

Charakterisierung und Isolierung von adulten entodermalen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Mikrokompartment der Darmkrypte

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Petra Marion Bareiß

aus Mutlangen

vorgelegte Dissertation

2008

Prüfungstermin:

17.02.2009

Dekan:

Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Skutella

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. A. Nordheim

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und Funktion des Gastrointestinaltraktes	2
1.2	Zelltypen des Darmschleimhautepithels	6
1.3	Die Stammzellnische und die Lage der epithelialen Stammzelle	9
1.4	Molekulare Regulation der intestinalen Stammzellen	12
1.4.1	Der Wnt-Signalweg	12
1.4.2	Der Notch-Signalweg	15
1.4.3	Der Hedgehog-Signalweg	16
1.4.4	Der BMP-Signalweg	17
1.5	Stammzellmarker	18
1.6	Dreidimensionale Gewebekulturen des Darmes.....	20
1.7	Aufgabenstellung	22
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Zell- und Gewebematerial	25
2.2	Isolation von primären Darmepithelzellen.....	25
2.3	Zellkultur	27
2.3.1	Gewebekulturmodell	27
2.3.2	Zellkultur, Caco-2 Zelllinie	28
2.4	Pharmakologische Behandlung der adulten Organkultur und der Mäuse mit Dexamethason	29
2.5	Infektionsexperimente mit Candida albicans	29
2.6	Durchflusszytometrie.....	30
2.6.1	FACS-Analyse mit Antikörperfärbung.....	31
2.6.2	Zellzyklusanalyse	32
2.7	Magnetic Cell Separation	33
2.8	In vitro Untersuchung der Epithelstammzellen	35
2.9	Histochemie	35

2.9.1	Hämalaun/Eosin-Färbung (HE).....	35
2.9.2	Alcianblau Färbung.....	36
2.9.3	Grocott-Färbung	37
2.10	Immunhistochemie/Immuncytochemie.....	38
2.10.1	Immunhistochemie mit Substratumsetzung.....	41
2.10.2	Immunhistochemie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.....	43
2.10.3	BrdU-Labeling.....	44
2.10.4	Primär- und Sekundärantikörper	45
2.11	Elektronenmikroskopie	46
2.11.1	Transmissionselektronenmikroskopie	46
2.11.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	47
2.12	In situ Hybridisierung	47
2.12.1	Herstellung der Sonde für die Serum- und Glukokortikoid induzierbaren-Kinase 1	48
2.12.2	<i>In situ</i> Hybridisierung mit der Sonde für die Serum- und Glukokortikoid induzierbaren-Kinase 1	52
2.12.3	Herstellung der humanspezifischen Alu-Sonde.....	53
2.12.4	<i>In situ</i> Hybridisierung mit der humanspezifischen Alu-Sonde.....	55
3	Ergebnisse	59
3.1	Etablierung der Isolation und Vereinzelung von Darmepithelzellen.....	59
3.2	Untersuchung der Caco-2 Zelllinie und des Darmepithels mit der FACS-Analyse	61
3.3	Untersuchung der Caco-2 Zelllinie und des Darmepithels mit der Immuncyto-/Immunhistochemie	64
3.4	Lebendfärbung humaner Darmkrypten aus dem Colon mit dem SSEA-1-Antikörper	72
3.5	Zellzyklusanalyse von SSEA-1 positiven Zellen.....	73
3.6	Isolation der Stamm- und Vorläuferzellen des Darmepithels mit MACS	74
3.7	Etablierung eines Organkulturmodells	75
3.7.1	Das organotypische Gewebekulturmodell von adultem, murinem Colon.....	75
3.7.2	Die dreidimensionale Schnittkultur von fötalem, murinem Colon...	82

3.7.3	Implantation von Zellen des Darmepithels in die dreidimensionale Schnittkultur von fötalem, murinem Colon.....	87
4	Diskussion	89
5	Zusammenfassung.....	97
6	Literatur.....	99
7	Anhang.....	111
7.1	Abbildungsverzeichnis	111
7.2	Abkürzungsverzeichnis	113
7.3	Danksagung.....	115
7.4	Lebenslauf	116
7.5	Veröffentlichungen	117
7.5.1	Publikationen	117
7.5.2	Patent	117

1 Einleitung

Die intestinale Schleimhaut gehört zu den regenerativsten Geweben des erwachsenen Menschen; innerhalb von drei bis sechs Tagen erneuert sich der überwiegende Teil des Darmepithels. Die dafür erforderlichen Stammzellen des einschichtigen zylindrischen Epithels befinden sich in Vertiefungen des Darmepithels, den so genannten Krypten. Diese Stammzellen teilen sich fortlaufend und generieren proliferierende Vorläuferzellen, die sich auf dem Weg zur Mucosaoberfläche zu unterschiedlich spezialisierten Zellen ausdifferenzieren.

Obwohl diese Stammzellen eine ausgeprägte Regenerationsleistung aufweisen, gibt es über die Mechanismen ihrer Regulation im Vergleich zu anderen adulten Stammzellen, wie aus dem ZNS oder dem hämatopoetischen System, wenig Erkenntnisse. Dabei bieten die epithelialen Stammzellen der Darmmucosa gegenüber vielen anderen Stammzellkompartimenten den Vorteil, dass die Lage der Stammzellen in etwa bekannt ist. Dies macht sie besonders für die Identifikation neuer Stammzellmarker interessant, da potentielle Marker histologisch der Stammzellnische zugeordnet werden können. Im Falle eines Oberflächenmarkers bestünde somit die Möglichkeit, die Stammzellen zu isolieren und näher zu charakterisieren.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Identifikation neuer Marker, die die Isolation und dadurch auch die Charakterisierung der Zellen der Stammzellnische ermöglichen. Weiterhin soll ein 3D-Kulturmodell etabliert werden, um die Stammzellen sowie die Stammzellnische näher untersuchen zu können. Es wird zum besseren Verständnis in den nächsten Abschnitten auf die Anatomie, die Stammzellnische, die bekannten Regulationsmechanismen der Stammzellen sowie auf 3D-Kulturmodelle eingegangen. Die hierbei aufgeführten allgemeinen Informationen wurden aus folgenden Lehrbüchern und Reviewartikeln entnommen: Kedinger et al. 1987, Junqueira et al. 1996, Bach, et al. 2000, Alberts et al. 2002, Kaeffler 2002, Marshman et al. 2002, Benninghoff und Drenckhahn 2003, de Santa Barbara et al. 2003, Brittan und Wright 2004, Rizvi und Wong 2005, Simon-Assmann et al. 2007 und Scoville et al. 2008.

1.1 Aufbau und Funktion des Gastrointestinaltraktes

Als Verdauungsapparat werden die Organe zusammengefasst, die dem Transport, der Verdauung und der Aufnahme der Nahrung dienen und dadurch die darin enthaltenen Nährstoffe für den Körper verwertbar machen (Abbildung 1).

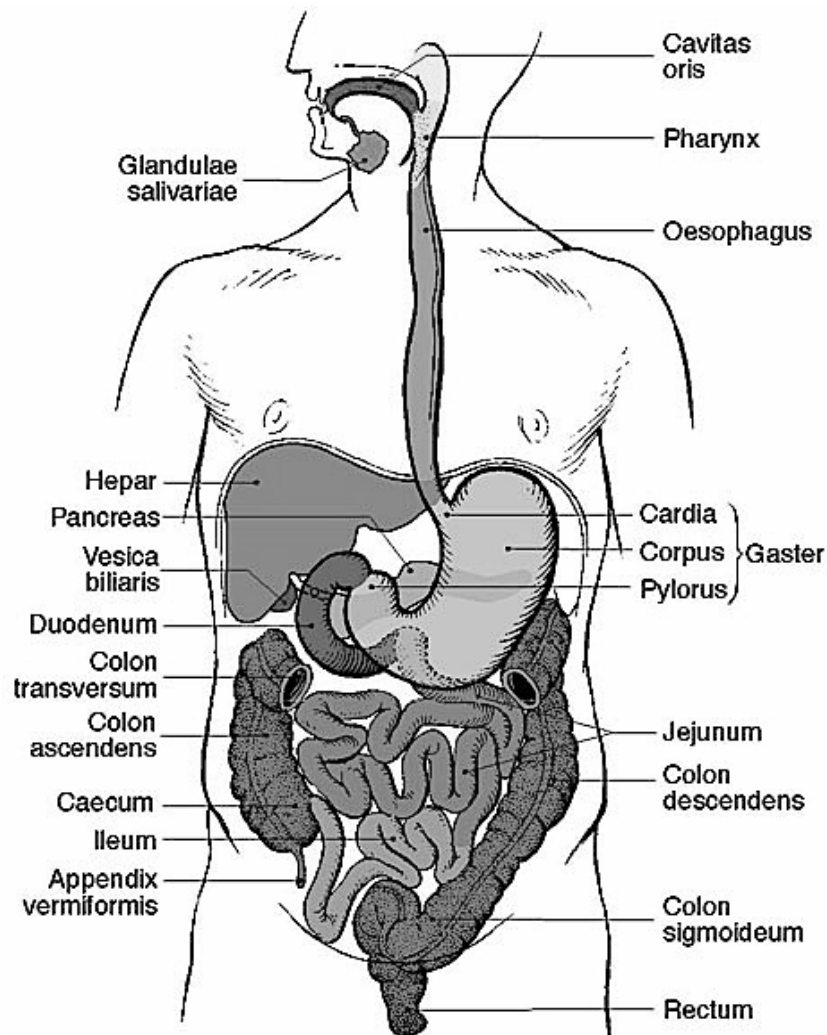


Abbildung 1: Schema zur Gliederung des Verdauungssystems des Menschen. Das Colon transversum wurde nicht dargestellt (Benninghoff und Drenckhahn, 2003).

Der Darm dient der Spaltung und Resorption von Nahrungsbestandteilen sowie der Sekretion. Er weist daher eine starke Oberflächenvergrößerung auf, die durch Auffaltungen, Zotten (Villi), Krypten und Mikrovilli erreicht wird. Weiterhin ist der Darm ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Hier befinden sich Lymphozyten und lymphatische Gewebe in besonderen Organisationsformen, die unter dem Oberbegriff des Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT, gut-associated lymphoid tissue) zusammengefasst werden.

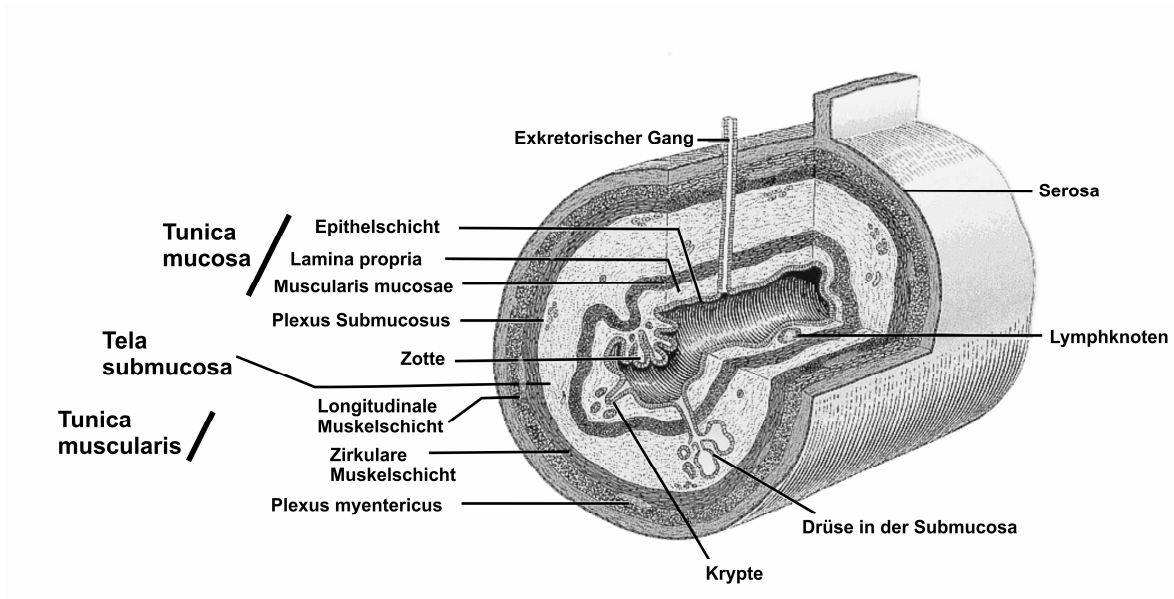


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Verdauungskanal (nach Junqueira und Carneiro, 2004).

Der Darm besteht aus dem Dünndarm (Intestinum tenue) und dem Dickdarm (Intestinum crassum) und gliedert sich in folgende Abschnitte:

Intestinum tenue (Dünndarm): Duodenum (Zwölffingerdarm)
Jejunum (Leerdarm)
Ileum (Krummdarm)

Intestinum crassum (Dickdarm): Caecum (Blinddarm)
Appendix vermiformis (Wurmfortsatz)
Colon (Grimmdarm), bestehend aus C. ascendens, C. transversum, C. descendens und C. sigmoideum, Rectum (Mastdarm)

Im Querschnitt betrachtet ist die Darmwand aus vier Hauptschichten und weiteren Unterschichten aufgebaut (Abbildung 2, Abbildung 3):

Hauptschicht	Unterschicht
Tunica mucosa	Epithelium (Einschichtiges Säulenepithel)
	Lamina propria mucosae (Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen, Lymphfollikeln und freien Abwehrzellen)
	Lamina muscularis mucosae (glatte Muskelzellschicht zur Feineinstellung der Schleimhaut)
Tela submucosa	Submucosa (Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen, Lymphfollikeln und dem Plexus submucosus)
Tunica muscularis	Stratum circulare (Ringmuskelschicht)
	Plexus myentericus (Nervenplexus)
	Stratum longitudinale (Längsmuskelschicht)
Tunica Serosa (intraperitoneal) bzw. Adventitia (extraperitoneal)	Serosaepithel (einschichtiges Plattenepithel)
	Lamina propria serosae (Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven)
	Tela subserosa (Bindegewebe)

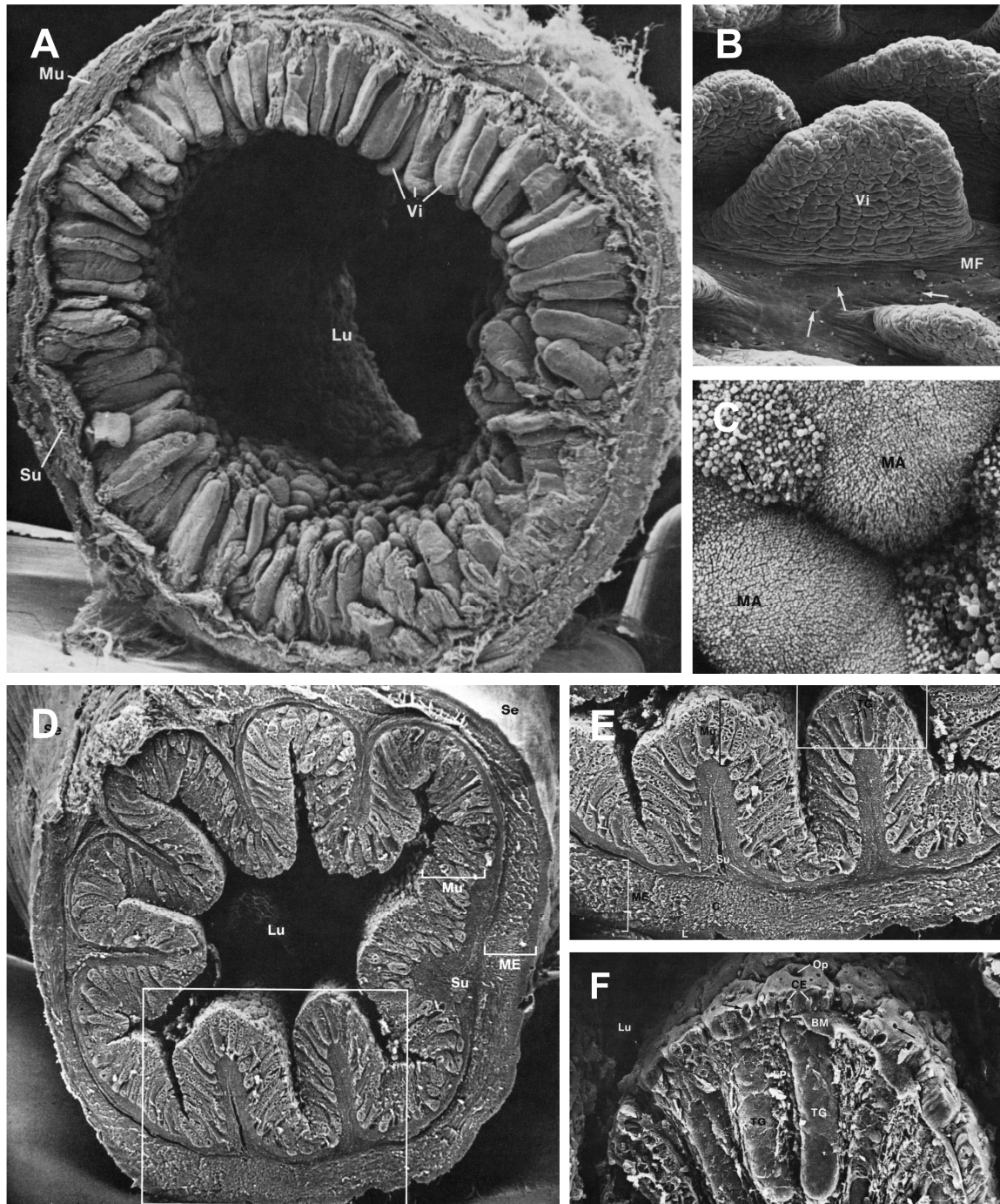


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Dünndarms (A – C) und Dickdarms (D – F) der Ratte. **A** Übersicht des Dünndarms; es sind die Muskelschichten (Mu), die Submucosa (Su) und die in das Lumen (Lu) ragende Villi (Vi) zu erkennen. **B** Zungenförmige Villi (Vi) des Jejunum (MF – Oberfläche der Mucosa). Die Pfeile weisen auf die Öffnungen der intestinalen Drüsen. **C** Mikrovilli auf der Oberfläche von Enterozyten (MA). **D** Übersicht des Dickdarms bestehend aus Serosa (Se), Muskelschichten (ME), Submucosa (Su) und Mucosa (Mu, Lu = Lumen). **E** Vergrößerung aus **D**. Die Muskularis externa (ME) kann in Längsmuskulatur (L) und Ringmuskulatur (C) unterschieden werden. In der Mucosa (Mu) sind Kryptenstrukturen des Epithels (TG) zu erkennen. **F** Vergrößerung aus **E**. Die Krypten des Darmepithels (TG), sowie deren Öffnung (Op) in Richtung Darmlumen (Lu) sind deutlich zu erkennen. Im Darmepithel befinden sich Becherzellen (Pfeile) und Enterozyten (CE). Diese liegen einer Basallamina (BM) auf (Kessel und Kardon 1979).

1.2 Zelltypen des Darmschleimhautepithels

Die epitheliale Auskleidung der Schleimhaut leitet sich aus der Gastrulation von dem inneren Keimblatt, dem Entoderm ab. Dieses bildet Epithelien aus dem Verdauungstrakt, Pankreas, Thymus, Atmungstrakt, der Leber, Schilddrüse, Harnblase und Harnröhre.

Die Zellen des Darmepithels entstehen aus Stammzellen, die sich im unteren Bereich der Darmkrypten befinden. Der am meisten vorkommende Zelltyp ist der Enterozyt (Saumzelle). Zwischen diesen Enterozyten liegen Becherzellen und enteroendokrine Zellen. Im Dünndarm findet man zusätzlich im Kryptengrund Paneth'sche Körnerzellen. Als weiterer Zelltyp zeigen sich im Darmepithel intraepitheliale Immunzellen, die jedoch nicht aus den Stammzellen des Epithels hervorgehen, sondern aktiv in das Epithel einwandern (Abbildung 4).

Enterozyten (Saumzellen)

Die Enterozyten sind die am meisten vorkommenden Zellen des Darmepithels (Abbildung 3F). Im Duodenum besteht das Epithel zu 90 % aus Enterozyten, im Jejunum, Ileum und Colon zu 80 %. Ihre Hauptaufgabe besteht aus der Resorption von Nährstoffen und Wasser. Sie weisen einen aus Mikrovilli (Abbildung 3C) bestehenden Bürstensaum auf und sind durch ein Schlussleistennetz miteinander verbunden. Durch Einbaustudien mit radioaktiv markiertem Thymidin in Mäusen konnte eine Fluktuation der Enterozyten innerhalb von drei Tagen festgestellt werden (Cheng und Leblond 1974, Karam 1999).

Becherzellen

Ein weiterer Zelltyp des Darmepithels sind die Becherzellen (Abbildung 3F). Sie weisen keinen Bürstensaum auf und besitzen eine Vakuole, die mit Mucinen gefüllt ist. Sie sind je nach Darmregion in unterschiedlicher Menge vertreten, ihre Anzahl nimmt vom Dünndarm zum Dickdarm stark zu (4,2 % im Duodenum, 6,3 % im Jejunum, 11,9 % im Ileum und 16 % im Colon). Die Lebensdauer beträgt ähnlich wie bei Enterozyten in Mäusen drei Tage (Cheng 1974, Karam 1999).

Enteroendokrine Zellen

Weiterhin kommen im Darmepithel enteroendokrine Zellen vor (ca. 1 % des Darmepithels; Cheng und Leblond 1974), die Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren sekretieren und je nach ihrer Lage in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die enteroendokrinen Zellen des offenen Typs erreichen die Lichtung des Magen-Darm-Kanals und tragen auf der luminalen Oberfläche Rezeptoren, mit denen sie den Chymus überprüfen und mit entsprechender Hormonausschüttung reagieren können. Enteroendokrine Zellen des geschlossenen Typs sind vollständig von nicht endokrinen Zellen umschlossen und reagieren auf physikalische Reize oder chemische Veränderungen im Blut und im Gewebe. Sie können auch auf nervösem Wege gereizt werden. Die Sekretion der enteroendokrinen Zellen kann endokrin oder parakrin erfolgen. Die parakrine Freisetzung geschieht meist über Zellen des geschlossenen Typs (Rehfeld 1998). Die Lebensdauer der enteroendokrinen Zellen zeigt große Differenzen. Sie unterscheidet sich in den verschiedenen Bereichen des Darmes, enteroendokrine Zellen besitzen eine Lebensdauer von vier Tagen im Dünndarm und 23 Tage im Colon descendens (Cheng und Leblond 1974, Tsubouchi und Leblond 1979).

Paneth'sche Körnerzellen

Im Dünndarm sind am Kryptengrund Paneth'sche Körnerzellen (3 – 7 % des Darmepithels) zu finden (Cheng 1974). Ihre Aufgabe ist bisher noch nicht ganz klar. Es ist möglich, dass diese Zellen unter anderem einen Einfluss auf die Stammzellen besitzen, da sie eine Reihe von Faktoren (z. B. Epidermaler Wachstumsfaktor oder Tumornekrosisfaktor- α , (TNF- α)) freisetzen, die für die Regulation epithelialer Proliferation und Differenzierung bekannt sind (Poulsen et al. 1986, Tan et al. 1993). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die Paneth'schen Körnerzellen die Mikrobiozönose der Darmflora regulieren. Sie schütten dafür Faktoren wie z. B. Lysozyme oder Cryptidine aus. Paneth'sche Körnerzellen sind außerdem in der Lage Bakterien zu phagozytieren (Peeters und Vantrappen 1975, Ouellette und Selsted 1996). Der Turnover von Paneth'schen Körnerzellen bei Mäusen liegt bei 15 Tagen (Cheng 1974).

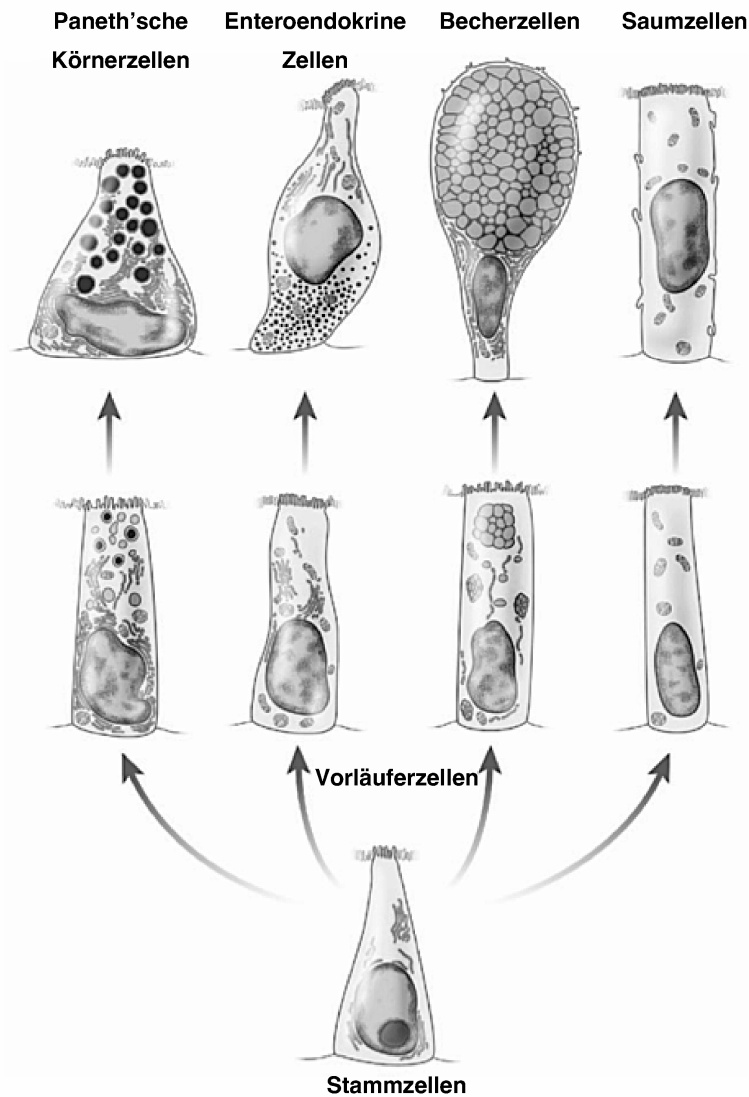


Abbildung 4: Die intestinale Stammzelle und deren Differenzierung. Die Stammzellen des Darmepithels sind in der Lage sich im Dünndarm in vier und im Dickdarm in drei verschiedene Hauptzelltypen zu differenzieren. Die Paneth'schen Körnerzellen sind dünndarmspezifische Zellen (Barker und Clevers 2007).

Immunzellen

Im Darmepithel finden sich ebenfalls Zellen des Immunsystems. Zu ihnen gehören die intraepithelialen Lymphozyten und M-Zellen. Ihre Aufgabe besteht darin, einen Kontakt von Antigenen mit den lymphatischen Zellen der Peyerschen Plaques (Ileum, Appendix vermiformis) und Solitärfollikeln (Colon, Rektum) zu vermitteln. Das mucosale Immunsystem besitzt nicht nur eine wichtige Rolle bei der bakteriellen und viralen Immunabwehr, sondern ist auch bei intestinalen Autoimmunerkrankungen, wie bei der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn beteiligt.

Stammzellen

Der überwiegende Teil des Oberflächenepithels des Darms erneuert sich alle drei bis sechs Tage, wobei differenzierte Epithelzellen in der Regel durch Apoptose degenerieren. Neue Epithelzellen werden von Stammzellen, die sich im unteren Bereich der Darmkrypten befinden, nachgebildet. Es wird davon ausgegangen, dass sich zwischen vier und sechs Stammzellen pro Krypte befinden, aus denen langlebige epitheliale Vorläuferzellen hervorgehen, die zeitbegrenzt eine hohe Zellteilungsrate aufweisen (Bjerknes und Cheng, 1999, Marshman et al. 2002). Die Teilung der Stammzelle erfolgt in der Regel asymmetrisch, d. h. es entsteht eine Stammzelle und eine Tochterzelle, die sich in eine der vier möglichen Zellen differenziert. Bei einer intestinalen Verletzung können sich die Stammzellen auch symmetrisch teilen, um einen neuen Stammzellpool aufzubauen (Booth und Potten 2000).

1.3 Die Stammzellnische und die Lage der epithelialen Stammzelle

Die epitheliale Stammzellnische beschreibt ein komplexes Mikroenvironment, in dem die Position, Anzahl und Differenzierungsprozesse der Stammzelle reguliert werden. Stammzellen von schnell erneuernden Epithelien verbleiben in definierten Regionen (Abbildung 5). Die Stammzellen teilen sich im Vergleich zu den stark proliferierenden Vorläuferzellen nur sehr langsam. Sie führen dabei eine asymmetrische Zellteilung durch, aus der wieder eine Stammzelle und eine epitheliale Vorläuferzelle hervorgehen. Diese Tochterzellen werden als transient amplifizierende Population (transient amplifying population, TA) bezeichnet (Abbildung 6). Marshman und Mitarbeiter vermuten hierarchische Zonen in den Krypten, wodurch Zellen, die diese Zonen durchlaufen sich zu Beginn zwar noch teilen, aber ihre Stammzeleigenschaften aufgrund der Umgebung verlieren. Falls jedoch eine Krypte beschädigt wird, sind die TA-Zellen in der Lage sich zu Stammzellen zu dedifferenzieren (Marshman et al. 2002). Die Hemmung und Aktivierung des Stammzellkompartiments und die Richtung der Differenzierung (Determination) hängen außerdem entscheidend von Wachstumsfaktoren, Interaktionen zwischen benachbarten Zellen und der extrazellulären Matrix im Mikrokompartment ab. Weiterhin scheinen nicht nur Zellen der Mucosa bei der

Differenzierung der Epithelzellen eine Rolle zu spielen, sondern es gibt einige Hinweise, dass Neurone (Bjerknes und Cheng, 2001) und Gliazellen (Neunlist et al. 2007) und unter dem Epithel liegende Myofibroblasten (Finch et al. 1995, Fritsch et al. 1997) die Proliferation und Determination der epithelialen Stammzellen beeinflussen können.

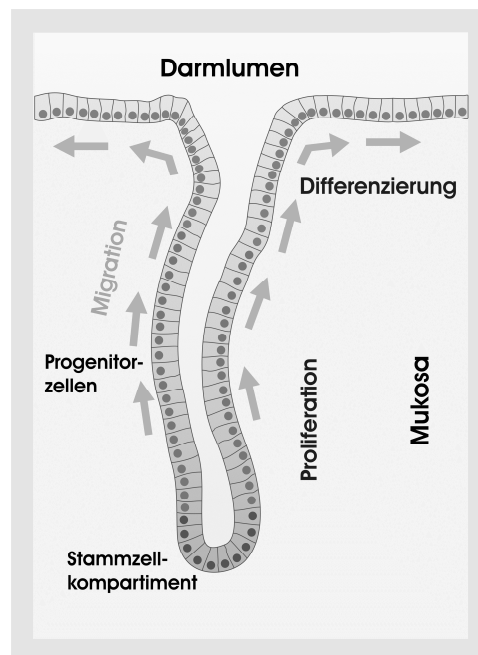


Abbildung 5: Schematische Darstellung des epithelialen Stammzellkompartiments in der Mukosa des Colons.

