.

Obermayr, F., R. Hotta, H. Enomoto and H. M. Young (2013). "Development and developmental disorders of the enteric nervous system." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(1): 43-57.

Ohlmann, A. and E. R. Tamm (2012). "Norrin: molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor." *Prog Retin Eye Res* 31(3): 243-257.

- Pan, W. K., B. J. Zheng, Y. Gao, H. Qin and Y. Liu (2011). "Transplantation of neonatal gut neural crest progenitors reconstructs ganglionic function in benzalkonium chloride-treated homogenic rat colon." *J Surg Res* 167(2): e221-230.
- Pawolski, V. and M. H. H. Schmidt (2020). "Neuron-Glia Interaction in the Developing and Adult Enteric Nervous System." *Cells* 10(1).
- Prakash, N. and W. Wurst (2007). "A Wnt signal regulates stem cell fate and differentiation in vivo." *Neurodegener Dis* 4(4): 333-338.
- Rao, M. and M. D. Gershon (2016). "The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(9): 517-528.
- Rauch, U., M. Klotz, S. Maas-Omlor, E. Wink, A. Hansgen, C. Hagl, S. Holland-Cunz and K. H. Schafer (2006). "Expression of intermediate filament proteins and neuronal markers in the human fetal gut." *J Histochem Cytochem* 54(1): 39-46.
- Rim, E. Y., H. Clevers and R. Nusse (2022). "The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators." *Annu Rev Biochem* 91: 571-598.
- Rollo, B. N., D. Zhang, L. A. Stamp, T. R. Menhennott, L. Stathopoulos, M. Denham, M. Dottori, S. K. King, J. M. Hutson and D. F. Newgreen (2016). "Enteric Neural Cells From Hirschsprung Disease Patients Form Ganglia in Autologous Aneuronal Colon." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2(1): 92-109.
- Rosenbloom, A. B., M. Tarczyński, N. Lam, R. S. Kane, L. J. Bugaj and D. V. Schaffer (2020). " β -Catenin signaling dynamics regulate cell fate in differentiating neural stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(46): 28828-28837.
- Sasselli, V., W. Boesmans, P. Vanden Berghe, F. Tissir, A. M. Goffinet and V. Pachnis (2013). "Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons." *J Clin Invest* 123(4): 1763-1772.
- Schemann, M. and M. Neunlist (2004). "The human enteric nervous system." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1: 55-59.
- Schmidt, C. and K. Patel (2005). "Wnts and the neural crest." *Anat Embryol (Berl)* 209(5): 349-355.
- Schmitteckert, S., T. Mederer, R. Roth, P. Gunther, S. Holland-Cunz, M. Metzger, Y. Samstag, J. Schroder-Braunstein, G. Wabnitz, S. Kurzhals, J. Scheuerer, C. A. Beretta, F. Lasitschka, G. A. Rappold, P. Romero and B. Niesler (2019). "Postnatal human enteric neurospheres show a remarkable molecular complexity." *Neurogastroenterol Motil* 31(10): e13674.
- Schneider, S., C. M. Wright and R. O. Heuckeroth (2019). "Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function." *Annu Rev Physiol* 81: 235-259.
- Schuijers, J. and H. Clevers (2012). "Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins." *EMBO J* 31(12): 2685-2696.

- Semënov, M. V., K. Tamai, B. K. Brott, M. Kühl, S. Sokol and X. He (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." *Curr Biol* 11(12): 951-961.
- Shen, G., J. Ke, Z. Wang, Z. Cheng, X. Gu, Y. Wei, K. Melcher, H. E. Xu and W. Xu (2015). "Structural basis of the Norrin-Frizzled 4 interaction." *Cell Res* 25(9): 1078-1081.
- Suarez-Rodriguez, R. and J. Belkind-Gerson (2004). "Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex vivo into neurons, glia, and smooth muscle." *Stem Cells* 22(7): 1373-1385.
- Tian, D. H., C. H. Qin, W. Y. Xu, W. K. Pan, Y. Y. Zhao, B. J. Zheng, X. L. Chen, Y. Liu, Y. Gao and H. Yu (2021). "Phenotypic and functional comparison of rat enteric neural crest-derived cells during fetal and early-postnatal stages." *Neural Regen Res* 16(11): 2310-2315.
- Uesaka, T., H. M. Young, V. Pachnis and H. Enomoto (2016). "Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut." *Dev Biol* 417(2): 158-167.
- Virtanen, H., D. R. Garton and J. O. Andressoo (2022). "Myenteric Neurons Do Not Replicate in Small Intestine Under Normal Physiological Conditions in Adult Mouse." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 14(1): 27-34.
- Wallace, A. S. and A. J. Burns (2005). "Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract." *Cell Tissue Res* 319(3): 367-382.
- Wedel, T., U. Roblick, J. Gleiss, T. Schiedeck, H. P. Bruch, W. Kuhnel and H. J. Krammer (1999). "Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus." *Ann Anat* 181(4): 327-337.
- Willert, K. and R. Nusse (2012). "Wnt proteins." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9): a007864.
- Wunsch, M., S. Jabari, B. Voussen, M. Enders, S. Srinivasan, F. Cossais, T. Wedel, M. Boettner, A. Schwarz, L. Weyer, O. Gocer, M. Schroeter, M. Maeurer, M. Woenckhaus, K. Pollok, H. Radbruch, L. Klotz, C. J. Scholz, J. Nickel, A. Friebe, K. Addicks, S. Ergun, P. V. Lehmann and S. Kuersten (2017). "The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis." *Acta Neuropathol* 134(2): 281-295.
- Yntema, C. L. and W. S. Hammond (1954). "The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo." *J Comp Neurol* 101(2): 515-541.
- York, J. R. and D. W. McCauley (2020). "The origin and evolution of vertebrate neural crest cells." *Open Biol* 10(1): 190285.