Über die exakte Lage der Stammzellen im Dünndarm ist man sich noch nicht im Klaren. Es bestehen zurzeit zwei Ansichten bezüglich der Stammzellposition im Dünndarm. Potten konnte in einer Studie durch eine langzeitige, radioaktive Bestrahlung von Mäusen zeigen, dass sich an Position (4+) von Krypten, direkt über den Paneth'schen Körnerzellen, sich langsam teilende strahlungssensitive Zellen befinden, die auch dort verbleiben (Potten 1977). Andere gehen davon aus, dass so genannte säulenförmige Zellen an der Kryptenbasis im Dünndarm (crypt base columnar cells, CBC), die sich zwischen den Paneth'schen Körnerzellen befinden und sich schnell teilen, die wahren Stammzellen des Dünndarmepithels sind (Abbildung 6; Bjerknes und Cheng 1981, Bjerknes und Cheng 1981/2, Barker et al. 2007). Die Stammzellen des Colons werden im Kryptengrund vermutet (Abbildung 5, Brittan und Wright 2003).

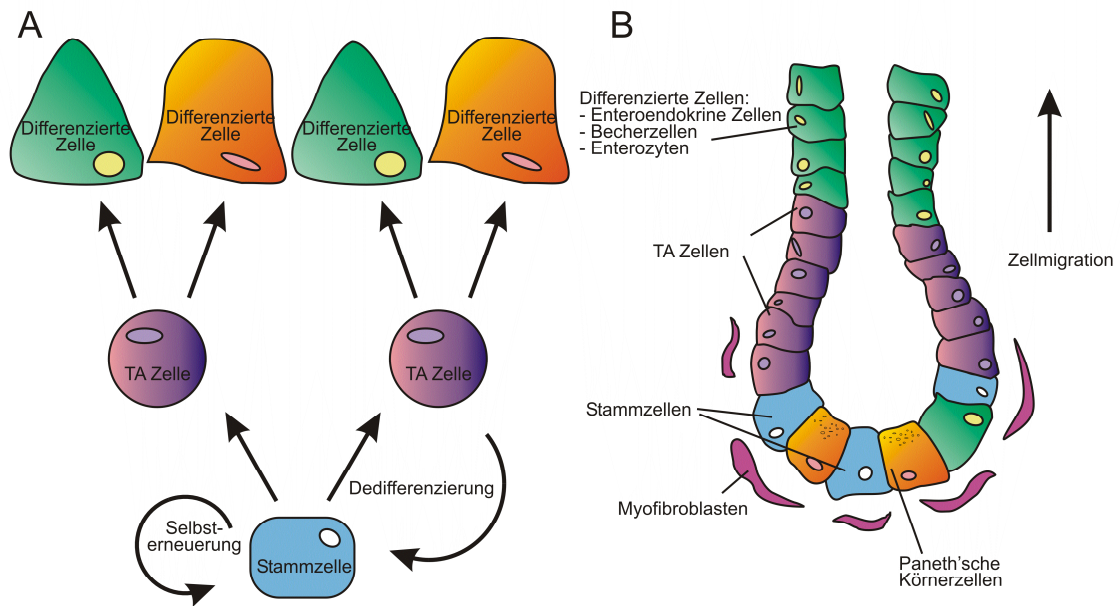


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Stammzellhierarchie epithelialer Stammzellen. **A:** Die Stammzelle (blau) verbleibt in ihrer Stammzellnische und teilt sich asymmetrisch. Aus ihr gehen eine neue Stammzelle sowie eine Progenitorzelle hervor. Diese Progenitorzelle führt weitere Zellteilungen durch und bildet eine so genannte transient amplifizierende Population (violett, TA). Deren Nachkommen (grün und gelb) differenzieren sich zu den verschiedenen Epithelzelltypen aus. **B:** Stammzellhierarchie in der Dünndarmkrypte. Die Lage der Stammzellen (blau) wird kontrovers diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass sie sich entweder über den Paneth'schen Körnerzellen (gelb) und/oder am Kryptengrund befinden. Es wurden daher beide Positionen in der Abbildung berücksichtigt. Die direkten Tochterzellen sind von den Stammzellen nicht unterscheidbar. Zellen in der TA-Region migrieren während ihrer Differenzierung in Richtung Darmlumen. Nur die Paneth'schen Körnerzellen und manche Enteroendokrine Zellen migrieren im Falle von höher liegenden Stammzellen zur Kryptenbasis (nach Rizvi und Wong, 2005).

Scoville und Mitarbeiter versuchten diese kontroversen Beobachtungen aufeinander abzugleichen und stellten drei mögliche Hypothesen auf:

1. CBC-Zellen sind die echten Stammzellen des Darmepithels, während die (4+)-Stammzellen eine Ausnahmeerscheinung aufgrund des Langzeitversuches darstellen könnten.
2. Die (4+)-Zellen sind die echten Stammzellen des Darmepithels und nicht die CBC-Zellen. Die 2007 veröffentlichte Arbeit von Barker und Mitarbeiter unterstützt diese Theorie jedoch nicht.
3. Sowohl CBC-Zellen als auch (4+)-Zellen sind die Stammzellen, es würden somit zwei Subpopulationen existieren. Die durch Langzeitmarkierung identifizierten (4+)-Zellen könnten sich in einem anhaltenden, stillen Zustand befinden während die CBC-Zellen eine Stammzellpopulation repräsentieren, die in einem aktiven Zustand ist und dadurch schnell auf stimulierende Signale von angrenzenden Zellen reagieren könnte. Eine

Aktivierung der (4+)-Zellen könnte durch Stress oder Verletzungen hervorgerufen werden. Es bestünde also die Möglichkeit, dass in schnell erneuernden adulten Geweben zwei Stammzellpositionen koexistieren und koordiniert zusammenarbeiten (Scoville et al. 2008).

1.4 Molekulare Regulation der intestinalen Stammzellen

Um die Stammzellen des Darmes verstehen und manipulieren zu können, müssen Signalwege identifiziert werden, die die Stammzellen indirekt über die Stammzellnische oder direkt über die Proliferation regulieren. Wichtige Signalwege, die an dieser Regulation des intestinalen Stammzellkompartiments beteiligt sind, sind die Wnt-, Notch-, Hedgehog- und BMP-Signalwege. Sie werden im Folgenden näher erläutert.

1.4.1 Der Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung und hat einen großen Einfluss auf die Regulation von Stammzellen und deren Differenzierung (z. B. Wodarz und Nusse 1998, Smalley und Dale 1999, Yamaguchi 2001). In Bezug auf Stammzellen sind der Wnt Signalweg und dessen Downstream gelegene Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf (Lymphoid enhancer factor-1/T-cell factor) bei der Erhaltung der Stammzellnische stark involviert.

Das sekretierte Wnt-Protein bindet an zwei Rezeptoren, Frizzled und Lrp (Low density lipoprotein-related receptor protein). Die Aktivierung der Signalkaskade resultiert in der Hemmung einer Kinase, so dass β -Catenin im Cytoplasma angereichert wird und in den Zellkern wandert, um dort mit den Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf zu interagieren und die Zielgene zu transkribieren. Ist kein Wnt an den Rezeptor gebunden, wird β -Catenin phosphoryliert und abgebaut.

Der Wnt-Signalweg spielt auch im Darm bei der Zellproliferation und -differenzierung eine entscheidende Rolle. Expressionsstudien in der Maus zeigten, dass viele Komponenten des Wnt-Signalwegs im Darmepithel und dessen Umgebung exprimiert werden (Abbildung 7, Gregorieff et al. 2005). Mutationen im APC-Gen (adenomatous polyposis coli), das im Komplex mit der Kinase für den

Abbau von β -Catenin verantwortlich ist, können zu einer erhöhten β -Catenin Konzentration führen, wodurch die Transkription der Zielgene verstärkt wird. Diese Mutationen resultieren in einer adenomatösen Polyposis. Es entstehen Polypen im Dickdarm, die im weiteren Verlauf entarten und zu Darmkrebs führen können (Grodin et al. 1991, I. Nishisho et al. 1991, Reya und Clevers 2005).

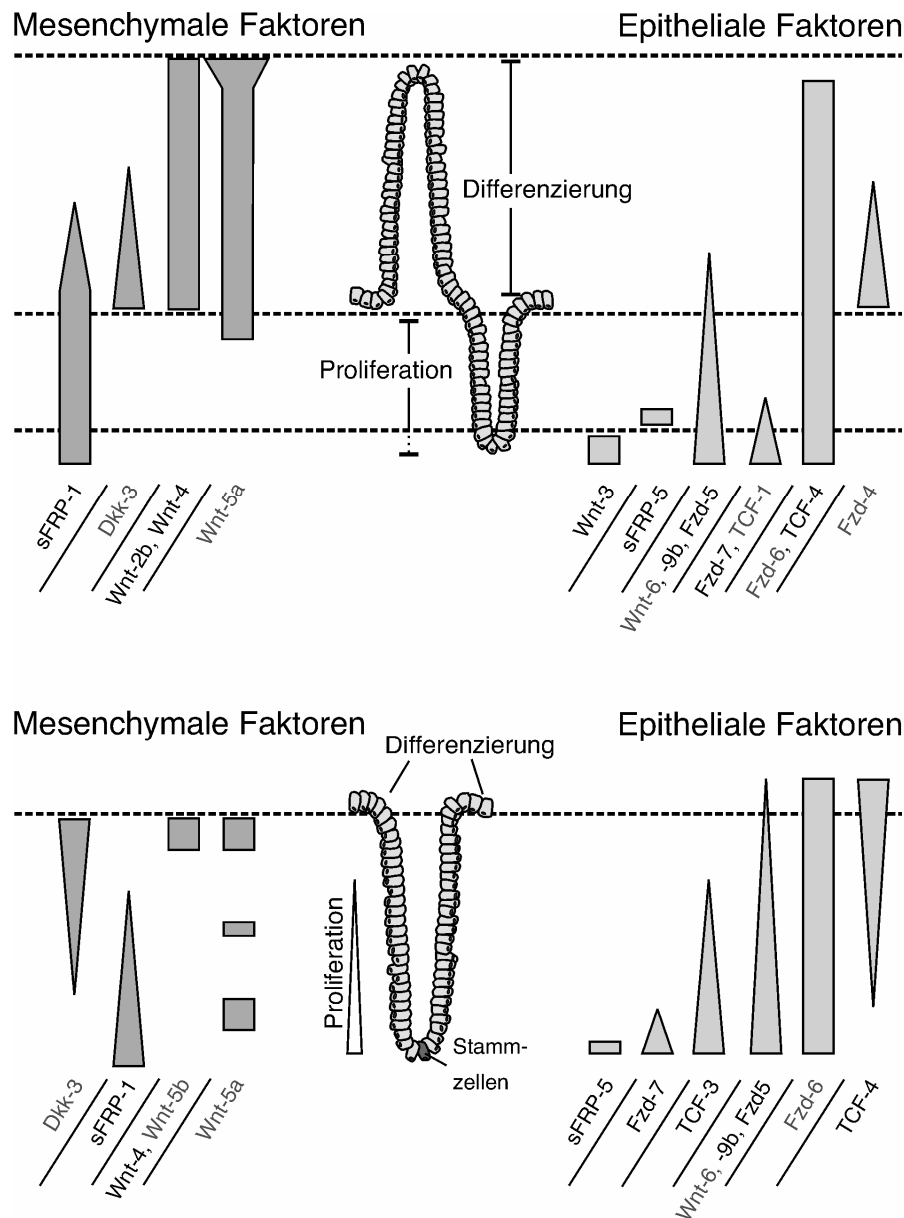


Abbildung 7: Expressionsmuster von Wnt-Signalkomponenten im adulten Darm der Maus. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Dün- und Dickdarms. Das Epithel ist in gelb dargestellt. Es wurden nur Expressionsmuster von Wnt-Signalkomponenten dargestellt, die für die epitheliale Proliferation/Differenzierung relevant sind. Dkk3, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6, TCF-1, Fzd-6 und Fzd-4 sind in Adenomen hochreguliert. Andere Faktoren wie WIF, Dkk-2 und LEF werden im gesunden Darm nicht jedoch in Adenomen stark exprimiert (Gregorieff et al., 2005).

Während der Embryonalentwicklung spielt der Wnt-Signalweg im Darm ebenfalls eine große Rolle. Dies wurde in Mäusen nachgewiesen, deren Tcf-4 Gen in einem Exon, das eine DNA-Bindungssequenz kodiert, unterbrochen wurde. Homozygote Tcf4-Mutanten entwickelten sich normal bis Embryonaltag 14,5. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch Villis und Krypten weniger stark ausgeprägt als im Wildtyp und es konnten keine proliferierenden Zellen im Darmepithel detektiert werden (Korinek et al. 1998). Dies weist darauf hin, dass der Wnt-Signalweg für die Erhaltung der Proliferation in der Stammzellnische entscheidend ist. Ähnliches konnte durch eine ektopische (nicht am physiologischen Ort befindliche) Expression des Wnt-Inhibitors Dickkopf1 (Dkk1) unter der Kontrolle des Villin-Gens im Darmepithel gezeigt werden. Homozygot genveränderte Mäuse wiesen weniger Kryptenstrukturen im Darm auf und zeigten ebenfalls eine stark reduzierte Proliferation im Darmepithel (Pinto et al. 2003). Sie sind jedoch im Gegensatz zu den Tcf-4 Knockout-Mäusen lebensfähig.

Der Wnt-Signalweg könnte auch eine wichtige Rolle darin spielen, die Zelldifferenzierung einzuleiten. In der Colonkarzinomzelllinie Caco-2 konnte gezeigt werden, dass bei differenzierten Zellen der Wnt/ β -Catenin Signalweg herunterreguliert ist (Mariadson et al. 2001). Ein weiteres Beispiel ist c-MYC, ein Zielgen des Wnt-Signalwegs. C-MYC ist ein Protoonkogen, das in vielen Krebsarten überexprimiert wird. Es steigert die Zellproliferation und hemmt die Expression des Zellzyklusinhibitors p21, der unter anderem in differenzierten Colonepithelzellen vorkommt (van de Wetering et al. 2002).

Der Wnt-Signalweg spielt außerdem eine Rolle bei der Migration in der Stammzellnische. Knockout Mäuse für den EphB3-Rezeptor, der ein Wnt-Zielgen ist, scheinen einen normalen Darm zu entwickeln, die Paneth'schen Körnerzellen befinden sich jedoch nicht nur im Kryptengrund des Dünndarms, sondern lassen sich bei den Mutanten auch entlang der Krypten bis in die Villi nachweisen (Batlle et al. 2002).

1.4.2 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg dient dazu, molekulare Unterschiede zwischen benachbarten Zellen zu verstärken. Die Entscheidungsfindung der Zellen erfolgt nach dem Prinzip der lateralen Inhibition (Müller und Hassel 2003). Bei dieser Regulation findet ein wechselseitiger Austausch von Signalen bei benachbarten Zellen statt. Die Signalmoleküle, die bei der lateralen Inhibition in der Zellmembran verankert sind und eine wichtige Rolle spielen sind Notch und Delta. Dabei wirkt Delta als hemmendes Signal und Notch als Rezeptor für dieses Signal. Das bekannteste Beispiel für diese Art von Regulation ist die Bildung von Neuroblasten bzw. Epidermiszellen aus Neuroektodermzellen (Müller und Hassel 2003). Ein Zielgen der Notch-Signalkaskade ist HES (hairy/enhancer of split), das wiederum die Expression von verschiedenen Helix-Loop-Helix-Proteinen, wie z. B. von Math-1 und Neurogenin-3 inhibiert (Alberts et al. 2002, Müller und Hassel 2003).

Immunhistochemische Untersuchungen im Darm der Maus zeigten, dass vier Notch-Rezeptoren, fünf Liganden und vier HES-Gene exprimiert werden (Schröder und Gossler 2002). *Hes-1*^{-/-} Knockout-Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl von sekretorischen Zellen im Darm auf (Jensen et al. 2000). Entsprechend dazu besitzen *Math-1*^{-/-} Tiere keine Paneth'schen Körnerzellen, Becherzellen und Enteroendokrine Zellen (Abbildung 8, Yang et al. 2001). In homozygoten Neurogenin-3 Knockout-Mäusen lassen sich ebenfalls keine enteroendokrinen Zellen detektieren; Paneth'sche Körnerzellen und Becherzellen sind jedoch vorhanden (Jenny et al. 2002). Dies weist darauf hin, dass weitere Faktoren für die Differenzierung in Richtung dieser sekretorischen Zellen notwendig sind. Maus-Chimären mit einer Negativmutation in *Rac1* (*Rac1* gehört zur Rho GTPase Familie von GTP-Bindungsproteinen) weisen in entsprechenden Krypten und Villi keine Becher- und Paneth'schen Körnerzellen auf (Stappenbeck und Gordon 2000). Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass der Notch-Signalweg einen Einfluss auf die zelluläre Differenzierung des Darmepithels besitzt.

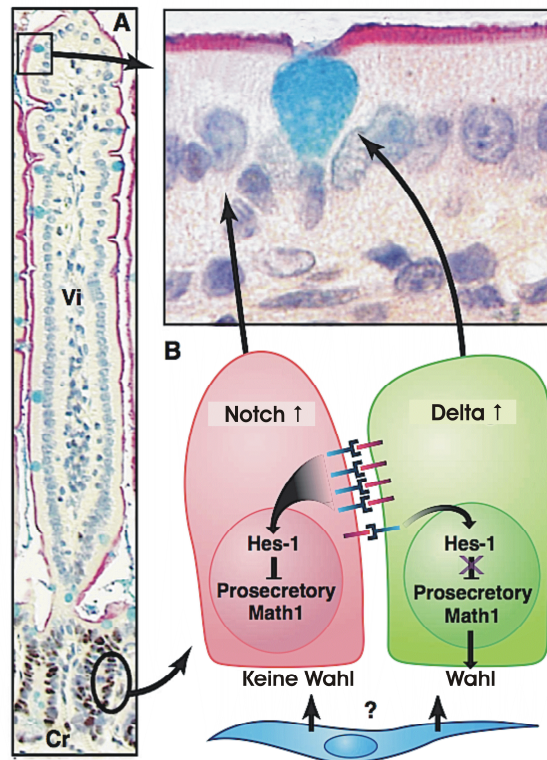


Abbildung 8: Der Notch-Signalweg im Darm. **A:** Histologischer Schnitt eines Dünndarms einer adulten Maus. Die Vorläuferzellen (braun) wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen Cyclin PCNA (proliferating cell nuclear antigen) nachgewiesen. Die Enterozyten exprimieren die alkalische Phosphatase (rot), Becherzellen sekretieren Mucine (blau). **B:** Math1, eine Komponente des Notch-Signalwegs, beeinflusst die Differenzierung der intestinalen Epithelzellen. In Vorläuferzellen, die Notch stark exprimieren, wird der Transkriptionsfaktor Hes1 angeschaltet, wodurch die Expression von Math1 und anderen „prosekretorischen“ Genen blockiert wird. Wird der Transkriptionsfaktor Math1 exprimiert, steht den Vorläuferzellen die Wahl zu Becherzellen, enteroendokrinen Zellen oder Paneth'schen Körnerzellen zu differenzieren (van den Brink et al., 2001).

1.4.3 Der Hedgehog-Signalweg

Hedgehog-Proteine sind wie die Wnt-Proteine Signalmoleküle, die sekretiert werden und lokal in vielen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Sie spielen im Embryo beispielsweise eine Rolle bei der Links-Rechts-Asymmetrie, in der anterior-posterioren Musterung der Schwanzknospe und bei der Bildung des Neuralrohrs. Veränderungen im Hedgehog-Signalweg können sich daher während der Entwicklung letal auswirken. In Wirbeltieren sind drei verschiedene Hedgehog-Gene bekannt: *sonic*, *desert* und *indian hedgehog*. Der entsprechende Rezeptor ist Patched, ein transmembranes Molekül (Alberts et al. 2002).

Die Expression von Sonic Hedgehog und Indian Hedgehog während der gastrointestinalen Entwicklung vermittelt das anterior-posteriore sowie radiale Patterning und die epitheliale Proliferation und Differenzierung von Stammzellen.

Knockout-Mäuse für Sonic Hedgehog und Indian Hedgehog sind nicht lebensfähig. Der Darm dieser Mäuse weist starke Veränderungen auf. Bei Sonic Hedgehog-Mutanten zeigt sich eine Stenose im Zwölffingerdarm und eine gestörte Innervierung des Darms. Bei Indian Hedgehog-Mutanten proliferieren und differenzieren die epithelialen Stammzellen in einem geringeren Maße und der Dickdarm ist, wie bei der Hirschsprungkrankheit, aganglionär. Die Tiere weisen außerdem eine reduzierte Villusgröße und eine geringere Zellproliferation in der Stammzellnische auf (Ramalho-Santos et al. 2000). Versuche, bei denen Hedgehog-Antikörper embryonalen und postnatalen Mäusen verabreicht wurden, führten zu Fehlorganisationen im Dünndarm mit vakuolisiertem Epithel und einer gestörten Fettresorption (Wang et al. 2002). Der Hedgehog-Signalweg spielt jedoch nicht nur in der Morphogenese des Darms eine große Rolle, sondern auch in der epithelialen Differenzierung. Eine Inhibition des Indian Hedgehog-Signalwegs durch Injektion von Hedgehog-Inhibitoren resultiert in einer abnormalen Expression von Villin und Karboanhydrase IV, typische Marker für differenzierte Enterozyten. Dies könnte darauf hinweisen, dass der Hedgehog-Signalweg einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Enterozyten besitzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Indian Hedgehog Expression bei homozygoten Knockout-Mäusen zu einer erhöhten Proliferation im Darmepithel sowie zu Dysplasien führt. Es wird daher vermutet, dass Indian Hedgehog die Differenzierung reguliert, über den Hedgehog-Signalweg den β -Catenin-TCF-Signalweg hemmt und dadurch die Expression der Wnt-Zielgene reduziert (van den Brink et al. 2004).

1.4.4 Der BMP-Signalweg

BMPs (bone morphogenic protein) bilden die größte Familie der TGF- β Superfamilie (transforming growth factor). Diese Proteine werden größtenteils sekretiert und wirken hormonell oder als lokale Mediatoren, um weit reichende biologische Funktionen zu regulieren. Sie sind während der Entwicklung an Musterbildungen beteiligt, beeinflussen die Proliferation, Differenzierung, Bildung extrazellulärer Matrix und den Zelltod und sind bei Regenerationsprozessen von Geweben involviert (Alberts et al. 2002).

Im Bereich des Darmes gibt es bezüglich des BMP-Signalwegs ebenfalls einige Erkenntnisse. Ein genomisches Sequenzieren des Rezeptors BMPR1A bei Patienten mit juveniler Polyposis zeigte, dass diese Personen eine nonsense Mutation aufweisen. Es kann daher vermutet werden, dass auch der BMP-Signalweg eine entscheidende Rolle in den epithelialen Stammzellen des Darmes spielt (Howe et al. 2001). Heterozygote Knockout-Mäuse für Smad4 zeigen ein ähnliches Krankheitsbild. Sie entwickeln nach einem Jahr inflammatorische Polypen im Magen und Zwölffingerdarm aufgrund von *loss of heterozygosity* in den epithelialen Zellen (Takaku et al. 1999). Transgene Mäuse, die unter der Kontrolle eines Villin-Promotors Noggin exprimieren, bilden untypisch im rechten Winkel zur Zottenachse Krypten. Sie erscheinen normal und exprimieren verschiedene Wnt-Zielgene, die auch in gewöhnlichen Krypten auftreten (Haramis et al. 2004). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Bmp-4 in der Bildung der intestinalen Stammzellnische beteiligt ist.

Fkh6 (**forkhead homolog 6**) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der an der Stammzellregulation im Darm mitzuwirken scheint. Homozygote knockout-Mäuse für diesen Faktor, der im Mesoderm benachbart zum Epithel exprimiert wird, zeigen starke morphologische Veränderungen im Magen, Duodenum und Jejunum. Die Villi sind stark verkürzt und zeigen zusätzlich proliferierende Zellen in den Intervillusregionen. Es lassen sich alle vier Epithelzelltypen nachweisen, die Anzahl der Becherzellen ist jedoch im Gegensatz zum Wildtyp erhöht. Dies deutet darauf hin, dass Fkh6 einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen hat (Kaestner et al. 1997).

1.5 Stammzellmarker

Eine generelle Problematik in der Stammzellforschung ist häufig das Fehlen von spezifischen Markern, welche eine Charakterisierung und in einem weiteren Schritt die zielgerichtete Isolation der Stammzellen ermöglicht. Mögliche Kandidaten wären spezifische Rezeptoren, die bei der Regulation der Stammzellen des Darmepithels, über die im vorherigen Kapitel beschriebenen Signalwege, eine Rolle spielen.

2007 konnte ein Markergen (*Lgr5*, leucine-rich repeat-containing, **G** protein-coupled receptor) identifiziert werden, das gezielt in den säulenförmigen Zellen

der Kryptenbasis zwischen den Paneth'schen Körnerzellen im Dünndarm exprimiert wird (Barker et al. 2007). Lgr5 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit einer Leucin-reichen extrazellulären Domäne und ist ein Zielgen des Wnt-Signalwegs. Es konnten auch Lgr5-positive Zellen im Kryptengrund vom Colon festgestellt werden. An der Basis der Magendrösen wurden ebenfalls Lgr5-positive Zellen detektiert, die Stammzellen des Magenepithels befinden sich jedoch im Isthmusbereich, d. h. in der sich verengenden Region der Magendrösen, die im oberen Drittel lokalisiert ist (Benninghoff und Drenckhahn 2003).

Weiterhin ist in der Literatur ein Faktor im Darm beschrieben (Musashi-1), der in Stammzellen aus dem basalen Teil der Colorkrypte exprimiert wird (Nishimura et al. 2003, Potten et al. 2003). Musashi-1 ist ein RNA-bindendes Protein und wird mit der asymmetrischen Zellteilung in neuronalen Progenitorzellen des ZNS in Verbindung gebracht (Okano et al. 2005). Es wird angenommen, dass Musashi-1 die Notch-Signalkaskade durch Inhibierung der Translation von Numb, das in den neuronalen Vorläuferzellen asymmetrisch verteilt ist, beeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben Musashi-1 auch Hes1, ein Transkriptionsfaktor den Musashi-1 reguliert, in diesen Zellen exprimiert wird (Kayahara et al. 2003).

Einen weiteren Stammzellmarker könnte das β 1-Integrin darstellen, welches besonders stark von proliferierenden Zellen der Colorkrypte exprimiert wird (Fujimoto et al 2002). Integrine sind transmembranäre Adhäsionsmoleküle, die für einen starken Zell-Zell-Kontakt sorgen und dadurch Zellen im Gewebe festhalten (Evans und Calderwood 2007).

Die Expression der repulsiven Guidancemoleküle RGMa und RGMb konnte 2005 in der Proliferationszone des Dünndarms von Mäusen nachgewiesen werden. Sowohl die Stammzellen als auch die Paneth'schen Körnerzellen zeigten ein positives Signal bei der *in situ* Hybridisierung (Metzger et al. 2005). Bisher ist jedoch kein geeigneter Antikörper gegen dieses Oberflächenantigen vorhanden, der eine Isolation dieser Zellen ermöglichen würde.

Voraussetzung für eine gezielte Isolation von intestinalen Vorläufer- und Stammzellen des Darmepithels ist also zum einen ein Oberflächen-Epitop, das von den entsprechenden Zellen exprimiert wird und ein geeigneter Antikörper, der dieses Epitop an lebenden Zellen erkennt. Die Proteine Lgr5, RGM und β 1-Integrin bilden erste Ansatzpunkte, um gezielt Darmstammzellen mit Hilfe von

Antikörpern, die gegen diese Proteine gerichtet sind, identifizieren und isolieren zu können.

1.6 Dreidimensionale Gewebekulturen des Darmes

Bei der überwiegenden Anzahl der Darmepithel-Zellkultursysteme werden Monolayerkulturen mit primären oder immortalisierten intestinalen Zellen verwendet (gesehen von Simon-Assmann et al. 2007). Die Isolation der Zellen erfolgt durch Gewebeexplantation, mechanische Isolation durch Sektion und Trituration, durch Verwendung von so genannten Chelatbildnern (EDTA; Ethylendiamintetraessigsäure) oder proteolytischen Enzymen (Collagenase-Dipase, Trypsin oder Thermolysin). Zuvor wird meist die Mucosa mechanisch von dem Darm abgelöst (Kaeffer 2002). Der große Nachteil bei der Verwendung von primären Darmepithelmonolayerkulturen besteht in ihrer limitierten Kultivierungsdauer. Im Gegensatz zu anderen epithelialen Kulturen wie Keratinozyten, Urothel oder Mundschleimhautepithel kann die Proliferation der Darmschleimhautepithelzellen in der Zellkultur nicht aufrechterhalten werden. Die primären Stamm- und Vorläuferzellen des Darmepithels leiten in der Zellkultur ähnlich wie *in vivo* nach wenigen Tagen die Differenzierung und nachfolgend ihre Apoptose ein. Die Bedingungen zur Aufrechterhaltung des Stammzellkompartiments *in vivo* sind zurzeit noch unbekannt und können daher nicht auf die Zellkultur übertragen werden. Bei der Verwendung von fötalem Material finden die Differenzierungsprozesse in der Zellkultur verzögert statt. Aber auch hier können langfristig die Zellen *in vitro* nicht expandiert werden. Aufgrund dieser Problematik werden viele Untersuchungen, die sich mit intestinalen Schleimhautepithelzellen befassen, mit immortalisierten Zelllinien durchgeführt, damit aber auch in Kauf genommen, dass diese Zellen im Vergleich zu primären Zellen unphysiologischere Eigenschaften aufweisen.

Die Funktionalität des Epithels hängt von verschiedenen Faktoren ab: z. B. von der dreidimensionalen Organisation des Gewebeverbands, von extrazellulären Matrix Proteinen, vom epithelialen Zell-Zell-Kontakt und von der epithelialen-mesenchymalen Zell-Zell-Kommunikation.

Dreidimensionale Primärkulturen bieten daher die Möglichkeit komplexe, zelluläre Interaktionen von verschiedenen Zellpopulationen der Darmmucosa zu

analysieren. Sie werden beispielsweise für Studien im Bereich der Physiologie, Pharmakologie, Entwicklungsbiologie, Tumorforschung und Mikrobiologie eingesetzt (Trier 1976, Howdle 1983).

Langzeit, dreidimensionale Zell- und Gewebekulturen des Darmes verschiedener Spezies werden seit den 70er Jahren vor allem in der Grundlagenforschung genutzt. Es sind verschiedene Kultivierungsverfahren beschrieben worden. Beispielsweise werden die Explantate an der Luft-Medium-Grenze kultiviert. Das Medium befeuchtet lediglich das Gewebe, so dass ein Kontakt mit der Gasphase möglich ist, ohne dass die Kulturen austrocknen (Kedinger et al. 1987). Um dies zu ermöglichen, werden als Träger z. B. Linsenpapier oder Membranen verwendet (Ménard und Arsenault 1987). Die Medienzusammensetzung variiert in jeder Studie. Es werden meistens Antibiotika, L-Glutamin, Seren sowie Wachstumsfaktoren (epidermaler Wachstumsfaktor; EGF) und Hormone (Insulin, Glukokortikoide, Dexamethason) zugesetzt (Kaeffer 2002). Diese komplexen *in vitro* Modelle werden zurzeit in Kombination mit neuen analytischen Methoden wieder entdeckt und spielen eine wachsende Rolle in der intestinalen Forschung (Abud et al. 2005, Quinlan et al. 2006).

1.7 Aufgabenstellung

Die Isolation von epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Darm ist ein wichtiger methodischer Baustein zur Generierung neuer Darmschleimhaut im Bereich der Regenerativen Medizin mittels Techniken des Tissue Engineering. Ein weit größeres Potential könnte im möglichen Transdifferenzierungspotential intestinaler Stammzellen liegen. Aus der Entwicklungsbiologie ist bekannt, dass sich aus dem Vorderdarm die Leberanlage, das Pankreas und die Lunge entwickeln. Isolierte Stammzellen könnten sich möglicherweise unter Einsatz geeigneter Wachstumsfaktoren in Hepatozyten, Pankreaszellen und Lungenepithelzellen differenzieren. Dies würde neue Zelltherapieverfahren bei der Behandlung von geschädigten entodermalen Geweben ermöglichen.

Weiterhin könnte eine Isolation dieser Stammzellen die Möglichkeit bieten, grundsätzliche Mechanismen dieser Zellen zu untersuchen.

Voraussetzung für eine gezielte Isolation von intestinalen Vorläufer- und Stammzellen des Darmepithels ist jedoch ein geeigneter Antikörper, der ein Oberflächenepitop an lebenden Zellen erkennt. Ziel dieser Doktorarbeit war daher die Identifizierung, Charakterisierung und Isolierung von entodermalen Stammzellen aus Kolonkrypten. Um dieses zu erreichen, sollten folgende Teilschritte bearbeitet werden:

1. Eine Charakterisierung von humanem Darmgewebe mit histologischen Färbemethoden.
2. Eine systematische Charakterisierung des Stammzellkompartiments mit verschiedenen Stammzellmarkern aus dem hämatopoetischen und mesenchymalen System.
3. Zellanreicherung von entodermalen Stamm- und Vorläuferzellen mit MACS (Magnetic Cell Sorting) bzw. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).
4. Die Etablierung einer organotypischen Gewebekultur des Darmes für eine Charakterisierung der zuvor isolierten Darmstammzellen *in vitro*.
5. Eine umfangreiche Analyse des Differenzierungspotentials im Gewebekulturmodell und im Tiermodell (Hühnerembryo und Nacktmaus).

2 Material und Methoden

2.1 Zell- und Gewebematerial

Murines Gewebe

Für die organotypische Gewebekultur wurde fötales (Stadium E18 bis E20) und adultes Colon von C57BL/6 Mäusen verwendet. Die Organentnahme erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die entsprechende Tierversuchsanzeige wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

Humanes Gewebe

Die humanen Gewebeproben stammten aus Resektionen bei erwachsenen Patienten, die aufgrund eines Karzinoms oder einer Sigmadivertikulitis operiert wurden. Juveniles Gewebe stammte von Kindern, die aufgrund einer Hirschsprung-Erkrankung oder Atresie operiert wurden oder eine Rückverlagerung des Anus praeter bekamen. Das Gewebe wurde gemäß den Richtlinien von der Ethikkommission genehmigt.

Zelllinien

Die Zelllinie Caco-2/TC7 wurde für die FACS-Analyse, für die Immunhistochemie und für *in vitro* Untersuchungen verwendet. Caco-2 Zellen entstanden aus humanen Colon-Adenokarzinomzellen und wurden bis zu Passage 40 für die Experimente kultiviert.

2.2 Isolation von primären Darmepithelzellen

Epithelzellen des Darmes wurden ausschließlich von humanem Gewebe isoliert. Der Transport des Gewebes aus dem OP-Bereich zum Zellkulturlabor erfolgte in Hanks' Balanced Salt Solution ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (HBSS, PAA, Pasching, Österreich), versetzt mit Penecillin (100 U/ml, PAA), Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PAA) und Metronidazol, (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) auf Eis. Die Präparation des Darmes wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Darm in frisches HBSS überführt und anschließend die Mucosa von den übrigen Gewebeschichten vorsichtig mit einer Pinzette, unter Verwendung einer Stereolupe, isoliert.

Anschließend wurde durch Absaugen mit einer 1 ml Pipette der von den Becherzellen produzierte Mucus mechanisch entfernt und die gereinigte Mucosa zur Isolation des Darmepithels im Falle von juvenilem Gewebe für ca. 15 Minuten in einer 2 mM EDTA-Lösung (Roth) in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Mucosa in ein Falcontube in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ überführt und über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe (ST5, Neolab, Heidelberg) bei einer Frequenz von 20 pro Minute geschüttelt. Die Krypten des Epithels konnten dann am nächsten Morgen mit Hilfe einer 1 ml Pipette aus der Lamina Propria gespült werden. Bei adultem Gewebe ließen sich die Darmkrypten nach einer 30minütigen Inkubation in der 2 mM EDTA-Lösung (in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) herausspülen. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, die Krypten mit 0,05 % Thermolysin in HEPES-Puffer zu isolieren. Mit dieser Methode zeigen die isolierten Zellen eine bessere Vitalität. Nachfolgende Analysen ergaben, dass die Oberflächenantigene der Zellen durch die enzymatische Behandlung abgebaut wurden.

Zur Erhaltung einer Einzelzellsuspension wurden zunächst die isolierten Krypten mittels zweier Zentrifugationsschritte zweimalig mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 20 g, die zweite bei 200 g in einer Tischzentrifuge (Modell 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend erfolgte die enzymatische Zellvereinzelnung der aufgereinigten Krypten. Diese wurde entweder mit einer Papainlösung (0,02 % Papain (Sigma, Frickenhausen, Deutschland) und 5 mM L-Cystein (Sigma) in HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) bei 37 °C für 1 h (juveniles Gewebe) bzw. 3 h (adultes Gewebe) oder mit einer Collagenase-Dispase-Lösung (750 U/ml Collagenase XI (Sigma) und 250 mg/ml Dispase (Roche, Mannheim, Deutschland) in HBSS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) bei 37 °C für 1 h durchgeführt. Während dieser Inkubationszeit wurde das Epithel durch mehrmaliges Trituieren mit einer abgeflamten Stangenpipette oder einer abgeflamten 1 ml Pipettenspitze homogenisiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und abschließend über einen 40 µm Zellsieb gegeben. Das aufgefangene Zellfiltrat wurde für die nachfolgenden Experimente verwendet.

HEPES-Puffer:

- 6,7 mM KCl (Roth)
- 147 mM NaCl (Merck)
- 10 mM HEPES (Sigma)
- 1 mM CaCl₂-Dihydrat (Sigma)
- pH auf 7,4 einstellen.
- steril filtrieren (Millex GP, 0,22 µm, Millipore).

2.3 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden in Sicherheitsstufe 1 Laboratorien unter sterilen Bedingungen, unter Verwendung von Multiwellplatten oder T-Flasks (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), durchgeführt. Die Inkubation der Zellen und Gewebe erfolgte in einem Inkubator mit 95 % Feuchtigkeit und 5 % CO₂ bei 37 °C. Ein Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt.

2.3.1 Gewebekulturmodell

Zur Etablierung der Gewebekulturen wurde muriner Colon präpariert. Bei adulten Tieren wurde der Darm der Länge nach geöffnet, gereinigt und mit dem Skalpell in 2 mm² große Stücke geschnitten. Gewebekulturen aus dem Dickdarm fötaler Mäuse (E18) wurden mit Hilfe eines McIlwain Tissue Choppers (Campden Instruments, Loughborough, UK) hergestellt. Die Gewebeschnitte (Slices) wurden senkrecht zum Darmrohr mit einer Dicke von 200 µm geschnitten. Die Präparation erfolgte in kaltem HBSS mit Ca²⁺/Mg²⁺ (PAA), versetzt mit Penicillin, Streptomycin und Metronidazol. Die präparierten Kulturen wurden anschließend auf unbeschichtete Membraneinsätze (Millipore CM, 0.4 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, Deutschland) transferiert, die jeweils in die Vertiefung einer 6-well Platte überführt wurden. Jedes well enthielt 800 µl Organkulturmedium. Die Gewebekulturen wurden bis zu zwei Wochen kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Gewebekulturmedium:

- 45 % (v/v) HEPES buffered (25 mM) DMEM low Glucose (PAA)
- 45 % (v/v) Ham's F12 (PAA)
- 10 % (v/v) adultes Pferdeserum (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 100 U/ml Penicillin (PAA)
- 100 µg/ml Streptomycin (PAA)
- 2 mM L-Glutamin (PAA)
- 1:100 Insulin-Transferrin-Selenium-X-Supplement (Invitrogen)
- 1 mg/ml Albumax (Invitrogen)
- 1 µM Hydrokortison (Sigma)
- 14,3 nM Glukagon (Sigma)
- 1 nM 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin (Sigma)
- 200 µM Askorbat-2-Phosphat (Sigma)
- 20 µM Linolsäure (Sigma)
- 10 nM Östradiol (Sigma)
- 5 ng/ml (embryonale Kulturen) bzw. 50 ng/ml (adulte Kulturen) keratinocyte growth factor (KGF; Sigma)

2.3.2 Zellkultur, Caco-2 Zelllinie

Die Caco-2 Zelllinie, eine humane Colonkarzinomzelllinie, wurde für die FACS-Analyse und zur Evaluierung des Organkulturmodells verwendet. Um einen Stock an niedrigen Passagen zu erhalten, wurde die Zelllinie zunächst vermehrt und in speziellen Einfriergefäßen (neoLab, Heidelberg, Deutschland) mit Einfriermedium kryokonserviert.

Die Zellen konnten durch einmaliges Spülen mit PBS und anschließendem Inkubieren für ca. fünf Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg/ml/0,22 mg/ml; PAA) abgelöst werden. Das Splitten der Zellen wurde in einem Verhältnis von 1:10 durchgeführt.

Caco-2 Zellkultur-Medium:

- DMEM Medium, high Glucose (PAA)
- 10 % (v/v) Fötale Bovines Serum (FBS; Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

Einfrriermedium zur Kryonkonservierung:

- DMEM Medium, high Glucose
- 20 % (v/v) FBS
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

2.4 Pharmakologische Behandlung der adulten Organkultur und der Mäuse mit Dexamethason

Die SGK1 Expression wurde durch die Behandlung von adulten Mäusen und der Gewebekultur mit Dexamethason analysiert. Den Tieren wurde eine Dexamethasonphosphat-dinatrium Lösung (gelöst in 0,9 % Saline, Sigma) mit 10 µg/g Körpergewicht für 8 h injiziert. Als Kontrolle wurde den Mäusen 0,9 %ige Saline verabreicht. Die adulten Organkulturen wurden 14 Tage nach Kultivierung *in vitro* für 8 h mit 100 nM Dexamethason behandelt. Abschließend wurden die Gewebe in TissueTek eingefroren und 10 µm dicke Kryostatschnitte für die *in situ* Hybridisierung angefertigt.

2.5 Infektionsexperimente mit *Candida albicans*

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten *Candida* Stämme waren *Candida* 14 (klinisches Isolat SC5314) und *Candida* 34 (*cph1::hisG/cph1::hisG, efg1::hisG/efg1::hisG::URA3::hisG*; Dieterich et al. 2002). Die Stämme wurden bei 30 °C über Nacht in YPD Medium mit 2 % (v/w) Glukose (BD, Heidelberg, Deutschland), angeimpft von einer YPD-Platte, kultiviert. Für die Infektions-

experimente wurden jegliche Antibiotika entfernt. Es wurden 1000 Zellen in 1 μ l YPD Medium mit 0,1 mM Uridin auf die bereits 10 d kultivierten Gewebekulturen pipettiert. Nach 8 bzw. 24 h wurden die Kulturen mit 4 % (v/w) PFA (2.6.1) fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die *Candida*-Färbung wurde die Grocottfärbung (2.9.3) auf 5 μ m dicken Paraffinschnitten durchgeführt.

YPD (Yeast/Pepton/Dextrose) Medium:

- 10 g/l Hefeextrakt (Roth)
- 20 g/l Baktopepton (BD)
- 0,1 mM Uridin (Roth)
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 6,5 einstellen.
- Autoklavieren.
- für Plattenkulturen wird 20 g/l Agar (Roth) zugegeben.

2.6 Durchflusszytometrie

Das Akronym FACS (**F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting), welches häufig synonym zu Durchflusszytometrie verwendet wird, ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD). Das Prinzip der FACS-Analyse beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens einer mit Fluorochromen markierten Zelle, die einen Laserstrahl passiert. Es werden in Lösung befindliche Zellen über eine Kapillare angesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und durch Fluorochrom markierte Antikörper Fluoreszenzimpulse, wodurch man unterschiedlich Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Dieses Streulicht besteht zum einen aus dem Vorwärtsstreulicht FSC (**F**orward **S**catter), das durch die Beugung des Lichts hervorgerufen wird und als Maß für die Zellgröße dient, und dem Seitwärtsstreulicht SSC (**S**ide **S**catter), das durch die Brechung des Lichts entsteht und die Granularität der Zellen bestimmt. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch eine Inkubation der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Propidiumiodid für Zellzyklusanalyse oder lebend-tot-Diskriminierung) bzw. mit

Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenmerkmale gerichtet und mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen verbunden sind.

2.6.1 FACS-Analyse mit Antikörperfärbung

Es wurden Antikörperfärbungen an der Caco-2 Zelllinie und primär isolierten Epithelzellen des Darmes durchgeführt und anschließend per FACS analysiert. Für die Messung wurde ein FACSCanto II (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Durchführung:

- ◆ Blockierung von je 10^6 Zellen mit 20 μ l Gamunex 10 % (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland; 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt) für 10 Minuten auf Eis.
- ◆ Verdünnung der blockierten Zellen auf 10^5 Zellen pro 50 μ l mit FACS-Puffer.
- ◆ Inkubation von je 10^5 Zellen mit 25 μ l Antikörperüberstand in einem FACS-Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD) für 15 Minuten auf Eis.
- ◆ Waschen der Zellen durch Auffüllen der FACS-Röhrchen mit FACS-Puffer und Zentrifugation für 7 Minuten bei 300 g.
- ◆ Inkubation mit 10 μ l Sekundärantikörper pro 10^5 Zellen 15 min auf Eis. Die Antikörper (Anti-Mouse-PE, Anti-Mouse-FITC; DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) werden 1:15 mit FACS-Puffer verdünnt.
- ◆ Waschen der Zellen durch Auffüllen der FACS-Röhrchen mit FACS-Puffer und Zentrifugation für 7 Minuten bei 300 g.
- ◆ Eventuell Zellen in 1 % (v/w) Paraformaldehyd (PFA) aufnehmen und über einen 25 μ m Zellsieb geben, anschließend Messung durchführen. Für eine PI-Färbung werden die Zellen mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol fixiert.

FACS-Puffer:

- PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA)
- 0,01 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

4 % PFA:

- 100 ml 10x PBS
- 800 ml ddH₂O
- auf 60 °C erhitzen.
- 40 g PFA (Sigma) und 1 – 2 ml 10 M NaOH unter dem Abzug zugeben.
- pH auf 7,4 einstellen.
- mit ddH₂O auf 1 l auffüllen.
- filtrieren und bei 4 °C lagern (bei – 20 °C länger e Lagerung möglich).

10x PBS:

- 1,37 M NaCl
- 27 mM KCl
- 15 mM KH₂PO₄ (Roth)
- 117 mM NaH₂PO₄ (Merck)
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 7,4 einstellen.
- vor Gebrauch 1:10 mit ddH₂O verdünnen und pH-Wert überprüfen.

2.6.2 Zellzyklusanalyse

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, den Zellzyklus innerhalb einer Population darzustellen. Der für die Zellzyklusanalyse am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Propidiumiodid (PI), ein interkalierend wirkendes Molekül, das an doppelsträngige DNA bindet. Da PI unspezifisch auch an doppelsträngige RNA bindet, ist es notwendig die Zellen vor der FACS-Analyse mit RNase zu behandeln um entsprechende Messfehler auszuschließen. Wird eine mit PI inkubierte Zellsuspension analysiert, ist es aufgrund des Zellzyklus-abhängigen DNA-Gehalts und der dadurch unterschiedlichen Fluoreszenzintensität möglich, die Zellen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen:

- G0/1-Phase
- S-Phase
- M-/G2-Phase

In dieser Arbeit wurde vor der Propidiumiodid-Färbung eine Antikörperfärbung wie oben beschrieben (2.6.1) durchgeführt.

Durchführung:

- ◆ Zellen mit eiskaltem 70 % EtOH bei 4 °C fixiert und bis zur PI-Färbung aufbewahren.
- ◆ Zellen waschen durch Auffüllen der FACS-Röhrchen mit FACS-Puffer und Zentrifugation für 7 Minuten bei 300 g.
- ◆ Inkubation der Zellen mit 50 µg/ml PI (Sigma) und 100 µg/ml RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- ◆ bei 4 °C im Dunkeln für 10 min.
- ◆ Messung durchführen.

2.7 Magnetic Cell Separation

Die **Magnetic Cell Separation** (MACS) dient der Sortierung von bestimmten Zellen aus einem Zellgemisch mit Hilfe von Antikörpern, die an Oberflächenproteine binden. Zur Durchführung werden die sich in einer Suspension befindenden Zellen mit so genannten *MicroBeads* inkubiert. Dabei handelt es sich um etwa 50 nm große Beads, die an Antikörper gebunden sind und aus mit Eisenoxid umgebenen Polysacchariden bestehen. Es kann entweder eine direkte Bindung, d. h. die *MicroBeads* sind direkt mit einem Primärantikörper gekoppelt, oder eine indirekte Bindung stattfinden, bei der ein Sekundärantikörper mit *MicroBeads* gekoppelt ist. Die Antikörper erkennen spezifische Oberflächenproteine und sorgen dadurch für die Bindung der *MicroBeads* an die gewünschte Zellpopulation. Beim Durchfluss durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, werden die mit den *MicroBeads* markierten Zellen zurückgehalten. Auf diese Weise erhält man beim Spülen der Säule nur unmarkierte Zellen. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes kann zudem auch die markierte Zellpopulation durch Spülen der Säule gewonnen werden.

Es wurden in dieser Arbeit von isolierten und vereinzelt Darmepithelzellen SSEA-1 positive Zellen mit der MACS-Methode sortiert. Die Überprüfung der MACS-Selektion erfolgte über eine anschließende FACS-Analyse.

Durchführung:

- ◆ Zellen mit einer Neubauer Zählkammer zählen und maximal 3×10^7 Zellen in einem 15 ml Tube zentrifugieren.
- ◆ Zellen in 500 μ l SSEA-1 Zellkulturüberstand aufnehmen und 5 min auf Eis inkubieren.
- ◆ Zellen in 6 ml MACS-Puffer aufnehmen, 10 min bei 300 g zentrifugieren.
- ◆ Überstand abnehmen und Zellen in 240 μ l MACS-Puffer resuspendieren.
- ◆ 60 μ l rat anti-mouse IgG1 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zugeben, gut mischen und 15 min auf Eis inkubieren.
- ◆ Falls anschließend eine FACS-Analyse durchgeführt werden soll: 20 μ l anti-mouse IgG1 PE direkt zugeben, gut mischen und weitere 5 min auf Eis inkubieren.
- ◆ Zellen in 6 ml MACS-Puffer aufnehmen, 10 min bei 300 g zentrifugieren.
- ◆ 500 μ l MACS-Puffer auf die Säule (*Large Cell Separation Columns*, Miltenyi Biotec) geben.
- ◆ Zellen in 500 μ l MACS-Puffer mit 1 mM DTT aufnehmen.
- ◆ Zellsieb (*Pre-Separation Filter*, Miltenyi Biotec) auf die Säule aufbringen.
- ◆ Zellen auf den Zellsieb/Säule geben.
- ◆ 2 – 3x 500 μ l MACS-Puffer zum Waschen auf die Säule geben, um nicht-markierte Zellen herauszuspülen.
- ◆ Säule entfernen und auf ein frisches 15 ml Tube geben.
- ◆ 1 ml MACS-Puffer auf die Säule geben und die positiv-markierten Zellen herausspülen.
- ◆ Die Separation der Zellen mit einer neuen Säule wiederholen, um eine bessere Reinheit zu erreichen.

MACS-Puffer:

- 0,01 mg/ml BSA (Roche)
- 2 mM EDTA
- in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ lösen.
- pH auf 7,2 einstellen.
- Im Ultraschallbad (ElmaS10, Elmasonic, Mörfelden-Walldorf) 30 min entgasen, auf Eis stellen.

2.8 *In vitro* Untersuchung der Epithelstammzellen

Die Stammzellen des Darmepithels wurden *in vitro*, durch Implantation in das embryonale Organkulturmodell untersucht. Dazu wurden ganze Krypten zentral in die fötale Schnittkultur implantiert. Die Organkulturen wurden dafür zunächst für einen Tag kultiviert. Anschließend erfolgte die Implantation mit Hilfe einer Mundpipette (WPI, Berlin, Deutschland). Die Krypten wurden direkt in die zentrale Öffnung der Organkultur gegeben. Die Organkulturen wurden bis zu zehn Tage weiter kultiviert, anschließend mit PFA (2.6.1) fixiert und histologisch ausgewertet.

2.9 Histochemie

Gewebe oder Organkulturen wurden mit Hämalaun/Eosin-, Alcianblau- und Grocott-Färbungen histochemisch gefärbt.

2.9.1 Hämalaun/Eosin-Färbung (HE)

Das Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff, der sich während der Färbung an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren anlagert. Die tiefblaue Färbung der Kerne wird durch Inkubation in Leitungswasser erreicht. Das wasserlösliche Eosin G ist ein rot-gelblicher Farbstoff, der negativ geladen ist und an positive Gruppen von beispielsweise Eiweißen bindet. Es erzeugt somit eine Plasmafärbung von Zellen.

In dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Gewebe zunächst je nach Größe für 1 – 4 h in 4 % (v/w) Paraformaldehyd (PFA; 2.6.1) fixiert und anschließend zur Entwässerung in ein Routinelabor gebracht. Nach erfolgter Einbettung in Paraffin wurden 5 µm dicke Schnitte an einem Mikrotom hergestellt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Da sich die Gewebeschnitte in Paraffin befanden wurde zuerst eine Entparaffinierung 20 min in Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer anschließend absteigenden Alkoholreihe (Xylol/EtOH 1:2, 100 % EtOH, 96 % (v/v) EtOH, 70 % (v/v) EtOH, 50 % (v/v) EtOH jeweils 5 min) vorgenommen. Danach erfolgte die Färbung des Gewebes mit einer Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland), die 1:2 mit ddH₂O verdünnt wurde. Das zu färbende Gewebe wurde 2 sec in der filtrierten Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Leitungswasser für 5 min gebläut und danach

5 min mit einer 0,5 % wässrigen Eosin G-Lösung (Merck) gefärbt. Nach erneutem Waschen mit ddH₂O und einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Hico-Mic (Hirtz & Co. Köln, Deutschland) eingedeckelt.

Beschichtung von Objektträgern mit Silan:

- Objektträger kurz in Aceton (Roth) tauchen.
- 10 min in einer 2 % Silan-Acetonlösung (Sigma) inkubieren.
- 2x kurz in ddH₂O waschen.
- Objektträger bei 60 °C trocknen.

2.9.2 Alcianblau Färbung

Die Alcianblau-Färbung dient dazu, saure Moleküle, im Darm das saure Mucin, anzufärben. Diese Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die wie in 2.9.1 beschrieben entparaffiniert und in ein wässriges Milieu gebracht wurden.

Durchführung:

- ◆ Schnitte in ddH₂O bringen.
- ◆ 20 min in Alcianblau inkubieren.
- ◆ In 3 % (v/v) Essigsäure spülen.
- ◆ 5 min unter fließendem Leitungswasser waschen.
- ◆ 5 min in ddH₂O spülen.
- ◆ Eventuell mit Hämalan färbem wie in 2.9.1 beschrieben.
- ◆ Aufsteigende Alkoholreihe und mit Hico-Mic eindeckeln.

Alcianblau:

- 1 g Alcianblau (Roth)
- 100 ml 3 % (v/v) Essigsäure
- pH auf 2,5 einstellen.

2.9.3 Grocott-Färbung

Bei der Grocott-Färbung werden Glykogen und Mucin, Bestandteile von Pilzen, histochemisch nachgewiesen.

Durchführung:

- ◆ Schnitte in ddH₂O bringen.
- ◆ 1 h Oxidation in Chromsäure-Lösung.
- ◆ Einige Sekunden in Leitungswasser waschen.
- ◆ 1 %ige (v/v) Natriumdisulfit-Lösung für 1 min zugeben (Entfernung der restlichen Chromsäure).
- ◆ Mehrmals mit ddH₂O spülen.
- ◆ 30 min bei 58 °C in Methenamin-Silbernitrat-Lösung inkubieren.
- ◆ Mehrmals mit ddH₂O spülen.
- ◆ 5 min in wässriger Goldchlorid-Lösung inkubieren.
- ◆ Mehrmals mit ddH₂O spülen.
- ◆ 3 min in 2 %iger (v/v) Natriumthiosulfat-Lösung inkubieren (Entfernung des restlichen nicht reduzierten Silbers).
- ◆ Mehrmals mit ddH₂O spülen.
- ◆ Gegenfärbung mit Lichtgrün für 1 min.
- ◆ Mehrmals mit ddH₂O spülen.
- ◆ Aufsteigende Alkoholreihe und mit Hico-Mic eindeckeln.

Chromsäure-Lösung:

- 500 mM CrO₃ (Merck)
- in ddH₂O lösen.

Natriumdisulfit-Lösung:

- 50 mM Na₂S₂O₅ (Merck)
- in ddH₂O lösen.

Methenamin-Silbernitrat-Stammlösung:

- 295 mM AgNO₃ (Merck)
- 215 mM (CH₂)₆N₄ (Merck)
- in ddH₂O lösen.
- Lagerung im Kühlschrank.

Methenamin-Silbernitrat Gebrauchslösung:

- 25 ml Methenamin-Silbernitrat-Stammlösung
- 25 ml ddH₂O
- 2 ml einer wässrigen 250 mM Di-Natriumtetraboratlösung (Merck)

Goldchlorid-Lösung:

- 2,5 mM AuCl₃•HCl (Merck)
- In ddH₂O lösen.

Natriumthiosulfat-Lösung:

- 125 mM Na₂S₂O₃
- in ddH₂O lösen.

Lichtgrün-Lösung:

- 1 g Lichtgrün (Serva)
- 100 ml ddH₂O
- 1 ml Essigsäure (Riedel-de Haën)

2.10 Immunhistochemie/Immuncytochemie

Bei der Immunhistochemie werden Proteine von in Paraffin eingebettetem Gewebe oder von kryokonserviertem Gewebe hergestellte Gewebeschnitte mit Hilfe von spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern visualisiert. Diese Antikörperfärbung kann auch an *in vitro* kultivierten Zellen (Immuncytochemie) oder z. B. ganzen Organkulturen (whole mount Immunfärbung) durchgeführt werden. Die Antikörperbindung kann entweder durch eine Substratumsetzung von z. B. Diaminobenzidin (DAB) unter Verwendung einer Peroxidase oder durch ein Fluorochrom visualisiert werden. Das zu

untersuchende Antigen kann mit Hilfe eines Enzym oder Fluorochrom gekoppelten Antikörpers direkt sichtbar gemacht werden. Meist wird jedoch die indirekte Methode angewandt, bei der ein spezifischer Primärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe gebracht und in einem zweiten Schritt ein Sekundärantikörper auf das Gewebe aufgetragen wird, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper kann mit einem Enzym bzw. Fluorochrom oder z. B. Biotin gekoppelt sein, wodurch zusätzlich eine Signalverstärkung über eine Avidin-Biotin-Bindung erreicht werden kann.

In dieser Arbeit wurden sowohl Paraffin- als auch Kryostatschnitte für die Immunhistochemie verwendet. Bei Paraffinschnitten musste beachtet werden, die Antigene des Gewebes zu demaskieren, um eine Bindung des Antikörpers zu ermöglichen. Die Demaskierung erfolgte entweder durch Kochen der Objektträger in Citratpuffer für 5 min und anschließendem Abkühlen auf Eis oder durch Inkubation in 1 mg/ml Pronase (Serva) in TBS-CaCl₂ für 5 min bei 37 °C.

Gewebe für Kryostatschnitte wurden unfixiert entweder in einer kryoprotektiven Matrix (Tissue-Tek; Sakura) oder direkt eingefroren, 10 µm dick an einem Kryostat geschnitten und auf silanisierte oder mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgezogen. Die Kryostatschnitte wurden anschließend mindestens 1 h getrocknet und danach 15 min mit 4 % (v/w) PFA (2.6.1) oder eiskaltem Aceton fixiert. Aceton fixierte Schnitte wurden nochmals getrocknet. *In vitro* kultivierte Zellen und Organkulturen für whole mount Färbungen wurden direkt mit 4 % (v/w) PFA (2.6.1) fixiert (15 min bzw. 1 h) und anschließend gefärbt. Es wurde die indirekte Färbemethode mit Signalverstärkung und Substratumsetzung sowie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern angewandt.

Zum Nachweis einer Proliferation von Zellen wurde diesen 10 µM 5-brom-2-desoxyuridin (BrdU; Roche), ein Thymidin-Analogon, für 1 h in den Zellkulturüberstand gegeben. BrdU wird in der Synthesephase des Zellzykluses anstatt von Thymidin in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch an BrdU binden, konnten anschließend die proliferierten Zellen nachgewiesen werden.

Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin:

- Poly-L-Lysin Stammlösung (Sigma) 1 : 10 mit ddH₂O verdünnen.
- Objektträger in die hergestellte Lösung tauchen.
- 2x kurz mit ddH₂O waschen.
- Objektträger bei 60 °C trocknen.

Citratpuffer:

- 100 mM Zitronensäuremonohydrat (Roth)
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 6,0 einstellen.

10x TBS:

- 250 mM Trizma base (Sigma)
- 1,4 M NaCl (Merck)
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 7,5 einstellen.
- vor Gebrauch 1:10 mit ddH₂O verdünnen.

10x TBS-CaCl₂:

- 34 mM CaCl₂ (Merck)
- in 10x TBS lösen.
- pH auf 7,5 einstellen.
- vor Gebrauch 1:10 mit ddH₂O verdünnen.

2.10.1 Immunhistochemie mit Substratumsetzung

Paraffinschnitte, Kryostatschnitte und Zellkulturen wurden mit der Immunhistochemie unter Verwendung eines Avidin-Biotin-Verstärkersystems gefärbt.