Young, H. M., C. J. Hearn, D. Ciampoli, B. R. Southwell, J. F. Brunet and D. F. Newgreen (1998). "A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture." *Dev Biol* 202(1): 67-84.

Zhang, Y., P. M. Bareiss, K. Nothelfer, R. Mohr, S. Haußmann and L. Just (2011). Influence of Wnt signalling on the proliferation and differentiation of neuronal progenitors from enteric nervous system. 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine, 2010. Stuttgart, Germany; *published Abstract*, Tissue Engineering Part A. 17: 552.

Zhang, Y., K. Seid, F. Obermayr, L. Just and P. H. Neckel (2017). "Activation of Wnt Signaling Increases Numbers of Enteric Neurons Derived From Neonatal Mouse and Human Progenitor Cells." *Gastroenterology* 153(1): 154-165 e159.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Promotionsarbeit wurde am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Lothar Just und anschließend unter der Leitung von Herrn Prof. Bernhard Hirt durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte zusammen mit Herrn Prof. Dr. Lothar Just.

Bei der Erstellung des mikroskopischen Bildes in Abb. 4A war Herr Dr. Jürgen von der Ruhr behilflich.

Die Biozytininjektionen und die elektrophysiologischen Ableitungen erfolgten im Rahmen eines Kooperationsprojekts durch Frau Dr. Nadine Wronna aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Udo Kraushaar.

Bei der Organisation der Labore sowie bei der Herstellung der Puffer-Lösungen und Zellkulturmedien war Frau Susanne Stachon behilflich.

Die Zellkulturexperimente, BrdU-Einbaustudien sowie immunzytochemischen Analysen und statistischen Auswertungen wurden bis auf oben aufgeführten Tätigkeiten von mir eigenständig durchgeführt.

Bei der kritischen Durchsicht und den Korrekturen der Dissertationsschrift waren Herr Prof. Dr. Lothar Just, Herr Dr. Jürgen von der Ruhr und Frau Charlien Wolf behilflich.

Daten aus der Publikation wurden als *Abstract* oder als Originalpublikation in den Zeitschriften „*Tissue Engineering Part A*“ in „*PLOS ONE*“ und in „*Gastroenterology*“ publiziert.

Das in der Zeitschrift „*Tissue Engineering Part A*“ veröffentlichte *Abstract* wurde zusammen mit Herrn Prof. Dr. Lothar Just verfasst.

Die Publikation in „*PLOS ONE*“ wurden von Frau Dr. Heike Dettmann, Herrn Prof. Dr. Lothar Just, Herrn Dr. Udo Kraushaar und Herrn PD Dr. Florian Obermayr verfasst.

Die Veröffentlichung in „*Gastroenterology*“ wurde von Herrn Dr. Neckel und Herrn Prof. Lothar Just mit meiner Unterstützung verfasst.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 2023

Dr. rer. nat. Ying Zhang

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Zhang, Y., P. M. Bareiss, K. Nothelfer, R. Mohr, S. Haußmann and L. Just (2011). Influence of Wnt signalling on the proliferation and differentiation of neuronal progenitors from enteric nervous system. 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine, 2010. Stuttgart, Germany; *published Abstract*, Tissue Engineering Part A. 17: 552.

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

Zhang, Y., K. Seid, F. Obermayr, L. Just and P. H. Neckel (2017). "Activation of Wnt Signaling Increases Numbers of Enteric Neurons Derived From Neonatal Mouse and Human Progenitor Cells." Gastroenterology 153(1): 154-165.