Durchführung:

- ◆ Trocknen (über Nacht) und Fixierung (15 min 4 % (v/w) PFA (2.6.1) oder eiskaltes Aceton mit anschließendem Trocknen) der Kryostatschnitte bzw. Entparaffinierung und absteigende Alkoholreihe von Paraffinschnitten.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS (2.10) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 (Roth) waschen.
- ◆ 15 min mit 3 % (v/v) H₂O₂ (Roth) in TBS die endogene Peroxidase blockieren.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Evtl. wie in 2.10 beschrieben Antigen demaskieren und erneut 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 (v/v) % Tween 20 waschen.
- ◆ 30 min mit 10 % (v/v) Schweineserum (Biochrom), 0,3 % (v/v) Triton X-100 (Roche) in Tris-BSA Puffer unspezifische Bindungen in einer feuchten Kammer blockieren.
- ◆ Serum auf Papiertuch abklopfen und Primärantikörper verdünnt in Tris-BSA auftragen, Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Es kann noch zusätzlich 0,1 % (v/v) Triton X-100 zugegeben werden, um eine stärkere Permeabilisierung zu erhalten.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Je 5 µl/ml Komponente A und B des AB-Komplex (Dako) in Tris-BSA verdünnen und 30 min bei RT inkubieren.
- ◆ Biotin-gelabelter Sekundärantikörper und 4 % (v/v) Schweineserum in Tris-BSA verdünnen und 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubieren. Evtl. 0,1 % (v/v) Triton X-100 zur Permeabilisierung zugeben.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Angesetzten AB-Komplex auf die Gewebeschnitte auftragen und 30 min inkubieren.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.

- ◆ DAB-Lösung ansetzen: 1 ml DAB-Stocklösung (100 mg/ml; Sigma) in 200 ml 1x Substratpuffer verdünnen und anschließend filtrieren. 66,6 μ l H_2O_2 zugeben und Gewebeschnitte schrittweise in der DAB-Lösung entwickeln.
- ◆ Kurz in ddH₂O waschen und Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol ziehen. Danach die Schnitte mit Hico-Mic eindecken.

Tris-BSA:

- 0,1 % Albumin Fraktion V (Roth) in 1x TBS lösen

10x Substratpuffer:

- 200 mM Zitronensäuremonohydrat (Roth)
- 1 M Imidazol (Merck)
- 1 M NaCl (Merck)
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 7,0 einstellen.

2.10.2 Immunhistochemie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Für die Immunhistochemie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurden Paraffinschnitte, Kryostatschnitte, Zell- und Organkulturen verwendet.

Durchführung:

- ◆ Die Gewebeschnitte werden wie in 2.9.1 beschrieben entparaffiniert oder fixiert.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS (2.10) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 30 min mit 10 % (v/v) Schweineserum (Biochrom), 0,3 % (v/v) Triton X-100 (Roche) in Tris-BSA Puffer (2.10.1) unspezifische Bindungen in einer feuchten Kammer blockieren.
- ◆ Serum auf Papiertuch abklopfen und Primärantikörper verdünnt in Tris-BSA auftragen, Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Es kann noch zusätzlich 0,1 % (v/v) Triton X-100 zugegeben werden, um eine stärkere Permeabilisierung zu erhalten.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper und 4 % (v/v) Schweineserum in Tris-BSA verdünnen und 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubieren.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 (v/v) % Tween 20 waschen.
- ◆ Für eine Kernfärbung 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Roth) Stocklösung (1mg/ml gelöst in ddH₂O) 1:1000 bzw. TO-PRO (Invitrogen) 1:300 mit Tris-BSA verdünnen und ca. 5 min bei RT auf den Schnitten inkubieren.
- ◆ Schnitte 3x 5 min in ddH₂O waschen, trocknen lassen und mit Kaiser-Gelatine (Merck) eindecken.

Bei Whole-mount Färbungen von Organkulturen wurde ein weiterer Permeabilisierungsschritt eingefügt. Dazu wurden die Kulturen vor der Blockierung für 1 h mit 1 % (v/v) Triton behandelt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für eine bessere Penetration über Nacht bei 4 °C.

2.10.3 BrdU-Labeling

Proliferierende Zellen können entweder durch eine immunhistochemische Färbung, unter Verwendung von spezifischen Antikörpern wie Ki-67, oder durch den Einbau von BrdU in die DNA mit anschließender Immunhistochemie, unter Verwendung eines gegen das BrdU gerichteten Antikörpers, nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden murine Gewebekulturen des Colons mit BrdU aufgeladen, anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet.

Durchführung:

- ◆ Zugabe von BrdU (BrdU Labeling and Detection Kit I, Roche), Endkonzentration: 10 µM.
- ◆ Inkubation von 1 bis 24 h bei 37 °C im Inkubator.
- ◆ 1x waschen der Zellen mit PBS (PAA).
- ◆ Fixieren der Zellen mit 4 % (v/w) PFA (2.6.1) für 15 min bei RT, einbetten in Paraffin.
- ◆ Paraffinschnitte erstellen und diese entparaffinieren.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS (2.10) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 30 min in 2 N HCl bei 37 °C inkubieren.
- ◆ 2x 5 min in 0,1 M Na₂B₄O₇ pH 8,5 umpuffern.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % Tween 20 waschen.
- ◆ 30 min mit 10 % (v/v) Schweineserum, 0,3 % (v/v) Triton X-100 in Tris-BSA (2.10.1) Puffer unspezifische Bindungen in einer feuchten Kammer blockieren.
- ◆ Serum auf Papiertuch abklopfen und Primärantikörper gegen BrdU 1:100 verdünnt in Tris-BSA auftragen, Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Es kann noch zusätzlich 0,1 % (v/v) Triton X-100 zugegeben werden, um eine stärkere Permeabilisierung zu erhalten.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper und 4 % (v/v) Schweineserum in Tris-BSA verdünnen und 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubieren.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Für eine Kernfärbung DAPI Stocklösung (1mg/ml gelöst in ddH₂O) 1:1000 mit Tris-BSA verdünnen und ca. 5 min bei RT auf den Zellen inkubieren.

- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ Schnitte 3x 5 min in ddH₂O waschen, trocknen lassen und mit Kaiser-Gelatine eindeckeln.

2.10.4 Primär- und Sekundärantikörper

Es wurden folgende Antikörper in dieser Dissertation verwendet:

Antikörper	Wirtstier	Verd.	Hersteller	Vorbehandlung für Paraffin
<i>Primärantikörper</i>				
BrdU	Maus	1:100	Dako	Zitratpuffer o. HCl
Wide spectrum Cytokeratin	Kaninchen	1:500	Dako	Pronase
GFAP	Kaninchen	1:500	Dako	Zitratpuffer
Human nuclei	Kaninchen	1:250	Chemicon	
Ki-67	Kaninchen	1:1000	Novocastra	
Ki-67	Maus	unverd.	Biologo	Zitratpuffer
Laminin	Kaninchen	1:50	MP Biomedicals	Zitratpuffer
Smooth muscle actin	Kaninchen	1:100	AMS Biotechnology	Zitratpuffer
β-Tub III (TuJ1)	Maus	1:500	Santa Cruz	Zitratpuffer
Überstände	Maus	unverd.	AG Bühring	
<i>Sekundärantikörper</i>				
Anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	1:500	Molecular Probes	
Anti-Maus-Alexa488	Ziege	1:500	Molecular Probes	
Anti-Kaninchen-Cy3	Ziege	1:400	Invitrogen	
Anti-Maus-Cy3	Ziege	1:400	Invitrogen	

2.11 Elektronenmikroskopie

Für die Charakterisierung der adulten Organkulturen bzw. fötalen Schnittkulturen wurde die Transmissionselektronenmikroskopie bzw. die Rasterelektronenmikroskopie angewandt.

2.11.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die adulten Gewebekulturen wurden mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd (Sigma) und 4 % (v/w) Paraformaldehyd (Sigma) in HEPES-Puffer für 2 h bei 4 °C fixiert. Nach erfolgter Postfixation mit 1 % (v/w) Osmiumtetroxid in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2 für 1 h auf Eis, anschließendem Waschen mit ddH₂O und Behandlung mit einer 1 %igen (v/w), wässrigen Uranylacetatlösung für 1 h bei 4 °C wurden die Organkulturen zur Entwässerung durch eine Alkoholreihe gezogen, in Ethanol/Resin inkubiert und abschließend in Epon unter Verwendung von Glycidether 100 (Roth) eingebettet. Die hergestellten Ultradünnschnitte wurden jeweils für ein paar Sekunden mit einer 1 %igen (v/w), wässrigen Uranyl-Acetatlösung und 10 – 40 mg Bleizitrat, gelöst in 10 ml ddH₂O mit 100 µl 10N NaOH, gefärbt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Philips CM10 Elektronenmikroskop bei 60 kV unter Verwendung einer 30 µm Objektivblende erstellt.

HEPES-Puffer:

- 100 mM HEPES (Sigma)
- 90 mM Saccharose (Roth)
- 10 mM MgCl₂ (Roth)
- 10 mM CaCl₂ (Merck)
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 7,0 einstellen.

2.11.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die embryonalen Schnittkulturen wurden für die Rasterelektronenmikroskopie 1 h bei 4 °C in 2 % (v/v) Glutaraldehyd und 3 % (v/v) Formaldehyd in Cacodylatpuffer fixiert. Anschließend wurden sie 5x in TE-Puffer gewaschen, in einer Acetonreihe (je 15 min 10, 30, 50, 70, 90, 100 %) auf Eis dehydriert und abschließend mit flüssigem CO₂ getrocknet. Die Schnittkulturen wurden mit einem ca. 10 nm Goldfilm sprühbeschichtet und mit einem Zeiss Rasterelektronenmikroskop DSM982 Gemini bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV unter Verwendung des Everhart Thronley SE Detektors und des Inlens-SE Detektors bei einer 50:50 Ratio untersucht.

Cacodylat-Puffer:

- 0,1 M Cacodylat (Roth)
- 0,09 M Sucrose (Sigma)
- 0,01 M MgCl₂
- 0,01 M CaCl₂
- in ddH₂O lösen.
- pH auf 6,9 einstellen.

2.12 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ist eine Methode, bei der Nukleinsäuren in Geweben oder einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wird eine künstlich hergestellte und markierte Sonde aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die an die nachzuweisende Nukleinsäure bindet, also hybridisiert. Die Sonde kann direkt mit fluoreszierenden Molekülen markiert sein oder indirekt mit z. B. Digoxigenin. Bei der indirekten Markierung wird anschließend ein Antikörper eingesetzt, der im Falle von einer Digoxigenin markierten Sonde gegen das Digoxigenin gerichtet ist. An diesen Antikörper ist zur Visualisierung der *in situ* Hybridisierung z. B. eine alkalische Phosphatase gebunden, die in einer anschließenden Reaktion ein zur Verfügung gestelltes Substrat umsetzt. Das in dieser Arbeit verwendete Substrat war 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), das in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu einem violetten bis blauen Farbstoff umgesetzt wird.

Bei der Farbreaktion oxidiert das Tetrazoliumsalz Indoxyl zum blauen Indigo-Farbstoff, wobei das Tetrazoliumsalz zum blauen Formazan-Farbstoff reduziert wird.

In dieser Arbeit wurde die *in situ* Hybridisierung dazu verwendet, die Organkultur zu stimulieren und deren Funktionalität zu überprüfen, sowie humane Zellen, die in die murine Organkultur implantiert wurden, mittels einer an die humanspezifische Alu-Sequenz bindenden Sonde nachzuweisen. Die dazu verwendeten Sonden wurden mit Digoxigenin markiert und anschließend mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, an den eine Alkalische Phosphatase gebunden ist, nachgewiesen.

2.12.1 Herstellung der Sonde für die Serum- und Glukokortikoid induzierbaren-Kinase 1

Die Sonde für die Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase 1 (SGK1) wurde durch eine *in vitro* Transkription mit dem DIG-labeling kit (Roche) generiert. Das SGK1-Plasmid (pPCRScrip, Stratagene, Kalifornien, USA) mit der murinen SGK1-Sequenz (Position 20 – 1373) wurde von Dr. K. Klingel zur Verfügung gestellt. Das Plasmid wurde für die *in vitro* Transkription mit NotI (Antisense-Sonde) bzw. SalI (Sense-Sonde) linearisiert. Bei der *in vitro* Transkription bindet die RNA Polymerase an einen spezifische Promotor (T7) und generiert „run off“ cRNA Transkripte, die mit Digoxigenin (DIG) markiert sind. Anschließend wurde die isolierte cDNA mit Natronlauge auf eine durchschnittliche Länge von 400 Basen hydrolysiert um das Eindringen der Sonde in das Gewebe zu verbessern. Die Konzentration der hergestellten Sonde kann über eine Dot-Blot-Analyse bestimmt werden, bei der eine DIG-markierte RNA-Sonde bekannter Konzentration (Roche) parallel auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, visualisiert und über die Färbeintensität verglichen wird.

Verwendete Sonden:

Sonde	Plasmidvektor (Stratagene)	Restriktionsenzym (Roche)	Polymerase
mSGK1 Antisense	pPCRScrip	NotI	T7
mSGK1 Sense	pPCRScrip	Sall	T7

Restriktionsverdau der amplifizierten Plasmid-DNA:

- x µl Plasmid-DNA (ca. 10 µg DNA)
- 1 µl Restriktionsenzym (Roche)
- 2,5 µl 10x Puffer (Roche)
- x µl ddH₂O
- 4 h bei 37 °C inkubieren.

In vitro Transkription mit DIG-Labeling (DIG RNA Labeling Kit, Roche):

- 2 µl 10x NTP labeling mixture
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl T7-Polymerase
- x µl Template DNA (1 µg Plasmid-DNA)
- x µl ddH₂O
- 2 h bei 37 °C inkubieren.
- Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 abstoppen.
- Sonden bei -20 °C lagern.

Hydrolyse der gelabelten Sonde:

- 50 µl Sonde
- 30 µl 200 mM Na₂CO₃ (Sigma)
- 20 µl 200 mM NaHCO₃ (Sigma)
- 16 min bei 60 °C hydrolysieren.

Aufreinigung der Sonde:

- 5 µl 10 %ige (v/v) Essigsäure
- 11 µl 3 M Natriumazetat (pH 6,0)
- 1 µl von einer 10 mg/ml tRNA Stocklösung
- 1,2 µl 1 M MgCl₂
- 300 µl eiskaltes Ethanol zugeben.
- 4 - 16 h bei -20 °C inkubieren.
- 15 min bei 4 °C zentrifugieren.
- RNA-Pellet trocknen und in RNase freiem Wasser lösen (25 - 100 µg/ml).

Dot-Blot-Analyse:

Die Dot-Blot-Analyse wird zur Konzentrationsbestimmung der Sonde angewandt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe der Sonde und des Standards (Roche für RNA-Sonden) hergestellt, auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und angefärbt.

Verdünnungsreihe:

Tube	RNA	Aus Tube	Puffer (µl)	Verdünnung	Endkonz.
1	1	Stock	9	1:10	10 ng/µl
2	2	1	18	1:10	1 ng/µl
3	3	2	97	1:330	30 pg/µl
4	2	2	198	1:1000	10 pg/µl
5	15	4	35	1:3300	3 pg/µl

Durchführung:

- ◆ Je Verdünnungsstufe 1 µl auf Hybond-N-Membran auftragen und kurz antrocknen lassen.
- ◆ Membran 30 sec bei 120 °C backen.
- ◆ 3x 2 min in 1x Maleinsäurepuffer waschen.
- ◆ 10 min in 1x Blockierungslösung + 4 % (v/v) Schafserum (Sigma) blockieren.
- ◆ 1 h Inkubation mit Schaf Anti-DIG-Alkalische Phosphatase Antikörper (1:5000, Roche) in 1x Blockierungslösung.

- ◆ 3x 2 min in 1x Maleinsäurepuffer waschen.
- ◆ 2x 2 min in AP-Puffer waschen.
- ◆ Dot-Blot mit NBT/BCIP-Substratlösung ca. 2 h bei RT im Dunkeln entwickeln.
- ◆ Reaktion mit ddH₂O abstoppen.

20x Saline-Sodium-Citrat (SSC)-Puffer:

- 3 M NaCl (Merck)
- 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Sigma)
- pH auf 7,0 einstellen, anschließend autoklavieren.

Verdünnungspuffer (10 ml):

- 5 ml ddH₂O
- 3 ml 20x SSC
- 2 ml Formaldehyd (Sigma)

10x Maleinsäurepuffer:

- 1 M Maleinsäure (Roth)
- 1,5 M NaCl (Merck)
- pH auf 7,0 mit 10 M NaOH (Roth) einstellen, anschließend autoklavieren.
- für 1x Gebrauchslösung 0,05 % (v/v) Tween 20 (Sigma) zugeben.

Blockierungslösung:

- Blockierungslösung (Roche) 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnen.

Alkalische Phosphatase (AP)-Substratpuffer:

- 0,1 M Tris/HCl (Roth)
- 0,1 M NaCl (Merck)
- pH auf 9,5 einstellen.

NBT/BCIP-Substratlösung:

- 3,5 µl/ml BCIP (Roche)
- 4,5 µl/ml NBT (Roche)
- In AP-Puffer verdünnen.

2.12.2 *In situ* Hybridisierung mit der Sonde für die Serum- und Glukokortikoid induzierbaren-Kinase 1

Die mRNA-*in situ* Hybridisierung mit der SGK1 Sonde wurde an 12 µm dicken Kryostatschnitten durchgeführt, die von Organkulturen und murinem Dickdarm gewonnen wurden.

Durchführung:

- ◆ Schnitte auf der Wärmeplatte ca. 10 – 20 sec bei 50 °C trocknen.
- ◆ 20 min mit 4 % (v/w) PFA (2.6.1) fixieren.
- ◆ 3x kurz in PBS (2.6.1) schwenken.
- ◆ 5 min in 2,4 µl/ml Acetic Anhydrid (Fluka) gelöst in 0,1 M Triethanolamin (TEA, Sigma) pH 8,0 acetylieren.
- ◆ Erneut 2,4 µl/ml Acetic Anhydrid zugeben und weitere 5 min inkubieren.
- ◆ 3x kurz in PBS waschen.
- ◆ 15 min bei RT mit 2 µg/ml Proteinase K in PK-Puffer inkubieren.
- ◆ 3x 5 min in PBS waschen.
- ◆ 1 h Prähybridisierung mit Hybridisierungspuffer bei 63 °C in feuchter Kammer.
- ◆ Hybridisierung über Nacht mit Hybridisierungspuffer und 200 ng/ml DIG-gelabelter RNA-Sonde bei 63 °C.
- ◆ Nach der Hybridisierung Objektträger kurz mit 1x SSC-Puffer (2.12.1) bei 63 °C waschen.
- ◆ 3x 15 min mit 0,1x SSC-Puffer bei 63 °C waschen.
- ◆ 5 min mit TNT-Puffer waschen.
- ◆ 30 min mit 4 % (v/v) Schafserum in Blockierungslösung (2.12.1) blockieren.
- ◆ 1 h mit Anti-DIG-Fab-AP Antikörper (1:2000 in Blockierungslösung) inkubieren.
- ◆ 3x 15 min mit Maleatpuffer (2.12.1) waschen.
- ◆ Kurz in AP-Substratpuffer (2.12.1) umpuffern.
- ◆ Farbentwicklung mit frischer NBT/BCIP-Substratlösung in AB-Substratpuffer mit 0,5 mg/ml Levamisol.

2x PK-Puffer:

- 100 mM Tris-HCl
- 10 mM EDTA
- pH auf 8,0 einstellen, anschließend autoklavieren.
- für 1x Gebrauchslösung 0,05 % (v/v) Tween 20 zugeben.

Hybridisierungspuffer:

- 100 mg/ml Dextransulfat (Sigma)
- 0,3 M NaCl
- 0,02 M Tris, pH 8
- 5 mM EDTA, pH 8
- Dextransulfat unter leichtem Erhitzen lösen, danach abkühlen.
- 1x Denhardt's-Lösung (50x; Sigma)
- 0,5 mg/ml t-RNA (Roche)
- 50 % Formamid (deionisiert; Roth)
- aliquotieren und bei -20°C lagern.
- vor Gebrauch 10 mM DTT zugeben.

10x TNT-Puffer:

- 1 M Tris-HCl
- 1,5 M NaCl
- pH auf 7,5 mit 10 M NaOH einstellen, anschließend autoklavieren.
- für 1x Gebrauchslösung 0,05 (v/v) % Tween 20 zugeben.

2.12.3 Herstellung der humanspezifischen Alu-Sonde

Die humanspezifische, Digoxigenin markierte Alu-Sonde wurde mit Hilfe einer PCR hergestellt (Just et al. 2003). Als Referenzsequenz diente genomische DNA, die aus einer humanen Leber, unter Verwendung des DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), isoliert wurde. Die PCR-Primer binden an eine stark konservierte Region der humanspezifischen Alu-Sequenz. Das PCR-Produkt besteht aus 224 Basenpaaren (bp).

PCR:

PCR-Ansatz:

- 2,5 µl 10x Puffer (mit MgCl₂)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 0,25 µl Amplitaq DNA-Polymerase
- 1 µl Primer forward (10 µM)
- 1 µl Primer reverse(10 µM)
- 5 µl Template DNA
- ad 25 µl ddH₂O

PCR-Bedingungen:

Denaturierung:	95 °C, 10 min	} 25x
Denaturierung:	95 °C, 30 sec	
Primer-Annealing:	58 °C, 45 sec	
Elongation:	72 °C, 45 sec	
Elongation:	72 °C, 10 min	

Sequenz der Alu-Primer:

Forward: 5'-ACGCCTGTAATCCCAGCACTT-3'

Reverse: 5'-TCGCCAGGCTGGAGTGCA-3'

Agarose-Gelelektrophorese:

Die Gelelektrophorese wird dazu genutzt Moleküle, unter anlegen eines elektrischen Feldes, nach ihrer Größe und Ladung in einem Gel, das in einer ionischen Pufferlösung liegt, aufzutrennen. Die Moleküle bewegen sich je nach Größe und Ladung unterschiedlich schnell durch das Gel. Dabei wandern negativ geladene Moleküle, z. B. DNA/RNA, zur positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle zur negative geladenen Kathode. Die Agarosemoleküle des Gels bilden ein engmaschiges Netz, das die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert. Identische Moleküle wandern in dem Gel auf gleicher Höhe und bilden Banden. Die Auswertung des Gels erfolgt durch Färbung der Nukleinsäurebanden mit Ethidiumbromid, die anschließend unter UV-Licht visualisiert und durch das Auftragen eines Größenstandards nach ihrer Basenpaarlänge beurteilt werden können.

Das PCR-Produkt der Alu-Sonde wurde auf ein 2 %iges (v/w) Agarosegel aufgetragen, mit Ethidiumbromid (10 ng/ml) gefärbt, anschließend ausgeschnitten und mit dem Qiaquick gel extraction kit (Qiagen) aufgereinigt. Das PCR-Produkt wurde mit Digoxigenin (DIG), unter Verwendung des PCR DIG probe synthesis kits (Roche), markiert und durch Präzipitation mit Ethanol gemäß Protokoll des PCR DIG Probe Synthesis Kit aufgereinigt.

2.12.4 *In situ* Hybridisierung mit der humanspezifischen Alu-Sonde

Die *in situ* Hybridisierungen mit der Alu-Sonde wurden mit dem Tecan-Roboter an Paraffinschnitten durchgeführt.

In situ Hybridisierung mit dem Tecan-Roboter

Die DNA-*in situ* Hybridisierung wurde nach erfolgter Vorbehandlung der 5 µm dicken Paraffinschnitte an einem Tecan-Roboter freedom evo (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt.

Vorbehandlung:

- ◆ 15 min in Xylol entparaffinieren.
- ◆ 5 min in Xylol/Ethanol (1:2) inkubieren.
- ◆ 5 min in 100 % Ethanol inkubieren.
- ◆ 5 min in 70 % (v/v) Ethanol inkubieren.
- ◆ 5 min in 50 % (v/v) Ethanol inkubieren.
- ◆ 2 min in ddH₂O spülen.
- ◆ 2 min in 0,9 % (v/w) NaCl spülen.
- ◆ 5 min in 2,4 µl/ml Acetic Anhydrid (Fluka) gelöst in 0,1 M Triethanolamin (TEA, Sigma) pH 8,0 inkubieren.
- ◆ Erneut 2,4 µl/ml Acetic Anhydrid zugeben und weitere 5 min inkubieren.
- ◆ 2 min in PBS (2.10) spülen.
- ◆ 2 min in 0,9 % (v/w) NaCl spülen.
- ◆ 2 min in 70 % (v/v) Ethanol inkubieren.
- ◆ 2 min in 95 % (v/v) Ethanol inkubieren.
- ◆ 2 min in 100 % Ethanol inkubieren.
- ◆ Schnitte bei 37 °C trocknen lassen.

In situ Hybridisierungsprogramm des Roboters:

- ◆ 3x 5 min in PBS (2.6.1) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 2x 15 min in PBS mit 0,3 % (v/v) Triton X-100 inkubieren.
- ◆ 3x 5 min in PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 5 min mit Proteinase K Puffer und 0,05 % (v/v) Tween äquilibrieren.
- ◆ 2x 10 min mit 2 µg/ml Proteinase K (2.12.2, Roche) inkubieren.
- ◆ 7x 5 min in PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 4x 60 min in Hybridisierungspuffer (2.12.2) mit 10 mM DTT prähybridisieren.
- ◆ 2x 30 min bei 85 °C in 100 ng/ml Sonde, gelöst in Hybridisierungspuffer mit 10 mM DTT inkubieren.
- ◆ 5 h bei 37 °C hybridisieren.
- ◆ 5x 5 min bei 37 °C in 2x SSC (2.12.1) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 4x 15 min bei 37 °C in 0,1x SSC mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 2x 5 min in Maleinsäurepuffer (2.12.1) mit 0,05 (v/v) % Tween 20 waschen.
- ◆ 2x 15 min in Blockierungslösung (2.12.1) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 blockieren.
- ◆ 2x 30 min mit anti-DIG-AP Antikörper 1:2000 verdünnt in Blockierungslösung inkubieren.
- ◆ 4x 15 min in Maleinsäurepuffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20 waschen.
- ◆ 2x 5 min mit AP-Puffer (2.12.1) pH 9,5 äquilibrieren.
- ◆ Schnitte in NBT/BCIP-Substratlösung (2.12.1) im Dunkeln entwickeln.
- ◆ Abschließend 3x mit ddH₂O waschen, trocknen und mit Kaiser Gelatine eindecken.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Doktorarbeit bestand in der Identifikation neuer humaner, intestinaler Marker, die für Zellisolutions- und Zellcharakterisierungsstrategien von epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen genutzt werden können. Es wurden verschiedene monoklonale Antikörper untersucht, welche bereits für die Detektion von Oberflächenepitopen nichtintestinaler Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt wurden. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte mittels FACS und immunhistologischen Methoden, die Isolation wurde mit Hilfe der MACS-Technik durchgeführt. Im zweiten Teil der Arbeit wurden intestinale Organkulturmodelle für Implantationsexperimente etabliert, um isolierte Darmepithelzellen *in vitro* im dreidimensionalen Gewebeverband zu untersuchen.

3.1 Etablierung der Isolation und Vereinzelnung von Darmepithelzellen

Für die FACS- und MACS-Technik ist eine schonende Zellvereinzelnung der Epithelzellen notwendig. Dazu wurde zunächst in einem ersten Schritt der Darmepithelverband von der Lamina propria getrennt. Dies gewährleistet, dass für die weiteren Schritte keine nichtepithelialen Zellen mitgeführt werden. Im zweiten Schritt erfolgte die enzymatische Zellvereinzelnung des zuvor isolierten Epithelgewebes.

Zur Separation des Epithelverbandes bzw. der Krypten wurden zwei verschiedene Isolationsmethoden ausgetestet: eine enzymatische Behandlung mit Thermolysin und eine Inkubation mit EDTA. Die Isolation mit Thermolysin zeigte sich als besonders zellschonend, sie ist allerdings für eine anschließende Antikörperfärbung, aufgrund der abgebauten Oberflächenantigene, ungeeignet. Sie kann somit lediglich zur Kryptenisolation mit z. B. direkt anschließender Kultivierung oder RNA-Isolation des kompletten Epithels verwendet werden. Für Antikörperfärbungen werden die Krypten daher mit EDTA isoliert (Abbildung 9).

Isolation von Darmepithelzellen

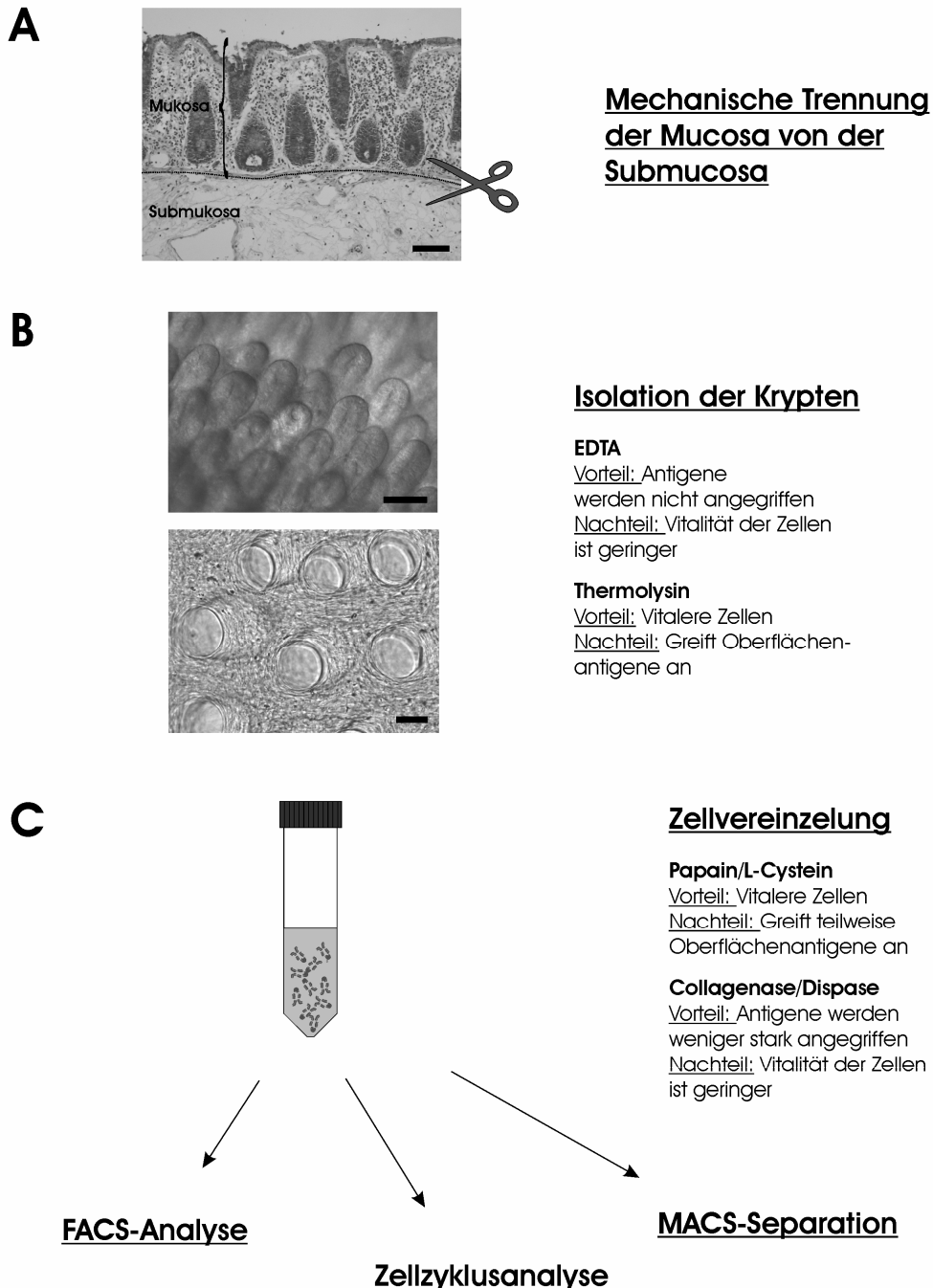


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Isolation von Darmepithelzellen aus Colongewebe. **A** Mechanische Trennung der Mucosa von der Submucosa unter dem Binokular. **B** Isolation der Darmkrypten aus der Mucosa durch Inkubation in EDTA oder Thermolysin. Es sind die isolierten Krypten und die zurückbleibende Lamina Propria dargestellt. Wenn anschließend eine Antikörperfärbung erfolgen soll, muss die Isolationsmethode mit EDTA durchgeführt werden. **C** Zellvereinzelnung der Krypten mit einer Papain/L-Cystein- oder Collagenase/Dispase-Lösung. Die nun erhaltenen Einzelzellen können für eine FACS-Analyse, Zellzyklusanalyse oder MACS-Separation eingesetzt werden. Größenbalken: 100 µm in **A** und **B** oben, 50 µm in **B** unten.

Zur Vereinzelung der Kryptenzellen wurden ebenfalls zwei Methoden angewandt; zum einen eine enzymatische Verdauung mit Papain, zum anderen mit einer Collagenase-Dispase-Lösung. Im Hinblick auf die Zellvitalität der Epithelzellen konnten in Vorversuchen die besten Resultate bei der Zelldissoziation mit dem Enzym Papain erzielt werden. Jedoch zeigte sich auch hier, dass manche Antigene durch Papain angedaut werden und diverse Antikörper anschließend nicht mehr binden können. Als Alternative wurde in diesen Fällen die Collagenase-Dispase-Lösung verwendet (Abbildung 9).

3.2 Untersuchung der Caco-2 Zelllinie und des Darmepithels mit der FACS-Analyse

Der erste Schritt in der Identifikation eines Stammzellmarkers bestand darin, verschiedene Oberflächenmarker auf ihre Bindungseigenschaften mit Hilfe der FACS-Technik zu überprüfen. Diese Analyse wurde an mit EDTA und Papain bzw. Collagenase/Dispase isolierten und vereinzelt Darmepithelzellen sowie an der Caco-2 Zelllinie durchgeführt und miteinander verglichen.

46 verschiedene Antikörper (Tabelle 1) wurden mittels FACS-Analysen an Caco-2- und primären Darmepithelzellen in drei unabhängigen Ansätzen untersucht. Abbildung 10 zeigt FACS-Diagramme mit 21 verschiedenen Antikörpern, die entweder bei den primären Darmepithelzellen und/oder bei der Zelllinie ein einheitliches Signal aufwiesen. Mit Ausnahme des W5D3-Antikörpers als Negativbeispiel wurden Messungen ohne Signal nicht aufgelistet. Bei den Caco-2 Zellen konnte mit nahezu jedem Antikörper ein positives Signal aufgezeigt werden. SSEA-1 wies jedoch kein detektierbares Signal auf. Bei den Primärzellen waren zehn der 21 Antikörper negativ. Bei fünf Antikörpern (CD107a, CD151, CD164, CD318, CD326) zeigten alle Primärzellen ein Signal, bei 6 Antikörpern waren nur wenige Zellen angefärbt (57D2, 58A2B11, SSEA-1, W4A5, W5C4, W5C5A8).

Bei der Dissoziation mit Collagenase/Dispase konnten auch positive Zellen für die Antikörper 58B1A2 und CD13 detektiert werden (Abbildung 11). Dies lässt darauf schließen, dass die Enzyme in unterschiedlicher Weise die Oberflächenepitope angreifen und dadurch eine Antikörperbindung verhindern können. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die nicht detektierten

Signale der Antikörper 103B2C2, 3D6C9, CD324, W1C3, W3A4E2, W3D5A9, W5D3 und W7C6F10 bei den primären Zellen durch die enzymatische Behandlung verursacht werden könnten.

1G2	BB1	CD151	CH2A4G12	W3A4E2	W5D3
3D6C9	BSP1	CD164	CH3A4A7	W3C3	W6B3C1
4FR6D3B5	CD13	CD203c	CH4D3F2	W3C4E11	W7C5
57D2	CD34	CD318	SE12C3	W3D2B10	W7C6F10
58A2B11	CD107a	CD324	SSEA-1	W3D5A9	W8B2B10
58B1A2	CD135	CD326	SSEA4	W4A5	W8C3B3
97C5A6	CD140a	CH1A4A7	TRA1-60	W5C4	
A3C6E2	CD140b	CH2A3B5	W1C3	W5C5A8	

Tabelle 1: Liste der mit FACS getesteten Antikörper. Antikörper, die weiter untersucht wurden, zeigten bei allen Messungen ein einheitliches Signal und sind hier dunkelgrau unterlegt. Hellgrau unterlegt sind Antikörper, die bei den drei verschiedenen FACS-Messungen unterschiedliche Ergebnisse aufzeigten. Die nicht markierten Antikörper wiesen bei der FACS-Analyse kein Signal auf.

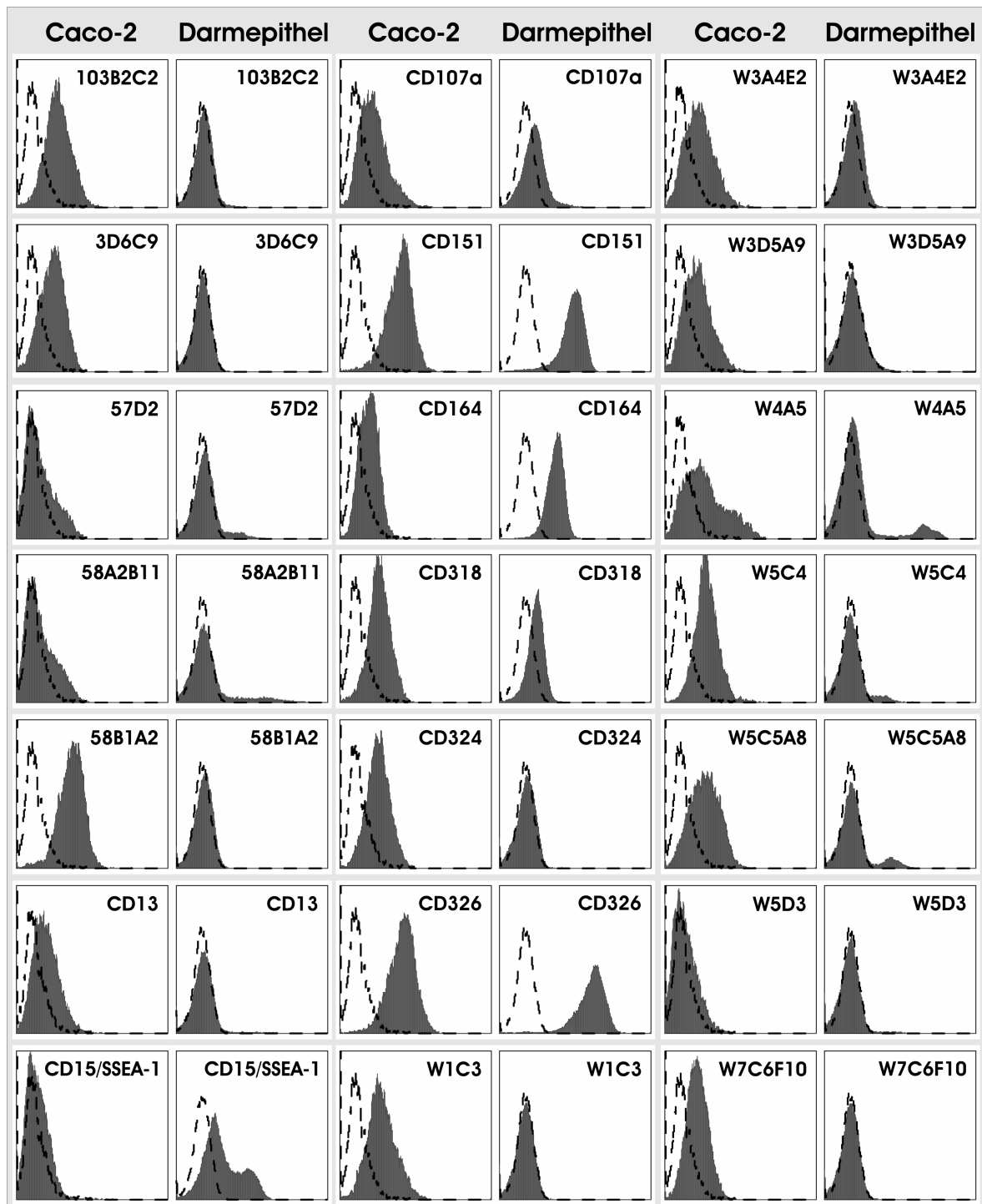


Abbildung 10: FACS-Analyse mit verschiedenen Oberflächenantikörpern an isolierten Primärzellen des Darmepithels und der Caco-2 Zelllinie, die ein einheitliches Signal aufwiesen. Die Isolation erfolgte mit EDTA, die Zellvereinzelnung wurde mit Papain durchgeführt. Caco-2 Zellen wurden mit einer Trypsin/EDTA-Lösung aus der Zellkulturflasche abgelöst und vereinzelt. Die Färbung wurde indirekt durchgeführt unter Verwendung eines FITC-gelabelten Sekundärantikörpers. Die Caco-2 Zellen zeigten mit Ausnahme des SSEA-1- und W5D3-Antikörpers bei allen Messungen ein Signal. Die isolierten Darmepithelzellen waren komplett positiv für die Antikörper CD107a, CD151, CD164, CD318 und CD326. Die Antikörper 57D2, 58A2B11, SSEA-1, W4A5, W5C4 und W5C5A8 färbten nur wenige Zellen des Darmepithels an.

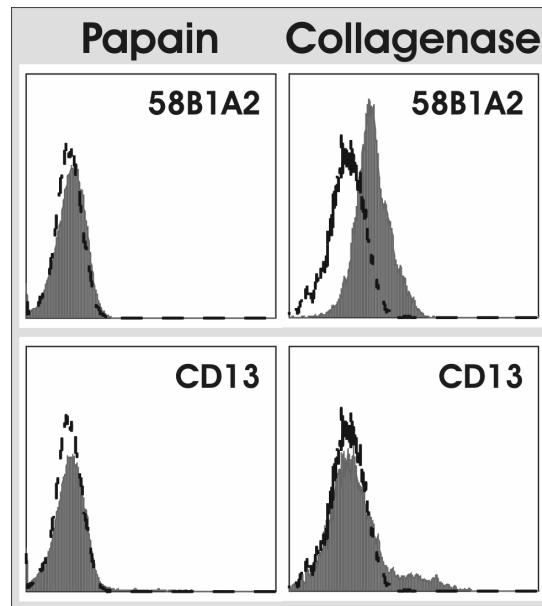


Abbildung 11: Vergleich der FACS-Analyse mit unterschiedlich isolierten Darmepithelzellen. Die Antikörper 58B1A2 und CD13 konnten bei einer Zellvereinzelung mit Papain nicht detektiert werden. Unter Verwendung von Collagenase zeigte sich ein positives Signal für diese Antikörper.

3.3 Untersuchung der Caco-2 Zelllinie und des Darmepithels mit der Immuncyto-/Immunhistochemie

Zur Bestätigung der FACS-Ergebnisse wurde an humanem Colongewebe, an Colonkarzinomgewebe sowie an der Caco-2 Zelllinie eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Abbildung 12 zeigt zum besseren Verständnis des histologischen Aufbaus eine Hämalaun-/Alcianblau-Färbung sowie einen immunhistochemischen Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 auf humanem Colongewebe, Colonkarzinomgewebe und kultivierten Caco-2 Zellen. Die Immunhistochemie mit den verschiedenen Oberflächenantikörpern wurde an Kryostatschnitten bzw. auf Glas kultivierten Caco-2 Zellen durchgeführt. Trotz des möglichen Qualitätsverlusts der Zellmorphologie wurde die Fixierung mit Aceton vorgenommen, um den nativen Zustand der Antigene zu erhalten und die darauffolgende Antikörperbindung bestmöglichst zu erzielen.

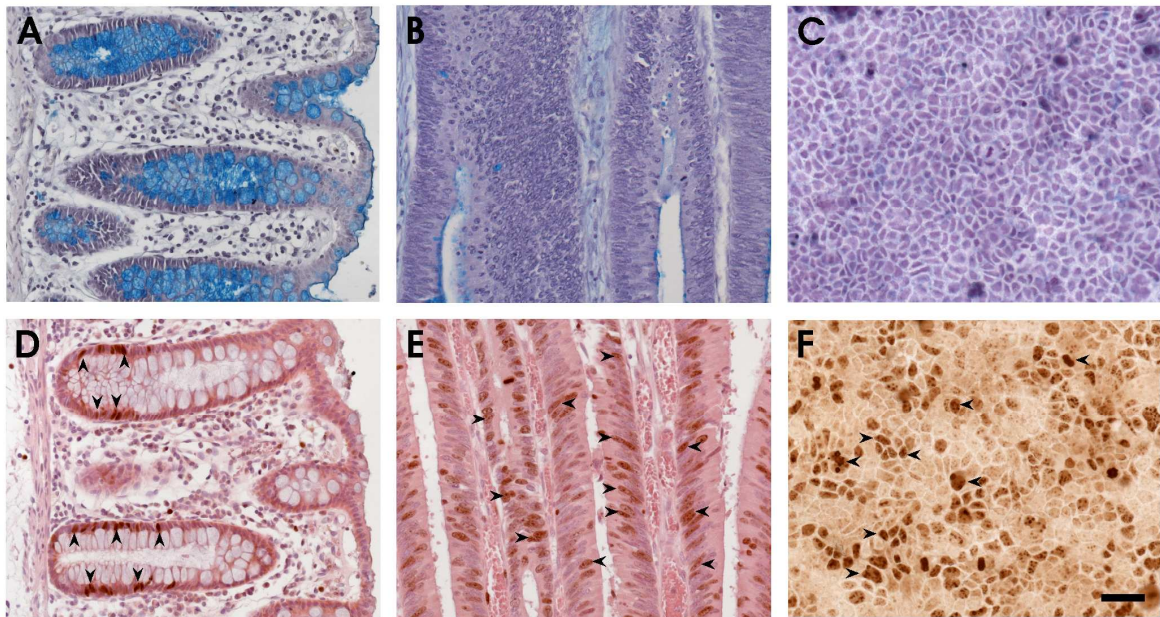


Abbildung 12: Histochemische Färbung mit Hämalaun und Alcianblau (A – C) und Immunhistologie mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (Gegenfärbung mit Hämalaun und Eosin; D, E) an humanem Colongewebe, humanem Colonkarzinomgewebe und der Zelllinie Caco-2. **A** Die Becherzellen des einschichtigen Darmepithels werden durch das Alcianblau türkis gefärbt. **B** Es sind keine Becherzellen im Karzinomgewebe zu finden. Es ist lediglich etwas extrazellulärer Schleim durch Alcianblau angefärbt. Das Epithel erscheint hier mehrschichtig. **C** Die Caco-2 Zelllinie zeigt mit Alcianblau keine Färbung. **D** Die proliferierenden Zellen des Darmepithels befinden sich nur im unteren Bereich der Colonkrypte (Pfeile). **E** Bei dem Colonkarzinomgewebe sind proliferierende Zellen über das gesamte epithelartige Gewebe verstreut (Pfeile). **F** Die Caco-2 Zellen weisen eine sehr hohe Proliferationsrate auf (Pfeile). Größenbalken: 50 µm.

In Abbildung 13 sind Antikörperfärbungen, die mit der FACS-Analyse übereinstimmen, dargestellt. Das Darmepithel zeigte bei den Antikörpern 58A2B11, 58B1A2, CD13, CD107a, CD318, CD326, SSEA-1, W4A5 und W5C5A8 eine positive Färbung. Die Immunhistochemie mit den Antikörpern W3D5A9 und W5D3 war wie bei den FACS-Ergebnissen negativ. Die Caco-2 Zelllinie konnte mit den Antikörpern 58A2B11, 58B1A2, CD13, CD107a, CD318, CD326, W3D5A9, W4A5 und W5C5A8 positiv gefärbt werden. Die Antikörper SSEA-1 sowie W5D3 wiesen wie bei der FACS-Analyse keine Färbung auf.

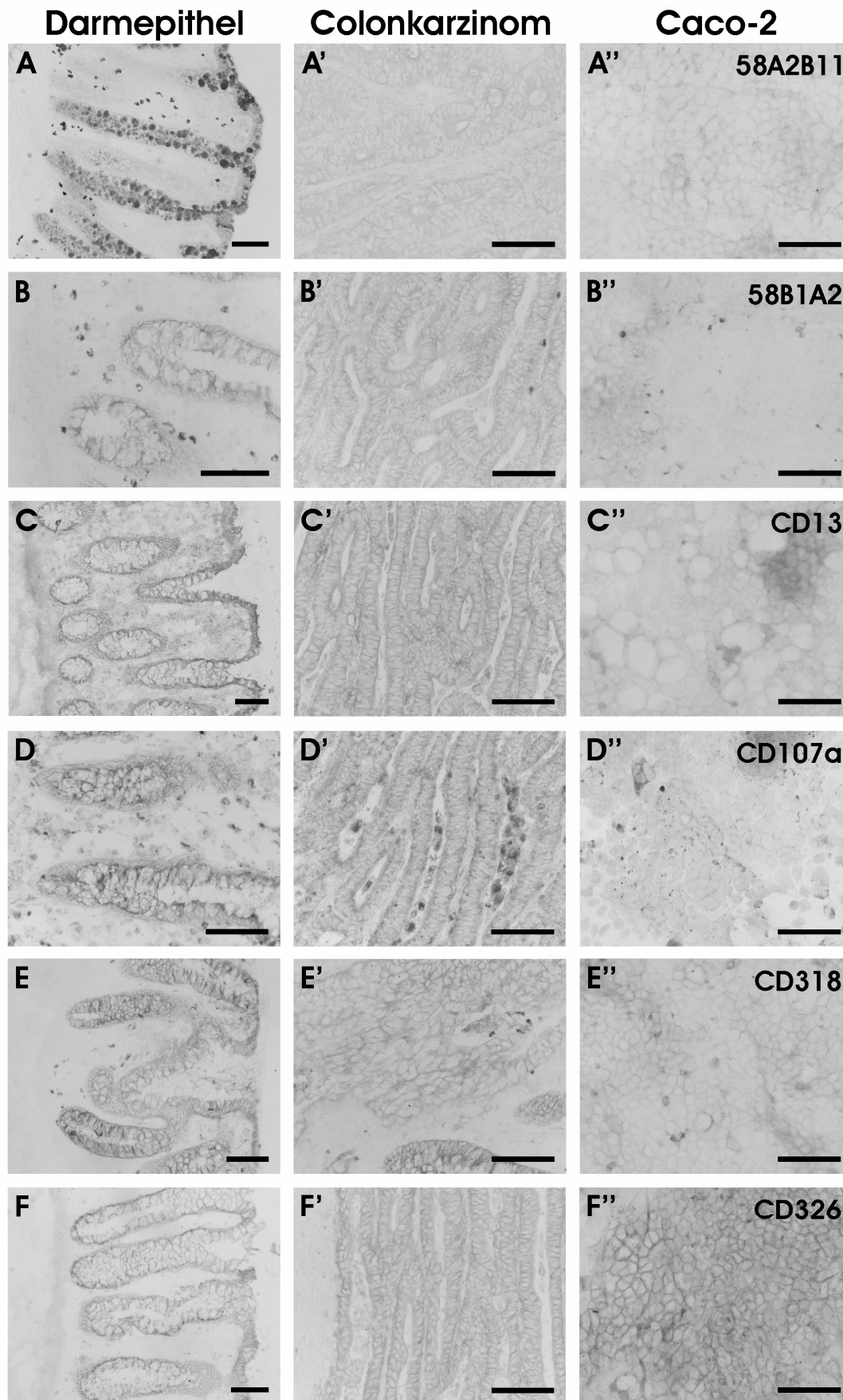
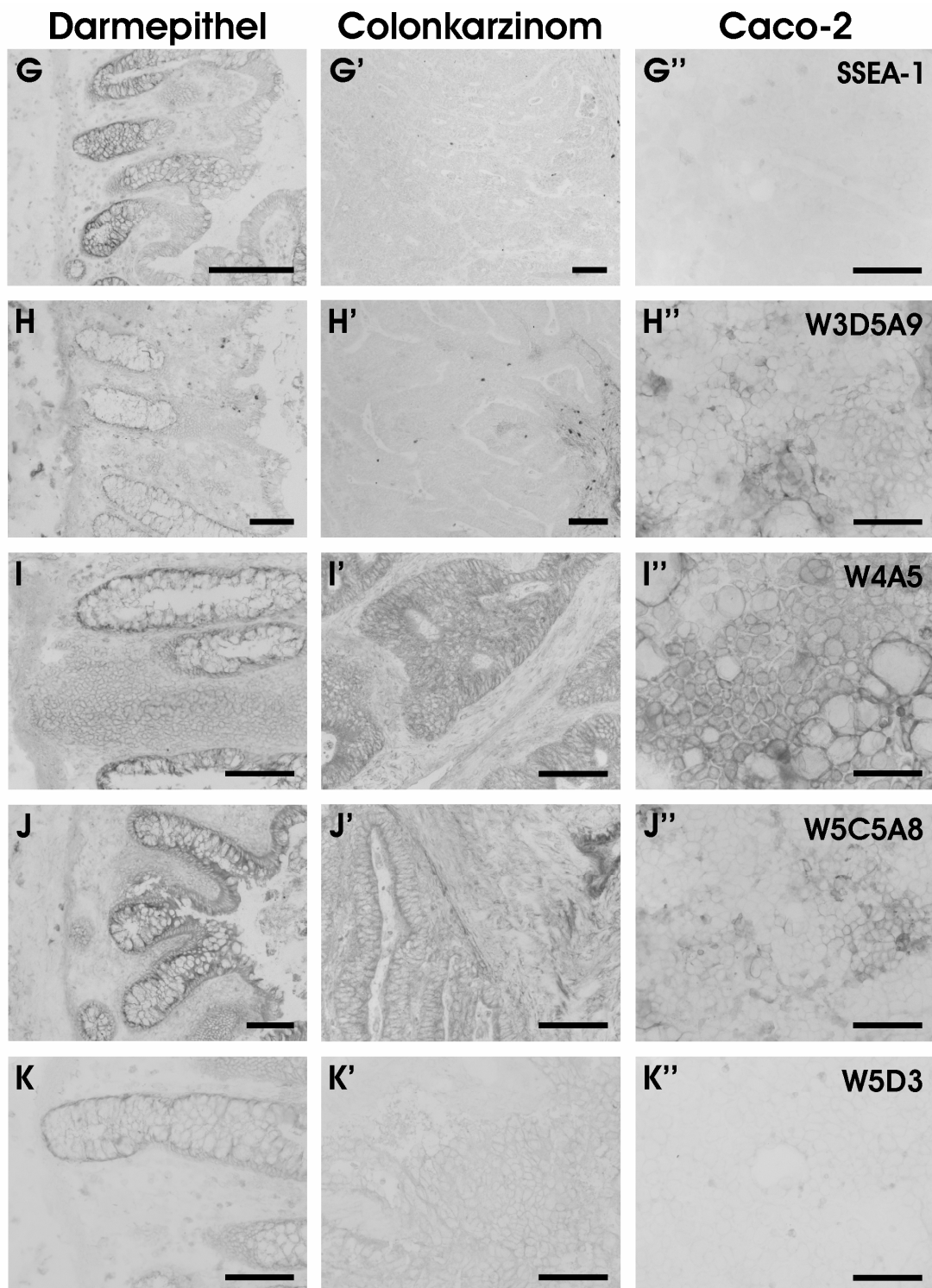


Abbildung 13: Immunhistologische Charakterisierung an humanem Darmepithel des Colon (A – K), Colonkarzinom (A' – K') sowie der Karzinomzelllinie Caco-2 (A'' – K''). Die Färbung wurde an Aceton-fixiertem Gewebe bzw. Caco-2 Zellen durchgeführt. Die aufgezeigten Antikörper wiesen ein



der FACS-Messung entsprechendes Signal auf. **A** Immunhistochemische Färbung mit dem 58A2B11 Antikörper. Im gesunden Darmepithel wird das Mucin detektiert. **B** Positive Färbung mit dem 58B1A2 Antikörper. **C** Antikörperfärbung gegen CD13. **D** Immunhistochemische Färbung mit dem CD107a Antikörper. **E** Antikörperfärbung gegen CD318. **F** Immunhistochemie gegen CD326. **G** Immunhistochemie gegen SSEA-1. Im Normalgewebe werden Epithelzellen aus dem unteren Bereich der Darmkrypte detektiert (**G**). Colonkarzinomzellen und die Caco-2 Zelllinie sind für diesen Antikörper negativ (**G'**, **G''**). **H** Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper W3D5A9. Das Normalgewebe (**H**) sowie das Colonkarzinom (**H'**) scheinen nicht gefärbt zu sein. Die Caco-2 Zellen zeigen jedoch ein positives Signal (**H''**). **I** Antikörperfärbung mit W4A5. Es sind alle Epithelzellen des Normalgewebes (**I**), des Colonkarzinoms (**I'**) und der Zelllinie gefärbt (**I''**). **J** Immunhistochemische Färbung mit dem W5C5A8 Antikörper. **K** Immunhistochemie mit dem W5D3 Antikörper. Alle drei Färbungen sind negativ. Größenbalken: 100 μ m.

58A2B11 scheint bei dem Normalgewebe das Mucin in den Vakuolen der Becherzellen zu erkennen (Abbildung 13A). Das Colonkarzinomgewebe und die Zelllinie wiesen nur eine schwache Färbung auf. 58B1A2 und CD13 zeigten bei der FACS-Analyse mit einer Papain-Zellvereinzelung bei dem Primärgewebe keine Färbung, unter Verwendung der Collagenase konnte jedoch ein Signal detektiert werden (Abbildung 11). Diese positive Bindung des Antikörpers an das Darmepithel konnte mit der Immunhistochemie bestätigt werden (Abbildung 13B, C). CD13, W4A5 und W5C5A8 wiesen bei der Immunhistochemie eine einheitliche Färbung des Epithels auf (Abbildung 13C, I, J), in der FACS-Analyse zeigten jedoch nur wenige Zellen ein positives Signal (Abbildung 10). CD107a, CD318 und CD326 banden an alle Zellen des Darmepithels, an die Epithelzellen des Colonkarzinoms sowie an die Caco-2 Zellen (Abbildung 13D, E, F). Eine SSEA-1-Bindung konnte nur bei dem primären Darmepithel nachgewiesen werden. Es wurden Zellen aus dem unteren Bereich der Darmkrypte angefärbt (Abbildung 13G). In keiner der sechs untersuchten Colonkarzinomproben lies sich ein SSEA-1-Signal beobachten. W3D5A9 konnte, wie bei der FACS-Analyse, nur bei den Caco-2 Zellen detektiert werden (Abbildung 13H). Das Karzinom war ebenfalls negativ. W5D3 zeigte wie bei den FACS-Ergebnissen keinerlei Signal (Abbildung 13K).

In Abbildung 14 sind drei immuncytochemische Färbungen mit den Antikörpern 3D6C9, CD324 und W1C3 an der Caco-2 Zelllinie dargestellt, die mit der FACS-Messung übereinstimmten. Alle drei Antikörper waren sowohl bei der FACS-Analyse als auch bei der Immuncytochemie positiv. Vergleicht man jedoch diese zwei Methoden bei primär isolierten Darmepithelzellen bzw. humanem Colongewebe, so zeigte sich kein Signal bei der FACS-Analyse, jedoch eine positive Färbung in der Immunhistochemie.

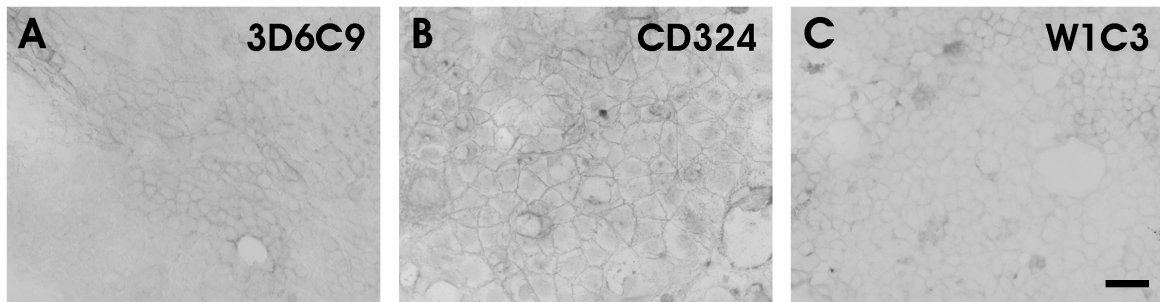


Abbildung 14: Immuncytochemische Charakterisierung mit aus der FACS-Analyse positiven Antikörpern an der Karzinomzelllinie Caco-2. Die Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und mit Aceton fixiert. Die aufgezeigten Antikörper wiesen bei den Caco-2 Zellen ein der FACS-Messung entsprechendes Signal auf. **A** Immuncytochemische Färbung mit dem 3D6C9 Antikörper. **B** Antikörperfärbung gegen CD324. **C** Immuncytochemie mit dem W1C3 Antikörper. Größenbalken: 50 μm .

Die immunhistochemischen Färbungen der Antikörper 57D2 und W5C4 sowie die Färbung von primären Epithelzellen für die FACS-Analyse zeigten positive Signale. Die FACS-Analyse weist jedoch darauf hin, dass eine Population von Zellen angefärbt sein müsste. In der Immunhistochemie ist nur eine einheitliche Färbung des Epithels zu erkennen. Außerdem wiesen diese zwei Antikörper bei der FACS-Messung der Caco-2 Zellen eine Antikörperreaktion auf. In der Immuncytochemie konnte jedoch keine Färbung festgestellt werden.

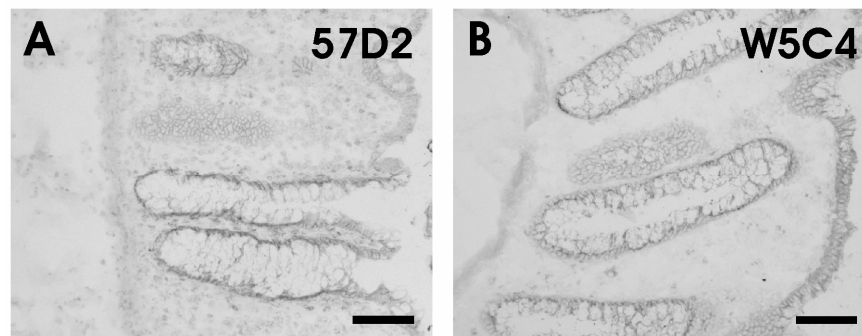


Abbildung 15: Immunhistochemische Charakterisierung mit aus der FACS-Analyse positiven Antikörpern an humanem Colongewebe. Die Fixierung wurde mit Aceton durchgeführt. Die Immunhistochemische Färbung entspricht dem Ergebnis aus der FACS-Messung. **A** Immunhistochemie mit dem 57D2 Antikörper. **B** Immunhistochemische Färbung mit dem W5C4 Antikörper. Größenbalken: 100 μm .

Ein ähnliches Ergebnis konnte bei den Caco-2 Zellen mit den Antikörpern 103B2, CD164, W3A4 und W7C6F10 beobachtet werden. Auch sie zeigten bei der FACS-Analyse ein deutliches Signal, waren bei der Immunocytochemie jedoch nicht gefärbt. Die isolierten humanen Epithelzellen bzw. das Colongewebe zeigten bei dem Antikörper CD164 das gleiche Resultat. Die FACS-Analyse ergab ein positives Signal während sich die Immunhistochemie für diesen Antikörper als negativ herausstellte.

Die Antikörper 103B2C2, W3A4 und W7C6F10 wiesen bei den isolierten Darmepithelzellen in der FACS-Analyse kein Signal auf, die immunhistochemischen Färbungen liesen sich jedoch positiv detektieren.

Die unterschiedlichen Ergebnisse beim Vergleich der FACS- mit den immunhistologischen Analysen könnten mit den möglichen Veränderungen der Epitope aufgrund der Fixierung, Trocknung oder enzymatischen Behandlung der Proben in Zusammenhang stehen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse kann aus Tabelle 2 entnommen werden. Bei dieser wurden die FACS-Messung und die Immunhistochemie der verschiedenen Antikörper miteinander verglichen und zusammenfassend dargestellt.

Antikörper	Caco-2 Zelllinie		Humanes Darmgewebe	
	FACS	IHC	FACS	IHC
103B2C2	+	-	-	+
3D6C9	+	+	-	+
57D2	+	-	+	+
58A2B11	+	+	+	+
58B1A2	+	+	+*	+
CD13	+	+	+*	+
CD107a	+	+	+	+
CD164	+	-	+	-
CD318	+	+	+	+
CD324	+	+	-	+
CD326	+	+	+	+
SSEA-1	-	-	+	+
W1C3	+	+	-	+
W3A4E2	+	-	-	+
W3D5A9	+	+	-	-
W4A5	+	+	+	+
W5C4	+	-	+	+
W5C5A8	+	+	+	+
W5D3	-	-	-	-
W7C6F10	+	-	-	+

Tabelle 2: Darstellung der aus der FACS-Analyse und Immunhistochemie erhaltenen Ergebnisse. Übereinstimmende Ergebnisse sind weiß hinterlegt, widersprüchliche Ergebnisse grau. IHC = Immunhistochemie, + positives Signal, - kein Signal. *Es wurde das Ergebnis aus der FACS-Analyse mit Collagenase-Verdau angegeben.

3.4 Lebendfärbung humaner Darmkrypten aus dem Colon mit dem SSEA-1-Antikörper

Wie in Abbildung 13 gezeigt wurde, detektiert der SSEA-1 Antikörper in der Immunhistochemie Zellen im unteren Bereich der Darmkrypte, in dem sich die Stamm- und Vorläuferzellen befinden. Eine Lebendfärbung von mit EDTA isolierten Krypten bestätigte, dass SSEA-1 den unteren Kryptenbereich anfärbt (Abbildung 16).

In einem späteren Versuch konnte im Dünndarm ebenfalls ein SSEA-1 positives Signal in der Kryptenbasis nachgewiesen werden (Abbildung 17).

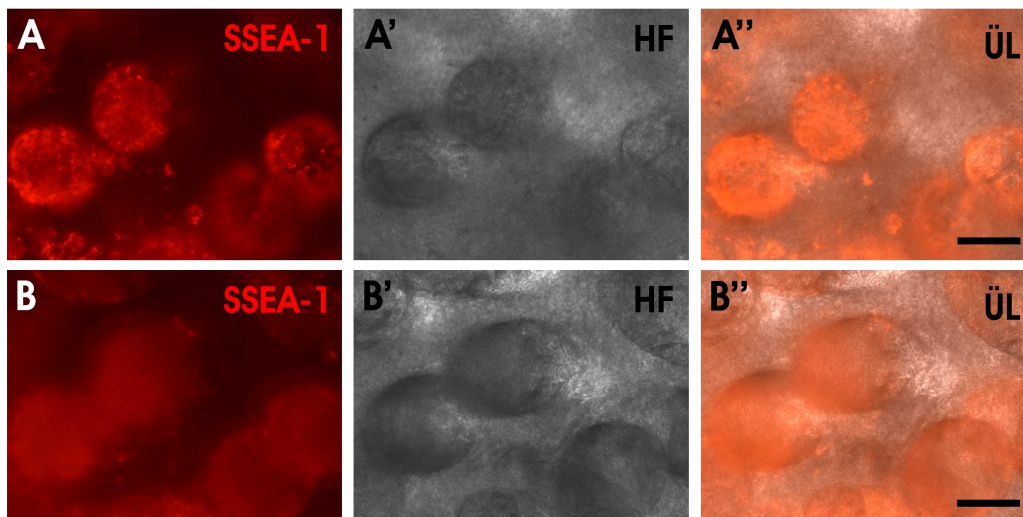


Abbildung 16: Lebendfärbung von Krypten aus humanem Colon mit dem Oberflächenantikörper SSEA-1. **A** Immuncytochemie gegen SSEA-1. Der Focus ist auf die Kryptenbasis gerichtet. **A'** Hellfeldaufnahme. **A''** Überlagerung der Immuncytochemie mit der Hellfeldaufnahme. **B** Immuncytochemische Färbung mit dem SSEA-1 Antikörper. Der Focus ist auf die ausdifferenzierten Zellen, die sich in Richtung Darmlumen befinden, gerichtet. **B'** Hellfeldaufnahme. **B''** Überlagerung der Immuncytochemie mit der Hellfeldaufnahme. Größenbalken: 200 μ m.

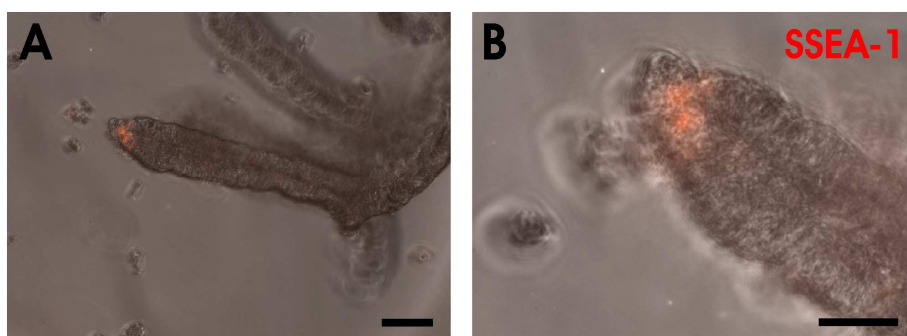


Abbildung 17: Lebendfärbung von Krypten aus humanem Dünndarm mit dem Oberflächenantikörper SSEA-1. **A** Immuncytochemie gegen SSEA-1. Es ist eine Überlagerung der Immuncytochemie mit der Hellfeldaufnahme zu sehen. **B** Stärkere Vergrößerung aus **A**. Größenbalken: 50 μ m in **A**, 25 μ m in **B**.

3.5 Zellzyklusanalyse von SSEA-1 positiven Zellen

In der Immunhistochemie und bei der Lebendfärbung von isolierten Krypten konnte gezeigt werden, dass der SSEA-1-Antikörper an Darmepithelzellen aus der unteren Region der Darmkrypte, in der sich die Stamm- und Vorläuferzellen befinden, bindet. Da zu vermuten ist, dass ein hoher prozentualer Anteil dieser Zellen proliferiert, wurde eine Cofärbung mit Propidiumiodid zur Zellzyklusanalyse durchgeführt. Diese zeigte, dass sich 15,89 % aller SSEA-1 positiv gefärbten Zellen in der S- bzw. M/G2-Phase befinden. Im Vergleich dazu sind nur 4,01 % der SSEA-1 negativen Zellen in der Proliferationsphase (Abbildung 18D, E).

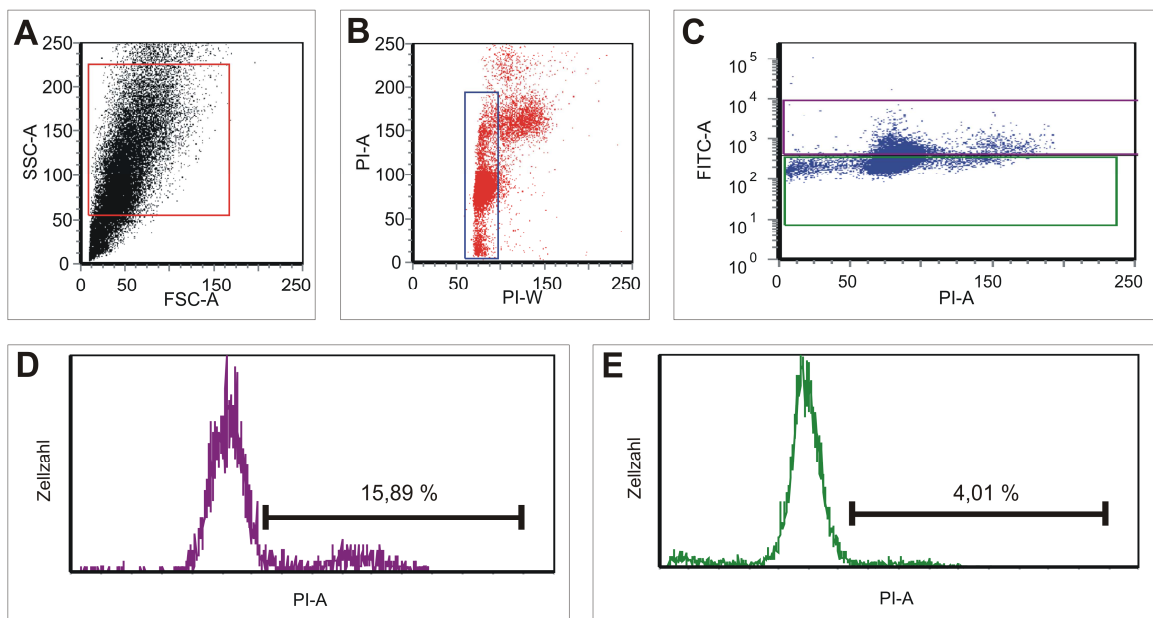


Abbildung 18: Zellzyklusanalyse mit isolierten Darmepithelzellen. Die primär isolierten Zellen wurden zunächst mit dem SSEA-1-Antikörper gefärbt und nach erfolgter Fixierung mit einer PI-/RNAse-Lösung inkubiert. **A** Scatterplot. Die rot gegateten Zellen werden in **B** aufgezeigt. **B** PI-positive Zellen. Es werden Einzelzellen ausgewählt (blau) und in **C** aufgezeigt. Dubletten werden dadurch bei der Analyse ausgeschlossen. **C** SSEA-1 gefärbte Zellen in Kombination mit PI. Es wurden anhand der Negativkontrolle die positiven (violett) und negativen Zellen (grün) gegatet. **D** PI-Färbung der SSEA-1 positiven Zellen aufgetragen gegen die Zellzahl. Der Messbalken beschreibt Zellen aus der S- bzw. M/G2-Phase. **E** PI-Färbung der SSEA-1 negativen Zellen.

3.6 Isolation der Stamm- und Vorläuferzellen des Darmepithels mit MACS

Zur Charakterisierung der SSEA-1 positiven Stamm- und Vorläuferzellen wurde die Isolation dieser Zellen unter Verwendung der MACS-Methode etabliert. Nach erfolgtem Präparieren der Mucosa wurde diese in 2 mM EDTA inkubiert und die Krypten herausgespült. Thermolysin zeigte sich hier als ungeeignet, da das SSEA-1 Antigen nach der Thermolysinbehandlung vom Antikörper nicht mehr erkannt wurde. Die anschließende Zellvereinzellung der Krypten wurde mit einer Papain-Behandlung vor der MACS-Isolation durchgeführt.

Die Zellen wurden zur besseren Aufreinigung zweimal über eine MACS-Säule gegeben (Abbildung 19). Nach erfolgter Isolation wurde zur Kontrolle eine FACS-Analyse durchgeführt (Abbildung 20).

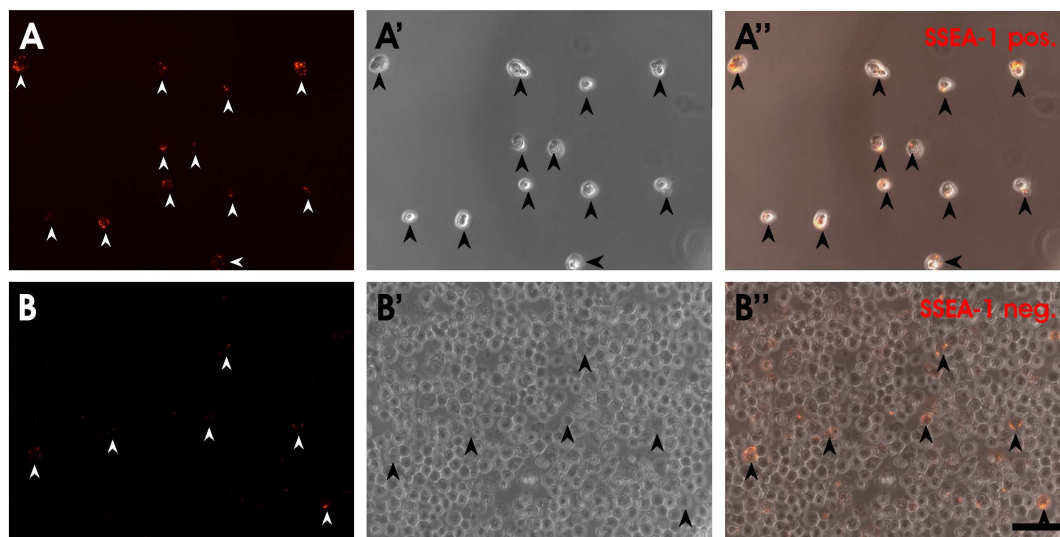


Abbildung 19: SSEA-1 positive (A) und negative (B) Zellen, die mit MACS sortiert wurden. A SSEA-1 positive Zellen (Pfeile). A' Hellfeldaufnahme. A'' Überlagerung von A und A'. B SSEA-1 negativ isolierte Zellen. Es sind ebenfalls wenige SSEA-1 positive Zellen vorhanden (Pfeile). B' Hellfeldaufnahme. B'' Überlagerung von B und B'. Größenbalken: 50 µm.

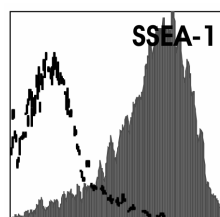


Abbildung 20: FACS-Analyse von MACS isolierten SSEA-1 positiven Zellen (rot). 79,03 % aller SSEA-1 isolierten Zellen zeigten ein positives Fluoreszenzsignal.

3.7 Etablierung eines Organkulturmodells

Um isolierte Epithelzellen im dreidimensionalen Gewebeverband charakterisieren zu können, wurden Organkulturmodelle aus murinem, adultem oder fötalem Darm etabliert, die auf Milliporemembranen kultiviert wurden (Abbildung 21).

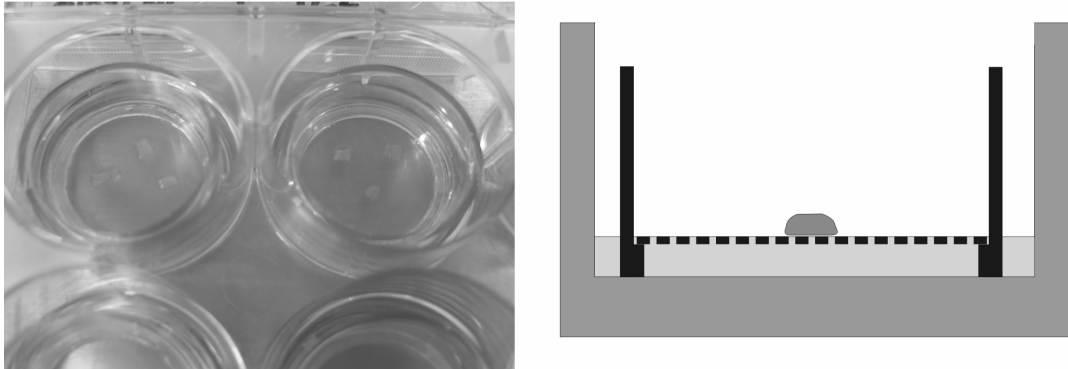


Abbildung 21: Kultivierungsprinzip der Organkulturmodelle aus adultem und fötalem Darm der Maus. Die Gewebestücke wurden auf Milliporemembranen an der Luft-Medium-Grenze kultiviert.

3.7.1 Das organotypische Gewebekulturmodell von adultem, murinem Colon

Die dreidimensionalen Gewebeproben von adultem Mäusecolon wurden bis zu vier Wochen auf Membraneinsätzen kultiviert (Abbildung 22A, D). Der Hauptteil des Epithels degenerierte *in vitro* nach drei Tagen und wurde anschließend komplett erneuert. Nach dieser epithelialen Reorganisation bedeckte ein neues hochprismatisches Epithel die Oberfläche der Gewebekultur und bildete Krypten-ähnliche Strukturen (Abbildung 22A – C). Die Hälfte der Explantate zeigte innerhalb der ersten sechs Kultivierungstage ein gut erhaltenes Gewebe, das eine Epithelium-spezifische Oberfläche aufwies. Nach dieser Kultivierungszeit konnten einige proliferierende Epithelzellen mit Hilfe eines BrdU-Proliferationsassays detektiert werden (Abbildung 23C). Die Qualität der Epithelzellen nahm zwischen der 3. und 4. Kultivierungswoche aufgrund der reduzierten Regenerationskapazität des Epithels und einem Verlust an Epithelzellen ab. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine BrdU-positiven Epithelzellen mehr identifiziert werden.

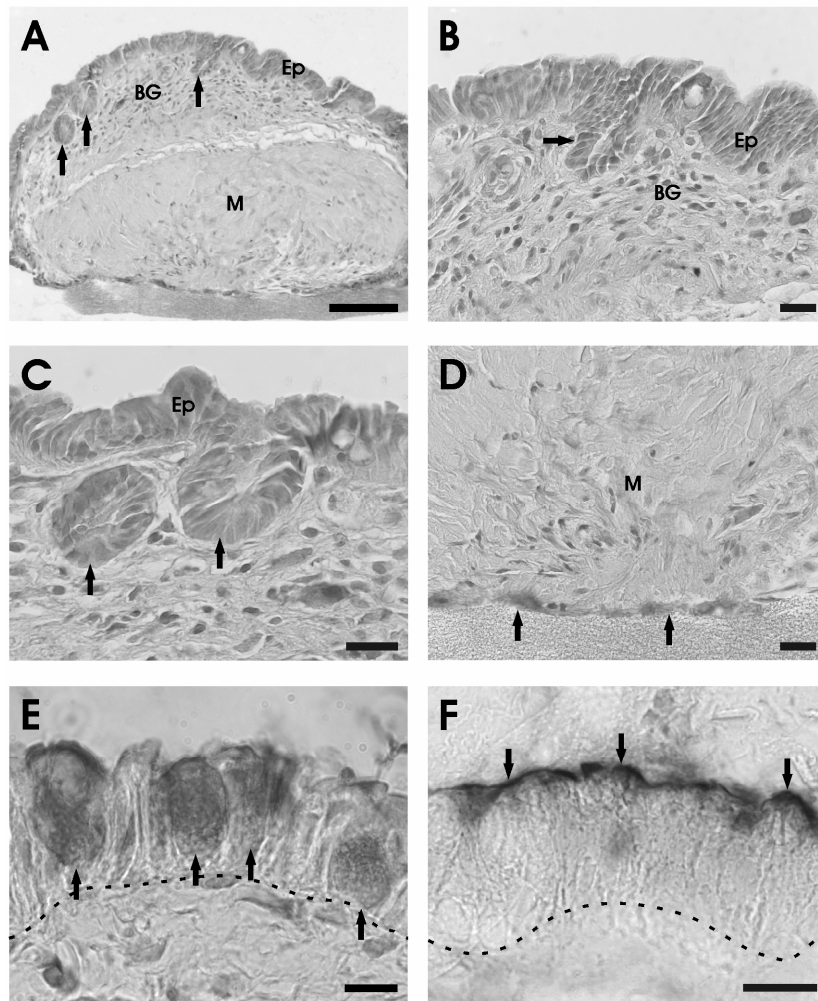
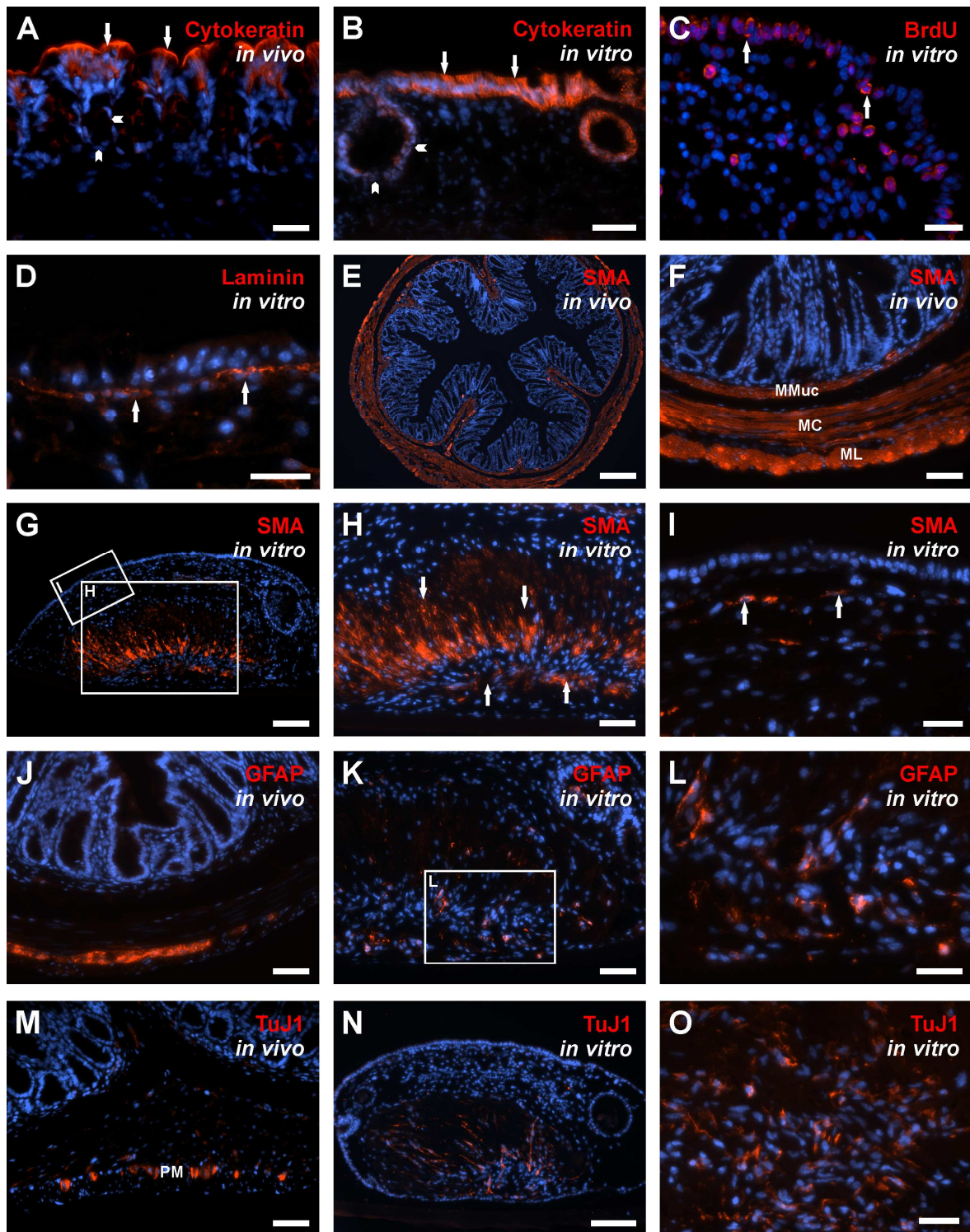


Abbildung 22: Histologische und histochemische Charakterisierung des intestinalen Gewebekulturmodells mit Hämatoxylin (A - D), Alcianblau (E) und alkalischer Phosphatase (F). A zeigt einen Überblick eines Paraffinschnittes von einer sechs Tage kultivierten Organkultur. Die Kultur weist ein hochprismatisches Epithel (Ep) mit Krypten-ähnlichen Strukturen (Pfeile), Bindegewebe (BG) und glatter Muskulatur (M) auf. B, C Vergrößerung aus A. Die Pfeile zeigen zu den Krypten-ähnlichen Strukturen des Epithels. D Vergrößerung von A aus dem unteren Bereich der Kultur. Die Pfeile markieren den Untergrund der Kultur auf der Millipore-Membran. E Starke Vergrößerung hochprismatischer Enterozyten und Alcianblau-gefärbter Becherzellen (Pfeile) aus nach neun Tagen kultiviertem Gewebe. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze des Epithels. F Die apikale alkalische Phosphatase Aktivität demonstriert die Polarität der Enterozyten (Pfeile). Die gestrichelte Linie markiert das abgrenzende Epithel. Größenbalken: 100 µm in A; 50 µm in B; 20 µm in C, D, F; 10 µm in E.

Abbildung 23: Immunhistologische Charakterisierung der organotypischen Kultur verglichen mit adultem Darm der Maus. A, B Cytokeratinfärbung epithelialer Zellen auf Paraffinschnitten von adultem Mäusedarm (rot, A) und von der Gewebekultur (rot, B); DAPI (blau). Die Pfeile weisen auf die stark gefärbten differenzierten Epithelzellen. Im Gegensatz dazu zeigen die undifferenzierten Zellen nur eine schwache Färbung (Pfeilspitzen). C Proliferierende Epithelzellen konnten durch Immunhistochemie gegen BrdU (rot) nach sechs Tage Kultivierung detektiert werden; DAPI (blau). D Immunfluoreszenz gegen Laminin auf Paraffinschnitten der Gewebekultur. Die Pfeile zeigen auf die Laminin-gefärbte Basalmembran. E – I Immunfluoreszenz SMA (smooth muscle actin) gegen glatte Muskelzellen auf Schnitten von adultem Mäusedarm (rot; E, F) und der Gewebekultur (rot; G – I); DAPI (blau). Im Darmschnitt können die verschiedenen Muskelschichten unterschieden werden: Muscularis longitudinalis (ML), Muscularis circularis (MC) und Muscularis mucosae (MMuc).



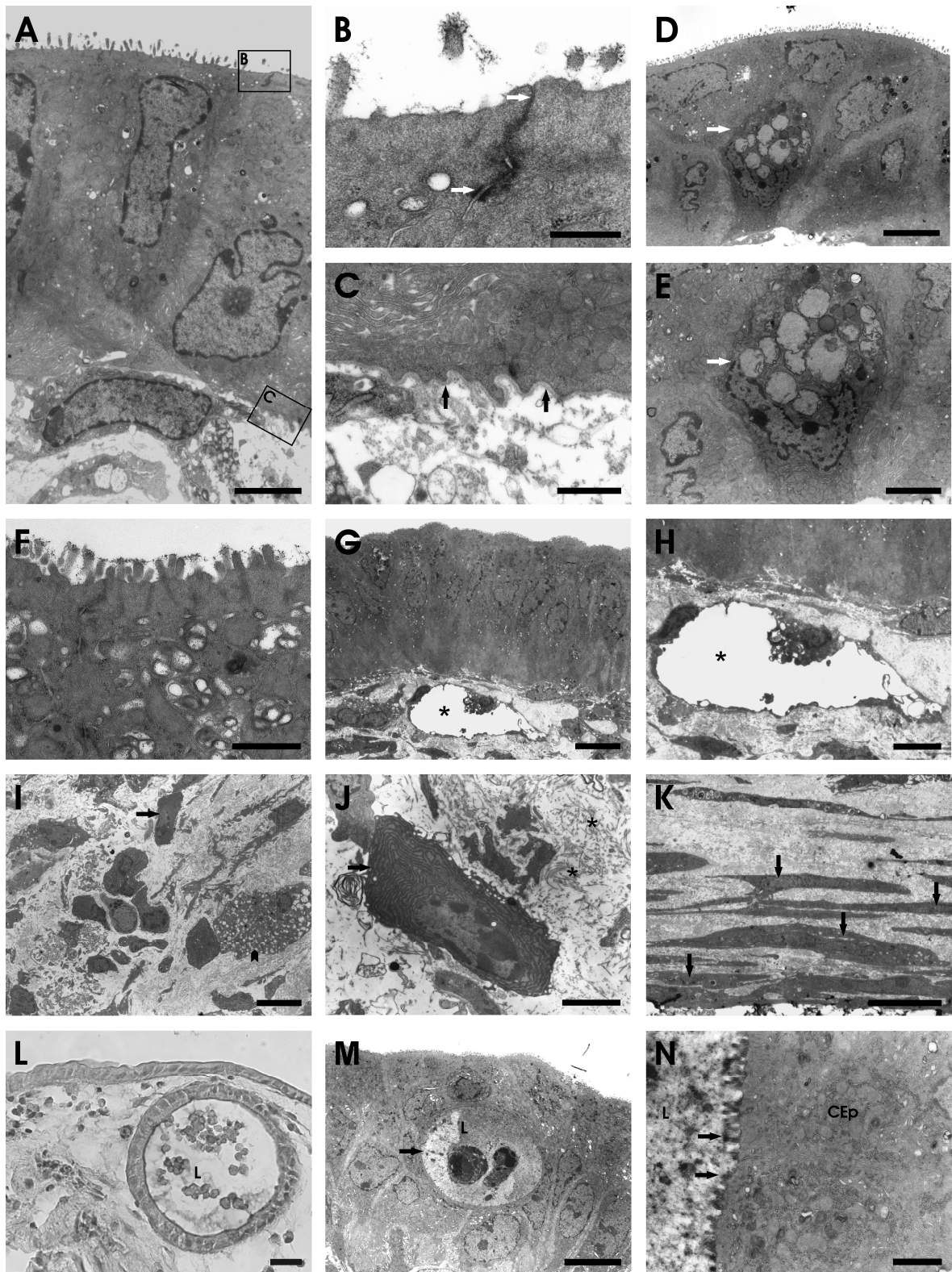
E Übersicht. **F** Stärkere Vergrößerung aus **E**. Im *in vitro* Modell befindet sich der Großteil der positiv gefärbten Zellen (Pfeile) im unteren Bereich der Kultur (**G**, **H**). **G** Übersicht der Gewebekultur. **H** Stärkere Vergrößerung aus **G**. **I** Es konnten vereinzelt positiv gefärbte glatte Muskelzellen (Pfeile) im oberen Bereich der Kultur detektiert werden. **J – L** Immunfluoreszenz gegen Gliazellen mit dem Antikörper GFAP (glial fibrillary acidic protein) im adulten Mäusedarm (rot; **J**) und in der Gewebekultur (rot, **K**, **L**); DAPI (blau). **J** GFAP positive Zellen im adulten Mäusedarm. **K** Übersicht der Gewebekultur. **L** Stärkere Vergrößerung aus **K**. **M – O** β -Tubulin III (TuJ1) Immunfluoreszenz von Neuronen *in vivo* (rot; **M**) und *in vitro* (rot; **N**, **O**); DAPI (blau). **M** TuJ1-exprimierende Zellen im Plexus Myentericus (PM) des adulten Mäusedarms. **N** Übersicht der Gewebekultur. **O** Stärkere Vergrößerung von TuJ1 positiven Zellen. Größenbalken: 200 μ m in **E**; 100 μ m in **B**, **F**, **H**, **J**, **K**, **M**; 50 μ m in **A**, **C**, **D**, **I**, **L**, **O**.

Die immunhistochemische Charakterisierung der Gewebekulturen wurde im Vergleich zu nativem Mäusedarm durchgeführt (Abbildung 23). Die Epithelzellen wurden mit Cytokeratin immunhistologisch gefärbt (Abbildung 23B). Die alkalische Phosphatase Aktivität an der apikalen Seite der Epithelzellen wurde histochemisch nachgewiesen (Abbildung 22F). Ausdifferenzierte Becherzellen konnten mit Hilfe einer Alcianblaufärbung und der Transmissionselektronenmikroskopie dargestellt werden (Abbildung 22E, Abbildung 24D, E). Die Laminin positive Basalmembran zeigte die Grenze zwischen dem Epithel und dem darunterliegenden Bindegewebe (Abbildung 23D). Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizierten Mikrovillistrukturen an der apikalen Oberfläche von hochprismatischen Epithelzellen (Abbildung 24A, B, F). Weiterhin konnten für das Epithel typische Tight Junctions und Desmosomen des epithelialen Schlussleistenkomplexes sowie eine gut organisierte Basallamina detektiert werden (Abbildung 24B, C, F).

Das Bindegewebe zeigte charakteristische Kollagenfasern, Fibroblasten (Abbildung 24I, J) und glatte Muskelzellen (Abbildung 24K). Eine Immunhistochemie für smooth muscle actin (SMA) demonstrierte hauptsächlich im unteren Teil der Gewebekultur eine definierte Orientierung der Muskelzellen (Abbildung 23G – I). Weiterhin konnten β -Tubulin III positive enterische Neurone (Abbildung 23M – O) und GFAP exprimierende Gliazellen (Abbildung 23J – L) nachgewiesen werden. Interessanterweise liesen sich auch lymphatisch-ähnliche Gefäßstrukturen sowie Mastzellen-ähnliche Zellen durch die Transmissionselektronenmikroskopie detektieren (Abbildung 24G – I).

Neben den kleinen Krypten-ähnlichen Strukturen wurden auch große, darmuntypische Zysten-ähnliche Formen beobachtet. Diese sich in den Kulturen entwickelnden Zysten wiesen ein nach innen gerichtetes Epithel auf (Abbildung 24L – N).

Abbildung 24: Charakterisierung der adulten Gewebekultur mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie. **A** Einschichtiges hochprismatisches Epithel mit darunter liegendem Myofibroblasten. **B** Stärkere Vergrößerung aus **A** von den epithelialen Zell-Zell-Kontakten. Die Pfeile weisen auf die Tight junctions und Desmosomen des junctionalen Komplexes. **C** Stärkere Vergrößerung der Basalmembran (Pfeile) aus **A**. **D, E** Die Pfeile markieren eine Becherzelle im Epithel der Gewebekultur. **F** Auf der apikalen Oberfläche des Epithels sind Mikrovilli zu erkennen. **G** Lymphatisch-



ähnliches Gefäß im Bindegewebe unterhalb des Epithels. Der Stern markiert das Lumen des Gefäßes. **H** Stärkere Vergrößerung aus **G**. **I** Fibroblasten (Pfeil) und wenige Mastzellen-ähnliche Zellen (Pfeilspitze) im Bindegewebe. **J** Höhere Vergrößerung aus **I**. Der Pfeil weist auf eine Fibroblasten-ähnliche Zelle. Die Sternchen deuten auf Kollagenfasern. **K** Muskelzellen (Pfeile) aus dem unteren Teil der Kultur. **L** Hämatoxylin und Alcianblau Färbung einer Zysten ähnlichen Struktur. Sie zeigt ein Lumen (L) mit toten Zellen. **M** Transmissionselektronenmikroskopie einer sich neu entstehenden Zyste im Epithel. **N** Stärkere Vergrößerung einer Zysten-ähnlichen Struktur. Die Pfeile weisen auf Mikrovilli in der epithelialen Zyste (CEp). Größenbalken: 20 μm in **L**; 10 μm in **G**, **I**, **K**, **M**; 5 μm in **D**, **H**; 3 μm in **A**, **E**, **F**, **J**; 1,5 μm in **N**; 1 μm in **C**; 0,5 μm in **B**.

SGK1 mRNA Expression in epithelialen Zellen der Gewebekultur nach Dexamethasonbehandlung

Bereits in früheren Studien wurde demonstriert, dass eine Behandlung von Mäusen mit Dexamethason die Expression der SGK1 mRNA im Epithel des Dünndarms erhöht (Grahammer et al. 2006).

Zur Evaluierung des *in vitro* Modells wurde untersucht, ob dieser durch Dexamethason verursachte Effekt *in vivo* auf das Kultursystem übertragen werden kann. Hierfür wurde die SGK1 mRNA Expression durch *in situ* Hybridisierungen auf Kryostatschnitten von adultem murinem Colon und der Gewebekultur durchgeführt. Die Kulturen wurden acht Stunden mit 100 nM Dexamethason inkubiert, die Mäuse erhielten eine Injektion mit Dexamethason von 10 µg/g Körpergewicht für ebenfalls acht Stunden. In beiden Epithelien, vom adulten Mäusedarm *in vivo* (Abbildung 25B, E) und der Gewebekultur *in vitro* (Abbildung 25G, H), konnte im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe (Abbildung 25A, D, F) ein starker Anstieg der SGK1 mRNA Expression nach erfolgter Dexamethasonbehandlung festgestellt werden. Die Sensekontrolle zeigte kein Signal (Abbildung 25C).

Infektion der Gewebekultur mit *Candida albicans*

Candida albicans kommt natürlicherweise im Gastrointestinaltrakt vor und kann superfizielle Infektionen verursachen. Zur weiteren Evaluierung der Gewebekultur als Infektionsmodell wurden daher Infektionsexperimente mit zwei verschiedenen Candidastämmen (Wildtypstamm Candida 14, Knockoutstamm Candida 34 (Δ cph1/ Δ efg1)) durchgeführt. Im Gegensatz zum Wildtypstamm ist der Knockoutstamm nicht in der Lage auf Epithelzellen zu adhärerieren bzw. Zellen zu penetrieren (Dieterich et al. 2002).

Die Infektion der Gewebekulturen erfolgte nach zehn Tagen. Candidazellen des Wildtyps adhärirten bereits acht Stunden nach Infektion (Abbildung 26E) und penetrierten das Epithel nach 24 Stunden (Abbildung 26A – D). Der Candidastamm Can 34 war in keiner der analysierten Kulturen in der Lage an die Zelloberfläche zu adhäririeren (Abbildung 26I) oder die Epithelbarriere zu penetrieren (Abbildung 26F – H).

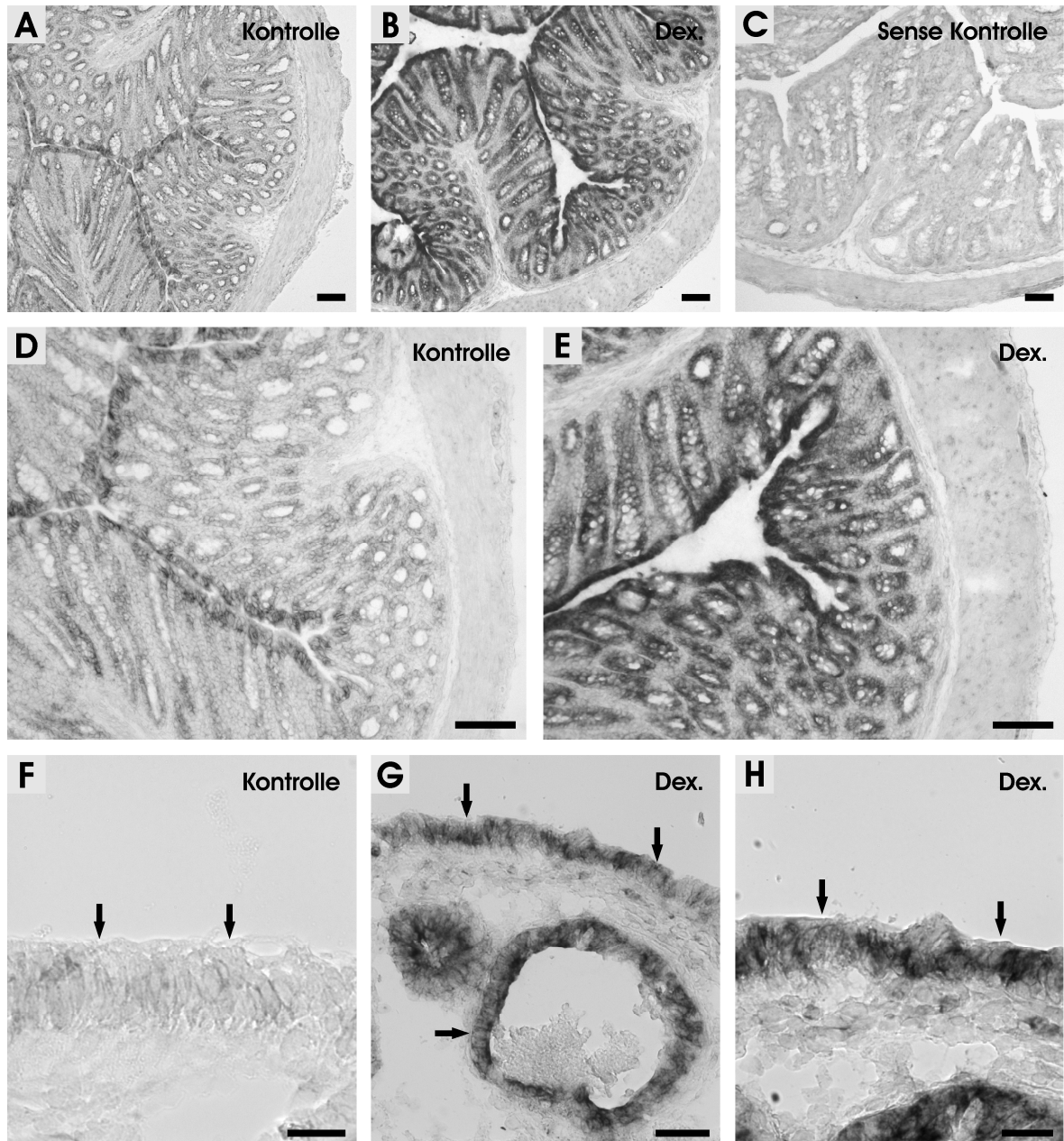


Abbildung 25: Erhöhte Expression der SGK1 mRNA in epithelialen Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Behandlung mit Dexamethason. *In situ* Hybridisierung für die SGK1 mRNA auf Kryostatschnitten vom Colon der adulten Maus (**A – E**) und von der Gewebekultur (**F – H**). **A** Übersicht der SGK1 mRNA Expression im Colon einer unbehandelten Maus. **B** Übersicht der SGK1 mRNA Expression im Colon einer Dexamethason behandelten Maus. **C** Sense Kontrolle. **D** Höhere Vergrößerung von **A**. **E** Stärkere Vergrößerung aus **B**. **F** *In situ* Hybridisierung für SGK1 mRNA im Epithel einer unbehandelten Gewebekultur. **G** Erhöhte SGK1 mRNA Expression nach einer Dexamethasonbehandlung. **H** Stärkere Vergrößerung aus **G**. Pfeile weisen auf das Epithel der Gewebekultur. Größenbalken: 100 μm in **A – E**; 50 μm in **G**; 25 μm in **F, H**.

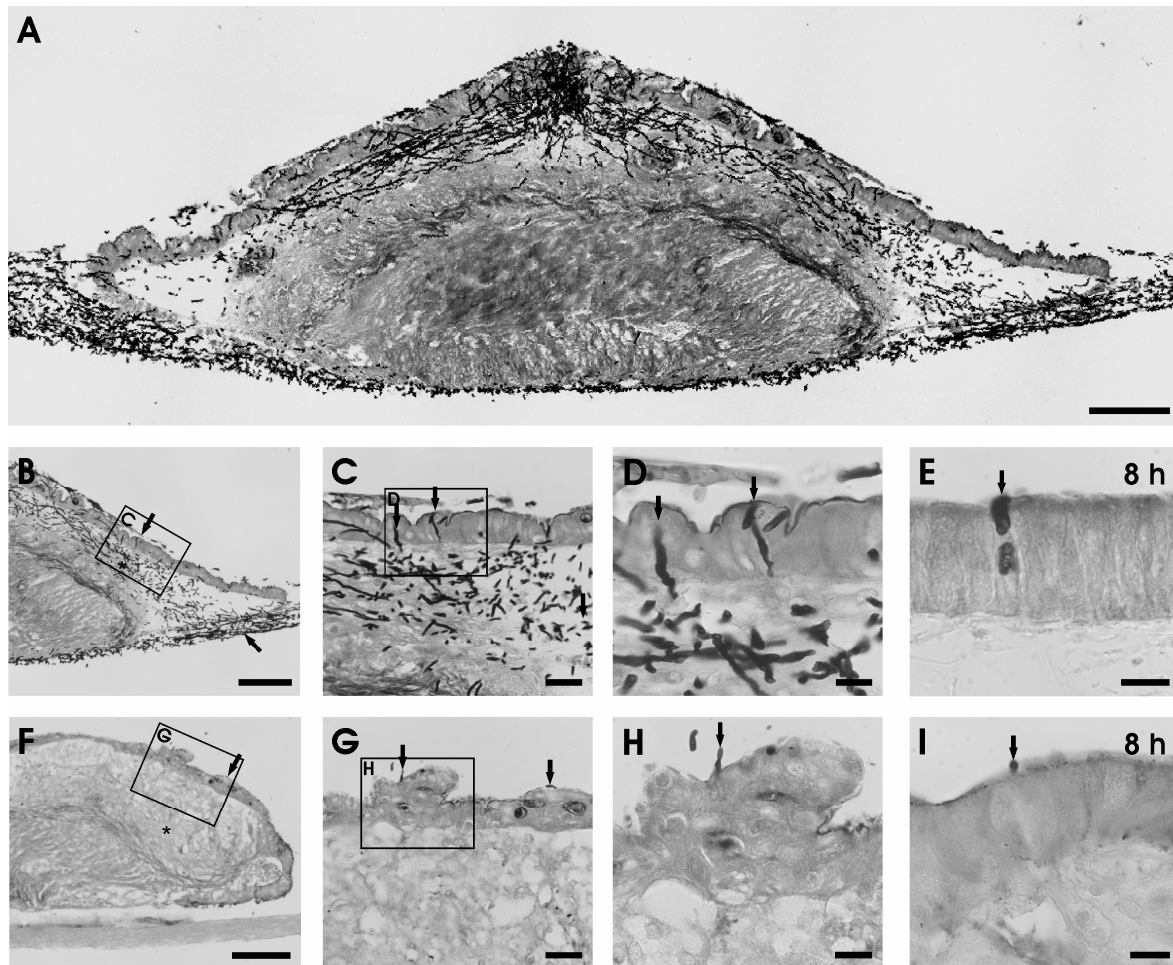


Abbildung 26: Infektion der Gewebekultur mit den *Candida albicans* Stämmen Can 14 (Wildtyp) und Can 34 ($\Delta\text{cph1}/\Delta\text{efg1}$) für 8 h und 24 h. Die Paraffinschnitte wurden gemäß dem Grocott Färbeprotokoll angefärbt. Im Gegensatz zu dem schwach gefärbten Mukus und den extrazellulären Komponenten (Sternchen) im Gewebe zeigen die *Candida albicans* Zellen ein charakteristisches und stark positives Signal. **A** Übersicht eines Paraffinschnittes von einer mit Can 14 inkubierten Gewebekultur nach 24 h. **B – D** Unterschiedliche Vergrößerungen einer Gewebekultur nach 24-stündiger Infektion mit Can 14. **B** Stärkere Vergrößerung aus **A**. **C** Höhere Vergrößerung aus **B**. **D** Vergrößerung aus **C**. **E** Can 14 Infektion nach 8 h. Der Pfeil markiert eine eindringende *Candida* Zelle. **F – H** Unterschiedliche Vergrößerungen einer Gewebekultur nach 24-stündiger Infektion mit Can 34. **G** Stärkere Vergrößerung aus **F**. **H** Höhere Vergrößerung aus **G**. **I** Can 34 Infektion nach 8 h. Der Pfeil deutet auf eine Zelle auf der Kulturoberfläche. Größenbalken: 100 μm in **A**, **B**, **F**; 25 μm in **C**, **G**; 10 μm in **D**, **E**, **H**, **I**.

3.7.2 Die dreidimensionale Schnittkultur von fötalem, murinem Colon

Die dreidimensionale Schnittkultur wurde, wie das oben beschriebene Kultivierungsmodell des adulten Darms der Maus, auf einer Millipore Membran für zwei Wochen kultiviert. Während dieser Kulturdauer konnte eine durchgehende autonome Kontraktion des Gewebes beobachtet werden. Es fand jedoch eine Lageveränderung der Kultur unmittelbar nach dem Schneiden mit dem Tissue chopper statt. Bei den ringförmigen Schnittkulturen befand sich zentral eine Öffnung, die dem ehemaligen Darmlumen entspricht. Aufgrund der internen Gewebespannung

kam es jedoch direkt nach dem Schneidevorgang zu einer Lageveränderung der Darmschichten. Während die Mucosa zur oberen, seitlichen Position gedreht wurde, fanden sich die Muskelschichten im unteren Kulturbereich. Im Laufe der zweiwöchigen Kultivierung konnte eine weitere Reorganisation beobachtet werden. Die Muskelzellen organisierten sich, ähnlich wie bei der adulten Organkultur, im unteren zentralen Bereich der Kultur. Das Schleimhautepithel bedeckte dabei die komplette Schnittkultur (Abbildung 28A). Die zentrale Öffnung schloss sich bereits nach wenigen Tagen und eignete sich daher besonders gut für Implantationsversuche (Abbildung 27).

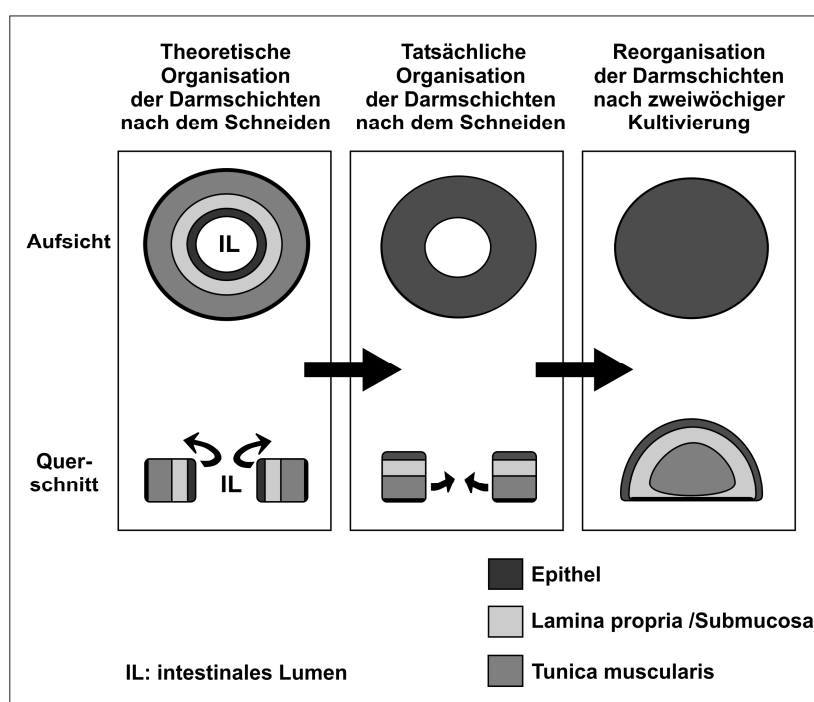


Abbildung 27: Schematische Darstellung zur Reorganisation der dreidimensionalen Schnittkultur des fötalen Darmes der Maus im Laufe der Kultivierung. Der linke Teil zeigt die theoretische Orientierung der Darmschichten nach dem Schneiden mit dem Tissue chopper in Aufsicht- und Querschnittsdarstellung. Im mittleren Teil der Abbildung ist die tatsächliche Orientierung dargestellt. Direkt nach dem Schneidevorgang kommt es zu einer Lageveränderung der intestinalen Schichten. Die Mucosa wird dabei zur oberen und seitlichen Position hin gedreht, während sich die Muskelschichten unten befinden. Der zellfreie Raum im Zentrum bleibt erhalten und kann für Zellimplantationen genutzt werden. Im rechten Abbildungsteil ist die Reorganisation der Gewebszellen nach sieben tägiger Kulturdauer abgebildet. Der zentrale freie Raum ist verschwunden und die epithelialen Zellen bedecken die Gesamtoberfläche der Kultur. Die Muskelzellen sind nun im mittleren unteren Bereich der Kultur lokalisiert.

Die Schnittkulturen wurden histologisch, immunhistochemisch und mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert. Dabei zeigte sich, ähnlich wie bei der adulten Gewebekultur, ein für Cytokeratin positives, hochprismatisches Epithel (Abbildung 29A) mit Mikrovilli an der

apikalen Oberfläche (Abbildung 30A, B, C, E). Das Epithel wies das typische Schlussleistennetz (Abbildung 30D) sowie eine darunter liegende Basallamina (Abbildung 30E) auf. Es konnten außerdem eingelagerte Becherzellen beobachtet werden (Abbildung 28). Das Epithel zeigte teilweise kryptenähnliche Strukturen, in denen auch proliferierende Zellen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 29B, C). Im unteren Bereich der Kultur befand sich der für SMA (smooth muscle actin) positive muskuläre Anteil der Kultur (Abbildung 29D) mit eingelagerten Gliazellen (Abbildung 29E) und Neuronen (Abbildung 29F).

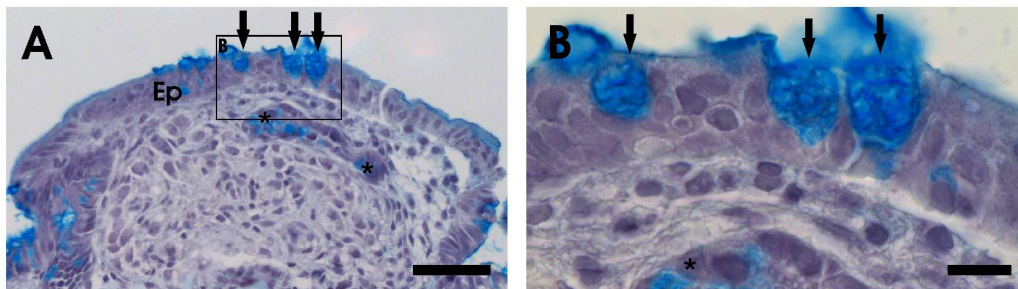


Abbildung 28: Histologische Charakterisierung des fötalen Gewebekulturmodells mit Hämatoxylin und Alcianblau. **A** zeigt einen Überblick eines Paraffinschnittes. Die Kultur weist ein hochprismatisches Epithel (Ep) mit Becherzellen (Pfeile) und krypten-ähnlichen Strukturen (Sterne) auf. **B** Vergrößerung aus **A**. Größenbalken: 50 µm in **A**; 10 µm in **B**.

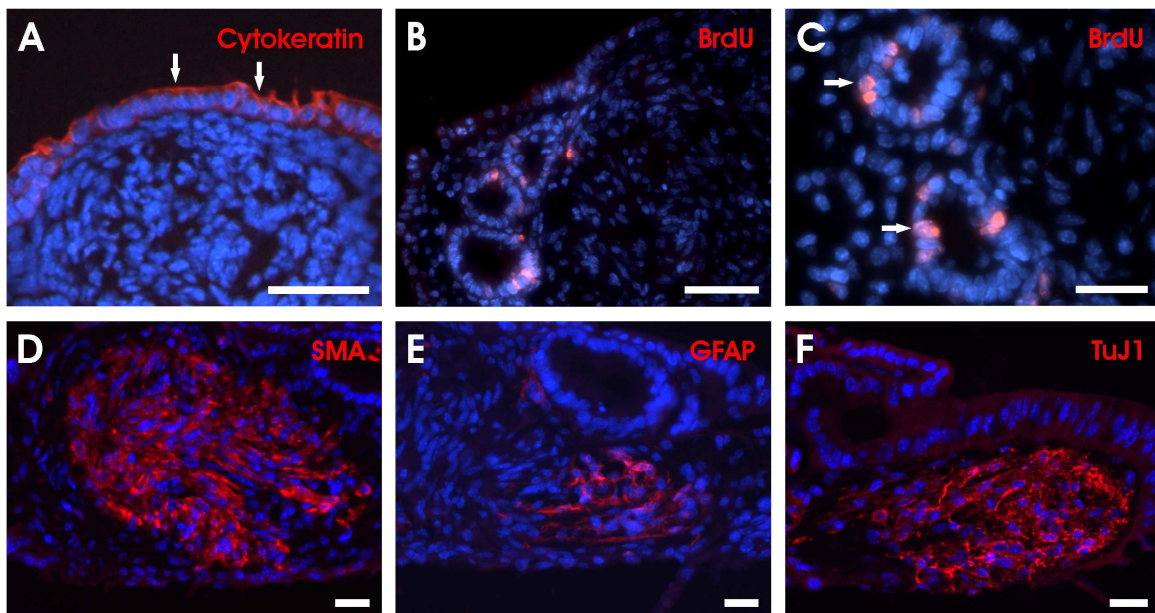


Abbildung 29: Immunhistologische Charakterisierung der organotypischen Kultur. **A** Cytokeratinfärbung epithelialer Zellen auf Paraffinschnitten von der Gewebekultur (rot, **A**); DAPI (blau). Die Pfeile weisen auf die stark gefärbten Epithelzellen. **B, C** Proliferierende Epithelzellen konnten durch Immunhistochemie gegen BrdU (rot) detektiert werden; DAPI (blau). **C** Stärkere Vergrößerung krypten-ähnlicher Strukturen mit BrdU-positiven Zellen (Pfeile) **D** Immunfluoreszenz gegen glatte Muskelzellen (rot); DAPI (blau). **E** Immunfluoreszenz gegen Gliazellen mit dem Antikörper GFAP (glial fibrillary acidic protein, rot); DAPI (blau). **F** β -Tubulin III (TuJ1) Immunfluoreszenz von Neuronen (rot); DAPI (blau). Größenbalken: 50 µm in **A, B**; 25 µm in **C**; 20 µm in **D, E, F**.

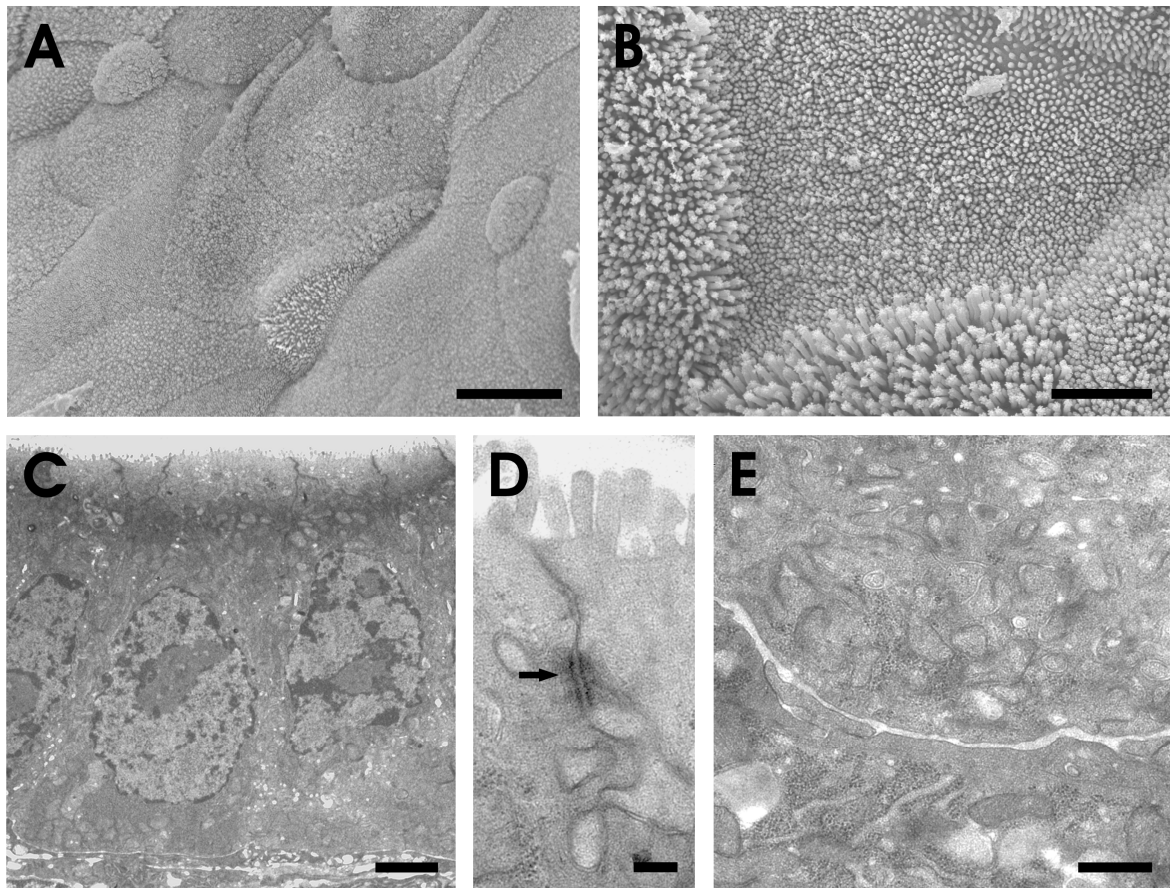


Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische (**A**, **B**) und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (**C** – **E**) der fötalen Schnittkultur von murinem Colon, die für 14 Tage kultiviert wurde. **A** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des epithelialen Zellverbands. **B** Vergrößerte Darstellung der Mikrovilli-tragenden Oberflächenepithelzellen. **C** Einschichtiges hochprismatisches Epithel. **D** Darstellung des Schlussleistennetzes bestehend aus Tight Junctions und Desmosomen (Pfeil). **E** Zeigt die unter dem Epithel befindliche Basallamina. Größenbalken: 2 µm in **A**, **C**; 1 µm in **B**; 0,5 µm in **E**; 0,2 µm in **D**.

Implantation von Caco-2 Zellen in die intestinale Schnittkultur

Die Schnittkultur eignet sich aufgrund der zu Beginn zentralen Öffnung besonders gut für Implantationsversuche. Es wurden daher 2000 Zellen der Caco-2 Zelllinie (Abbildung 31A) in einzelne Kulturen eingebracht. Die Schnittkulturen wurden weitere fünf Tage kultiviert und anschließend fixiert. Eine *in situ* Hybridisierung gegen die humanspezifische Alu-Sequenz sowie eine Immunocytochemie mit dem Antikörper human Nuclei ergab, dass sich die Caco-2 Zellen in das für Cytokeratin positive Epithel der Schnittkultur eingelagert haben (Abbildung 31B – E).

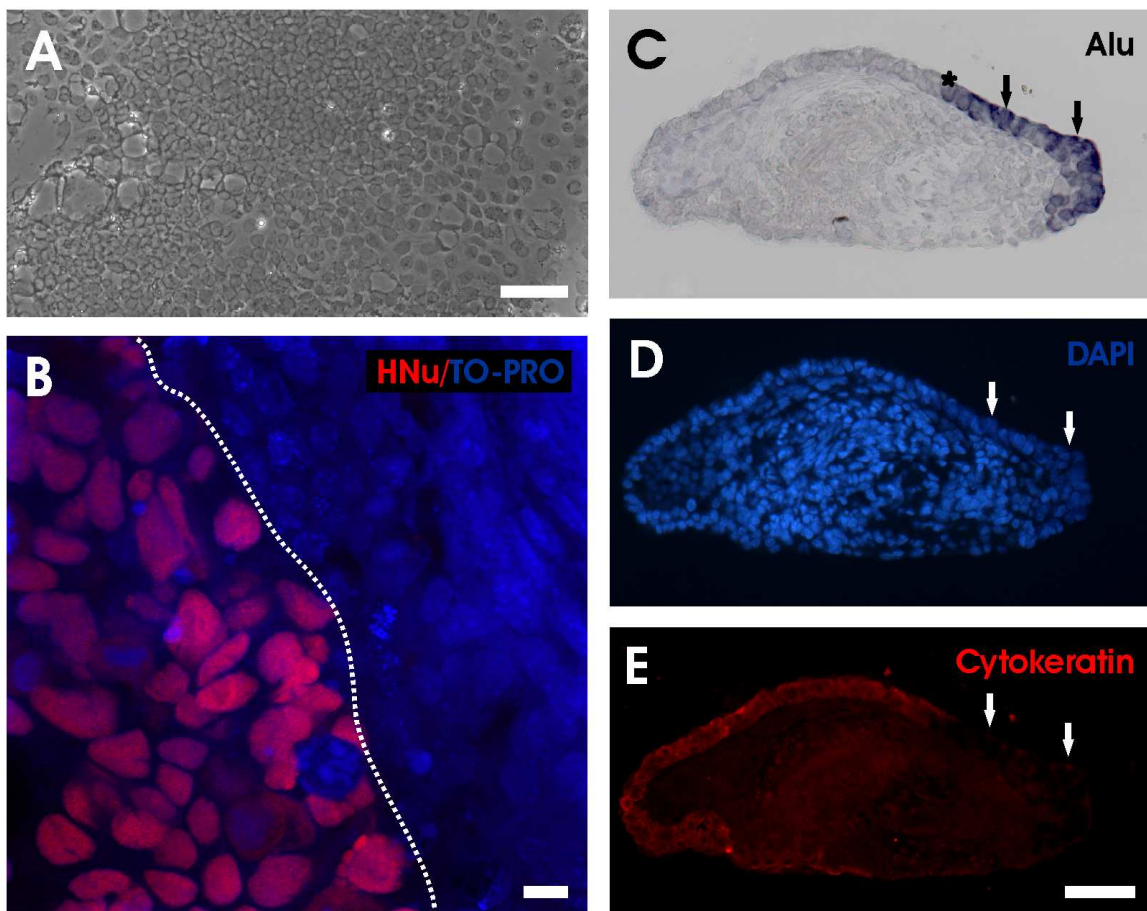


Abbildung 31: Implantation humaner Caco-2 Zellen in das fötale Gewebekulturmodell des murinen Colons. **A** zeigt eine Hellfeldaufnahme der Caco-2 Zelllinie. **B** Laserscanmikroskopische Aufnahme einer Whole-mount Immunhistochemie mit dem Antikörper human Nuclei (hNu; rot), der spezifisch humane Zellkerne erkennt; TOPRO (blau). Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen den implantierten Caco-2 Zellen und den murinen Darmepithelzellen. **C** *In situ* Hybridisierung mit der humanspezifischen Alu-Sonde auf Paraffinschnitten der Gewebekultur. Die Pfeile weisen auf die in das Epithel integrierten positiv gefärbten Kerne der Caco-2 Zellen. Das Sternchen markiert die Grenze zwischen den Caco-2 Zellen und den murinen Darmepithelzellen. **D** DAPI-Färbung des gleichen Gewebeschnitts. **E** Immunfluoreszenzfärbung gegen Cytokeratin. Größenbalken: 100 µm in **A**; 50 µm in **E**; 10 µm in **B**.

3.7.3 Implantation von Zellen des Darmepithels in die dreidimensionale Schnittkultur von fötalem, murinem Colon

Zur Untersuchung der humanen, epithelialen Stammzellen des Darmes wurden ganze Krypten (Abbildung 32B) in die fötale, dreidimensionale Schnittkultur (Abbildung 32A) von murinem Colon implantiert. Mit diesen Kulturen wurde anschließend eine *in situ* Hybridisierung gegen die humanspezifische Alu-Sequenz durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich die humanen Zellen, ähnlich wie die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Caco-2 Zellen, in das Cytokeratin positive Epithel eingelagert haben (Abbildung 32C, D, E).

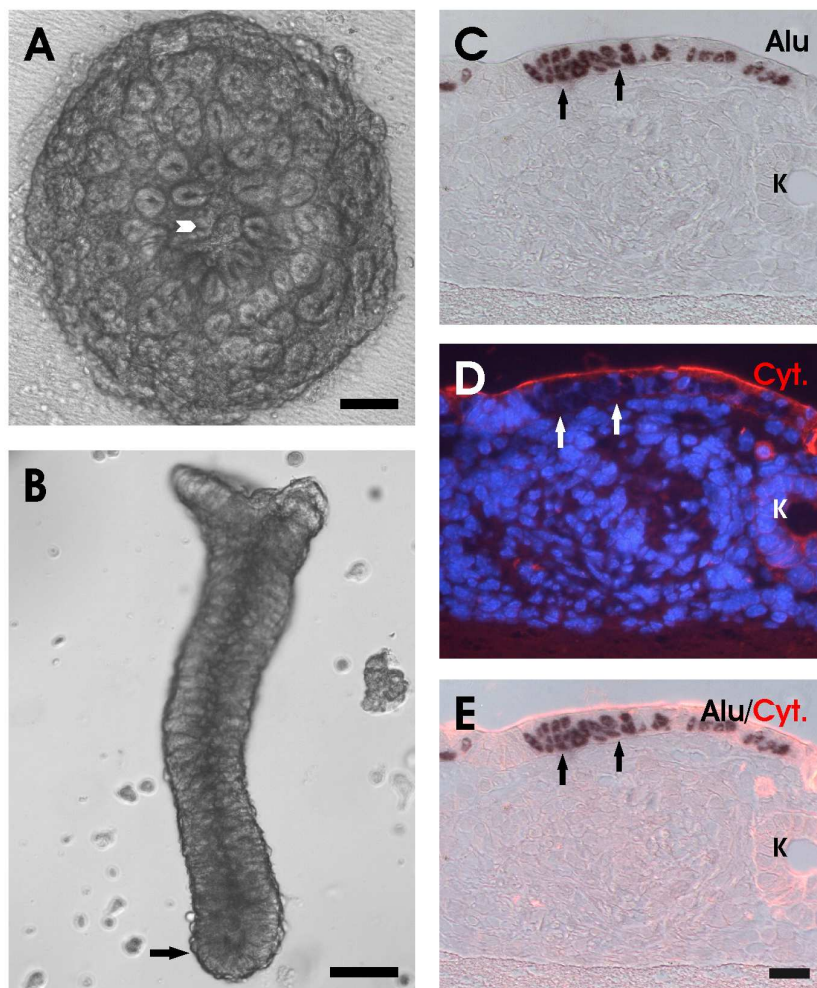


Abbildung 32: Implantation einer mit Thermolysin isolierten, humanen Darmepithelkrypte in eine dreidimensionale Schnittkultur aus dem fötalen, murinem Colon. **A** Aufsicht auf eine 1 Tag alte Schnittkultur. Der Pfeil weist auf die Implantationsstelle. **B** Isolierte, humane Darmkrypte aus dem Colon. Der Pfeil weist auf die Stammzellregion. **C** *In situ* Hybridisierung mit der humanspezifischen Alu-Sonde. Die Pfeile zeigen auf die sich integrierten humanen Zellen in das murine Darmepithel. K = Krypte. **D** Immunhistochemische Färbung des gleichen Gewebeschnitts gegen Cytokeratin (rot); DAPI (blau). **E** Überlagerung von **C** und **D**. Größenbalken: 100 µm in **A**; 50 µm in **B**; 20 µm in **E**.

4 Diskussion

Die Darmmucosa gehört zu den regenerativsten Geweben des adulten Organismus. Der überwiegende Teil des Darmepithels erneuert sich innerhalb von drei bis sechs Tagen (Cheng 1974, Cheng und Leblond 1974, Karam 1999). Die starke Regenerationsleistung der intestinalen Stammzellen zeigt sich deutlich nach toxischen Erkrankungen und Infektionen des Magen-Darm-Traktes, nach denen aus den Krypten heraus das Epithel innerhalb von wenigen Tagen neu gebildet werden kann. Die Stammzellen durchlaufen dabei eine asymmetrische Zellteilung, aus der wieder eine Stammzelle und eine Epithelzelle hervorgehen (Adami et al. 1901, Jones et al. 1997). Im Dickdarm liegen die Stammzellen in der Basis der Darmkrypte (Bach et al. 2000). Ein Kolonschleimhautbezirk des Menschen von 1000 μm^2 enthält ca. 400 Krypten. Man vermutet zwischen vier bis sechs Stammzellen pro Krypte, aus denen sich die entsprechenden Zellen des Darmepithels, wie resorbierende Enterozyten, Mucin-produzierende Becherzellen und Peptid-Hormon-produzierende enteroendokrine Zellen differenzieren (Potten et al. 1998). Im Dünndarm finden sich die Stammzellen ebenfalls in den Krypten, ihre Position ist jedoch stark umstritten. Sie werden entweder im Kryptengrund zwischen den hier lokalisierten Paneth'schen Körnerzellen, die ebenfalls aus diesen Stammzellen hervorgehen, und/oder an Zellposition (4+), direkt über den Paneth'schen Körnerzellen, vermutet (Potten 1977, Barker et al. 2007). Diese epithelialen Stammzellen teilen sich fortlaufend und generieren proliferierende Vorläuferzellen, die sich auf dem Weg zur Mucosaoberfläche zu den oben genannten spezialisierten Zellen differenzieren. Trotz der ausgeprägten Regenerationsleistung der intestinalen epithelialen Stammzellen sind noch viele Mechanismen ihrer Regulation im Vergleich zu anderen adulten Stammzellen weitgehend unbekannt.

Eine interessante Anwendung für den Bereich der Regenerativen Medizin könnte sich aufgrund eines möglichen Transdifferenzierungspotentials intestinaler Stammzellen ergeben. Der Darm gehört neben der Leber, dem Pankreas und der Lunge zum entodermalen Keimblatt. Während der Embryogenese entwickelt sich aus dem Vorderdarm die Leberanlage, das Pankreas und die Lunge (Gilbert 2003, Drews 2006). Isolierte Stammzellen des Darmes könnten möglicherweise das Entwicklungspotential, sich unter Einsatz geeigneter Wachstumsfaktoren in

Hepatozyten, Pankreaszellen und Lungenepithelzellen zu differenzieren, besitzen. Die Isolation von epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Darm ist daher ein wichtiger methodischer Baustein, um Regenerationsmechanismen zu untersuchen und neues Gewebe im lebenden Organismus oder in der Zellkultur mittels Techniken des Tissue Engineering zu generieren. Die epithelialen Stammzellen der Darmmucosa bieten gegenüber vielen anderen Stammzellkompartimenten den Vorteil, dass die Lage der Stammzellen (Kryptengrund) in etwa bekannt ist. Dies macht sie besonders für die Identifikation neuer Stammzellmarker interessant, da potentielle Marker histologisch der Stammzellnische zugeordnet werden können. Voraussetzung für eine gezielte Isolation von intestinalen Vorläufer- und Stammzellen des Darmepithels wäre ein geeigneter Antikörper, der ein Oberflächenantigen an vitalen Zellen erkennt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 46 verschiedene IgG-Antikörper, die spezifisch Zelloberflächenantigene detektieren, als mögliche Marker für Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Darmes untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Stage-Specific Embryonic Antigen 1 (SSEA-1) sowohl an fixiertem als auch vitalem Gewebe im Bereich der Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Darmepithels nachgewiesen werden konnte.

SSEA-1 ist ein Glykolipid, d. h. es besteht aus einer Oligosaccharidkette und ist über ein Glukosemolekül mit einem Ceramid verbunden. Die Oligosaccharidketten der Glykolipide werden im Golgiapparat über verschiedene Glykosyl- und Fucosyltransferasen synthetisiert (Fenderson et al. 1990, Nakayama et al. 2001). SSEA-1, auch LewisX, CD15 oder LNFIII genannt, besitzt die Kohlenhydratsequenz Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (Gooi et al. 1981). Es wurde zum ersten Mal 1978 beschrieben (Solter und Knowles 1978) und ist auf der Oberfläche von verschiedenen Säugerzellen exprimiert. SSEA-1 wird außerdem in kultivierten embryonalen Stammzellen der Maus (Fox et al. 1981), murinen primordialen Keimzellen (Gomperts et al. 1994) und neuralen Stammzellen der Maus und des Menschen (Klassen et al. 2001) exprimiert. Humane embryonale Stammzellen und Keimzellen sind dagegen SSEA-1-negativ (Liu et al. 2004). Neben den frühen embryonalen Zellen konnte eine SSEA-1-Expression auf myeloiden Zellen, wie Monozyten und Granulozyten festgestellt werden (Hanjan et al. 1982). Zusätzlich ist SSEA-1 in verschiedenen Tumorgeweben zu finden, wie z. B. auf den Hodgkinlymphom-typischen Reed-Sternberg-Zellen (Agnarsson und

Kadin 1989), im Plattenepithelkarzinom der Haut (Groves et al. 1993), im Mammakarzinom (Narita et al. 1993) und im Leberkarzinom (Torii et al. 1993). Die von Itzkowitz et al. und Nakamori et al. beschriebene Expression von SSEA-1 in Kolonkarzinomen konnte mit dem in dieser Arbeit verwendeten IgG1 SSEA-1-Antikörper jedoch nicht bestätigt werden (Itzkowitz et al. 1986, Nakamori et al. 1993).

Die SSEA-1 Expression in den Krypten von Normalgewebe wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen an fixiertem Gewebe untersucht (Itzkowitz et al. 1986, Ariza et al. 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass SSEA-1 im Dünndarm von den Paneth'schen Körnerzellen exprimiert wird (Ariza et al. 1996) und im Dickdarm hauptsächlich im distalen Colon im unteren Bereich der Krypten vorkommt. Im proximalen Colon wird SSEA-1 im unteren sowie im oberen Bereich der Krypten exprimiert (Itzkowitz et al. 1986). Eine immunhistochemische Färbung wurde jedoch im Falle des Colons in dieser Publikation nicht gezeigt. Interessanterweise deuten die eigenen Untersuchungen an verschiedenen Darmabschnitten darauf hin, dass die Lokalisation der SSEA-1 positiven Zellen mit der proliferativen Zone im Darmepithel korreliert. Im proximalen Colon sind die proliferierenden Epithelzellen sowie das SSEA-1 Antigen auch im oberen Bereich der Krypte lokalisiert, während sie im distalen Colon nur im unteren Drittel der Krypte zu finden sind.

Weiterhin konnten im Rahmen dieser Dissertationsarbeit Unterschiede in Abhängigkeit von der Fixierung beobachtet werden. Die Aceton-fixierten Kryostatschnitte zeigten eine Färbung der kompletten Zellmembran im unteren Drittel der Krypte, während die Färbung auf Paraffinschnitten nur auf der apikalen Seite der Epithelzelle zu sehen war. Weiterhin wies die Immunhistochemie auf Paraffinschnitten darauf hin, dass das SSEA-1 in das Lumen der Krypte sekretiert wird. Dies zeigt, dass auch die Fixierungstechnik eine Rolle bei der spezifischen Antikörperbindung und dessen Detektion spielt. Die Verwendung von Paraformaldehyd sorgt zwar für einen besseren Gewebeerhalt, es werden jedoch bei diesem Fixans funktionelle Gruppen miteinander verlinkt, was eine spezifische Antigenerkennung für den Antikörper in der Histologie erschweren kann (Werner et al. 2000). Eine immunocytochemische Färbung an vitalem Epithelgewebe wurde in bisher veröffentlichten Arbeiten nicht beschrieben.

Im Gegensatz zu dem in der Promotionsarbeit verwendeten IgG-Antikörper wurden in den zuvor genannten Publikationen ausschließlich SSEA-1-Antikörper der IgM-Klasse eingesetzt. IgM-Antikörper werden in der ersten Immunantwort gebildet und bilden ein Pentamer mit 10 Antigenbindungsstellen. Sie erfahren eine hohe Mutationsrate wodurch sie, im Gegensatz zu den kleineren IgG-Antikörper-Monomeren, eine niedrige Affinität aufweisen. Die Affinität der individuellen Antigenbindungsstellen ist daher der kritische Punkt für die Effektivität der Antikörper (Janeway et al. 1999). Eine vergleichende Immunhistochemie an Gewebeschnitten mit einem SSEA-1 IgM- und dem in der Doktorarbeit verwendeten IgG1-Antikörper zeigte, dass der IgM-Antikörper sowohl auf der apikalen Seite der Epithelzellen als auch im Zytoplasma bindet, während eine Färbung mit dem IgG1-Antikörper nur auf der apikalen Seite der Epithelzellen zu verzeichnen war.

Untersuchungen an Mäuseembryonen ergaben, dass SSEA-1 im acht-Zell-Stadium zum Zeitpunkt der Verdichtung erscheint und im 32-Zell-Stadium, wenn der Verdichtungsprozess beendet ist, verschwindet (Solter und Knowles 1978, Bird und Kimber 1984, Fenderson et al. 1984). Es wird daher vermutet, dass SSEA-1 während der Embryogenese in Zell-Zell-Interaktionen involviert ist (Solter und Knowles 1978). Die Interaktion erfolgt direkt zwischen zwei SSEA-1 Molekülen und ist Ca^{2+} und Mg^{2+} abhängig, da die Bindung unter EDTA inhibiert werden kann (Eggens et al 1989). Eine Beteiligung von SSEA-1 auf die Zell-Zell-Interaktion wurde ebenfalls zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen beobachtet (Forsyth et al. 1989). Die Lokalisation von SSEA-1 im Darmepithel könnte auf dessen mögliche Funktion bei Zell-Zell-Interaktionen im epithelialen Stammzellkompartiment hindeuten. In mehreren Untersuchungen ließ sich zeigen, dass sowohl die Zellinteraktionen der Epithelzellen untereinander, als auch die Interaktionen mit den Zellen der Lamina Propria einen entscheidenden Einfluss auf die Organisation und Funktionalität der epithelialen Zellen besitzen (Kaestner et al. 1997, van den Brink et al. 2001, Rizvi und Wong 2005).

Fötale und adulte Vorläufer- und Stammzellen des ZNS exprimieren ebenfalls SSEA-1 (Capela und Temple 2002, Capela und Temple 2006). Eine SSEA-1 FACS-Selektion mit anschließender klonaler Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen aus dem kortikalen Neuroepithel des Mausfötus zeigte eine

erhöhte Proliferationsrate der SSEA-1 positiven Zellen im Vergleich zu den negativen Zellen (Capela und Temple 2006).

Ähnlich wie in den oben beschriebenen neuralen Stamm- und Vorläuferzellen weisen die im Rahmen der Promotionsarbeit erzielten Daten der Zellzyklusanalyse von Darmepithelzellen darauf hin, dass SSEA-1 auf proliferierenden Stamm- und/oder Vorläuferzellen exprimiert wird. Der Anteil der proliferierten Zellen war bei den SSEA-1 markierten humanen Darmepithelzellen im Vergleich zu den SSEA-1 negativen Zellen vierfach erhöht. Die FACS-Analyse mit dem SSEA-1 Antikörper wies außerdem darauf hin, dass die Stamm- und Vorläuferzellen das Antigen in unterschiedlichen Intensitäten exprimierten. Dies ermöglicht mit Hilfe des FACS-Sortings Zellen mit unterschiedlich starkem Fluoreszenzsignal zu sortieren und im Hinblick auf ihren Stammzellcharakter getrennt voneinander zu analysieren.

Alle Lewis Antigene, zu denen auch SSEA-1 angehört, sind Blutgruppenverwandte Kohlenhydrate und werden für die Tumorprognose verwendet (Dabelstern 1996). Sialyliertes Lewis X ist in Colonkarzinomgewebe hochreguliert (Itzkowitz et al. 1986, Nakamori et al. 1993). Es wurde aber auch eine erhöhte Expression von Lewis X, also SSEA-1, beobachtet (Mayer et al. 1996).

Diese Beobachtung konnte in der Promotionsarbeit bei sechs verschiedenen Colonkarzinomgewebeproben nicht bestätigt werden. In keiner der analysierten Proben ließen sich SSEA-1-positive Tumorzellen detektieren. Die epitheliale Stammzellregion in den Krypten zeigte jedoch bei jedem Patienten eine spezifische Färbung. Auch die Colonkarzinomzelllinie Caco-2 wies mit dem SSEA-1 Antikörper kein Signal auf. Die Caco-Zellen waren sowohl unter fixierten Bedingungen bei der Immunocytochemie als auch nativ bei der FACS-Analyse negativ für diesen Antikörper. Diese widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Expression von SSEA-1 in Tumorzellen deuten darauf hin, dass die verwendeten IgM-/IgG-Antikörper eine unterschiedliche Spezifität aufweisen.

Eine Lebendfärbung oder FACS-Messung mit einem SSEA-1-Antikörper bzw. eine Isolation der Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Darmepithels ist bislang nicht beschrieben worden. Eine gezielte Isolation der Stamm- und Vorläuferzellen bietet jedoch die Möglichkeit, diese zu kultivieren und ihr Differenzierungspotential zu untersuchen. Für die Zellselektion mit MACS/FACS war es zunächst notwendig, eine Isolation des Darmepithels mit anschließender Zellvereinzlung

zu etablieren. Verschiedene Isolationstechniken von Darmepithelzellen für die Zellkultur wurden bereits in der Literatur der 60er und 70er Jahre beschrieben. Zu diesen Techniken gehören zum Beispiel die mechanische Dissoziation der Zellen (Sjöstrand 1968), die Isolation durch Verwendung von Chelatbildnern (Whitehead et al. 1987, Evans et al. 1992, Grossmann et al. 1998, Rogler et al. 1998, Schlottmann et al. 2004) oder der enzymatische Verdau mit Hilfe von proteolytischen Enzymen, wie Collagenase/Dispase (Quaroni und May 1980, Evans et al. 1992, H. Fukamachi 1992, Grossmann et al. 1998) oder Hyaluronidasen (H. Fukamachi 1992). Die dissoziierten Epithelzellen wurden in diesen Arbeiten meist für kurzzeitige Kultivierungs- und Stimulationsversuche verwendet. Antikörperfärbungen wurden in der Regel nicht durchgeführt. Eine Publikation zeigte eine Isolation von Darmepithelzellen mit anschließender FACS-Analyse unter Verwendung eines epithelialen Antikörpers (EP4; Schlottmann et al. 2004). In dieser Arbeit wurde jedoch nicht darauf eingegangen, wie die Zellen der mit EDTA isolierten Krypten vereinzelt wurden. Die Isolation des Epithels mit anschließender Zellvereinzlung ist allerdings für eine FACS-Messung bzw. Isolation bestimmter Zellpopulationen unerlässlich, sie gestaltet sich jedoch aufgrund des starken Zusammenhalts der Zellen durch das Schlussleistennetz als schwierig. Darüber hinaus wird die Dissoziation der Zellen durch die starke Mucinbildung der Becherzellen, die zu einem Verkleben der Zellen führen kann, erschwert.

Für die Isolation der Krypten wurde in der Promotionsarbeit, wenn anschließend eine Antikörperfärbung erfolgte, ebenfalls EDTA verwendet, da mit Hilfe dieser Methode der Erhalt der Oberflächenantigene am besten gewährleistet werden konnte. Für die Zellvereinzlung der Krypten wurden zwei enzymatische Methoden etabliert. Eine Vereinzlung mit Papain zeigte sich als besonders zellschonend während sich die enzymatische Behandlung mit Collagenase/Dispase als antigenschonender erwies. Dies konnte bei der FACS-Analyse mit den Antikörpern 58B1A2 und CD13 unter Anwendung der zwei verschiedenen Zellvereinzlungsprotokolle demonstriert werden. Bei einer Zellvereinzlung mit Collagenase/Dispase wurde im Gegensatz zu einer Vereinzlung mit Papain bei der FACS-Messung ein positives Signal detektiert. Im Falle von SSEA-1 wurde die Zellvereinzlung mit Papain vorgenommen, da dieses Enzym die Zellen schonender vereinzelt und das SSEA-1 Antigen nicht verdaut wurde. Nach erfolgter

Färbung konnten die SSEA-1 positiven Zellen mit Hilfe von MACS isoliert werden. Die isolierten Zellen wurden anschließend *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die MACS-selektierten SSEA-1 positiven Zellen in die fötale Schnittkultur implantiert, um eine Integration in das Gewebe zu untersuchen. Diese Integration ist jedoch im Gegensatz zu den implantierten Krypten nicht gelungen. Auch bei subkutanen und renalen Implantationen in die Nacktmaus sowie Implantationen in den Hühnerembryo konnte ebenfalls keine Integration beobachtet werden. Dies könnte an der fehlenden dreidimensionalen Organisation der dissoziierten Epithelzellen liegen, da die für das epitheliale Patterning essentiellen Zell-Zell-Interaktionen des Darmepithels in der Monolayerkultur nicht mehr bestehen (de Santa Barbara et al. 2003). Zellkulturen, bei denen die dreidimensionale Organisation der Epithelzellen mit der extrazellulären Matrix und Bindegewebszellen gewährleistet ist, zeigen diesbezüglich eine *in vivo*-ähnlichere Funktionalität (Stokes et al. 2001, Bursac et al. 2003, Edelman und Keefer 2005). Das in dieser Promotionsarbeit etablierte Gewebekulturmodell konnte die Notwendigkeit einer dreidimensionalen Organisation bestätigen. In diesem Modell konnten aufgrund des bestehend bleibenden Gewebeverbands proliferierende Epithelzellen über eine längere Zeit nachgewiesen werden. In diesem Modell wiesen die Epithelzellen, im Gegensatz zu den Monolayerkulturen, mehrere *in vivo*-ähnliche Parameter auf. Dazu zählen unter anderem: eine hochprismatische Zellmorphologie, apikal liegende Mikrovilli, ein ausgeprägtes Schlussleistennetz sowie eine durchgängige Basalmembran.

Für die Aufrechterhaltung der Funktionalität von dissoziierten Epithelzellen fehlen zurzeit noch notwendige Informationen über die Zell-Zell-Interaktionen des Darmepithels *in vivo*. Als nächster Schritt wäre die Charakterisierung der Stamm- und Vorläuferzellen des Darmepithels mittels high-throughput Analysen unter Verwendung des etablierten Isolationsprotokolls auf mRNA- und Protein-Ebene vorteilhaft. Dies würde die Chance eröffnen, gezielt die Expression von zellbeeinflussenden Faktoren zu analysieren und dadurch neue Erkenntnisse für die erfolgreiche Kultivierung der Epithelzellen zu gewinnen.

5 Zusammenfassung

Stammzellmarker sind wichtige Werkzeuge, um Stammzellen isolieren und charakterisieren zu können. Im Bereich des Darmepithels sind bisher wenige Gene oder Proteine beschrieben worden, die spezifisch in den Stammzellen exprimiert werden. Eine Isolation der Stamm- bzw. Vorläuferzellen ist bislang nicht publiziert worden. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war daher einen Antikörper zu finden, der eine Selektion und anschließende Charakterisierung der entodermalen Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Darmepithels ermöglicht.

Zunächst wurde die dazu notwendige Isolation des gesamten Darmepithels sowie die anschließende Zellvereinzelung etabliert. In einem nächsten Schritt wurde für die Identifizierung der intestinalen Stamm- und Vorläuferzellen ein Antikörperscreening an humanen Darmschnitten und isolierten Darmepithelzellen mittels Immunhistochemien bzw. FACS-Analysen vorgenommen. Dabei wurden zusätzlich vergleichende Analysen an Caco-2-Zellen und Tumorgeweben durchgeführt.

Diese Untersuchungen ergaben mit dem SSEA-1-Antikörper einen interessanten Kandidaten, mit dessen Hilfe erstmals eine Anreicherung von Zellen des Proliferationskompartiments des Darmepithels etabliert werden konnte. Zellzyklusanalysen der SSEA-1 positiven Zellen verdeutlichten dabei deren proliferative Eigenschaften. In ersten Experimenten wurden anschließend isolierte intakte Krypten sowie mittels MACS angereicherte SSEA-1-positive Zellen auf ihr Integrationsverhalten in intestinalen Geweben mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Gewebekulturmodells untersucht. Dieses *in vitro*-Modell des Darmes weist aufgrund der dreidimensionalen Zellorganisation, im Gegensatz zu konventionellen Monolayerkulturen, morphologisch und funktionell *in vivo*-ähnlichere Eigenschaften auf.

Der in dieser Promotion analysierte SSEA-1 Antikörper bietet ein interessantes Anwendungspotential zur Isolation von intestinalen Stamm- und Vorläuferzellen sowohl im Bereich der Grundlagenforschung als auch auf dem Gebiet der Regenerativen Medizin. Zur weiteren Charakterisierung des epithelialen Stammzellkompartiments wären weitere Untersuchungen des Mikroenvironments auf RNA- und Proteinebene notwendig. Die sich daraus ergebenden Erkenntnisse könnten die notwendigen Grundlagen für eine zurzeit noch nicht mögliche Langzeitkultivierung und Expansion von Darmstammzellen liefern.

6 Literatur

- H. E. Abud, N. Watson, J. K. Heath. Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling. *Exp Cell Res.* 2005 Feb 15; 303(2): 252-62.
- G. Adami. The causation of cancerous and other new growths. *British Med J.* 1901 Mar 16;1(2098): 621-8.
- B. A. Agnarsson, M. E. Kadin. The immunophenotype of Reed-Sternberg cells. A study of 50 cases of Hodgkin's disease using fixed frozen tissues. *Cancer.* 1989 Jun 1;63(11): 2083-7.
- B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. Molecular biology of the cell. Garland Science, New York. 2002, 4. Auflage.
- A. Ariza, D. López, E. M. Castellá, C. Munoz, M. J. Zújar, J. L. Mate. Expression of CD15 in normal and metaplastic Paneth cells of the digestive tract. *J Clin Pathol.* 1996 Jun;49(6): 474-7.
- S. P. Bach, A. G. Renehan, C. S. Potten. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis.* 2000 Mar; 21(3): 469-76.
- N. Barker, J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters, H. Clevers. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 2007 Oct 25; 449 (7165): 1003-7.
- N. Barker und H. Clevers. Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology.* 2007 Dec; 133(6): 1755-60.
- E. Batlle, J. T. Henderson, H. Beghtel, M. M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson, H. Clevers. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 2002 Oct 18; 111(2): 251-63.
- A. Benninghoff, D. Drenckhahn. Anatomie: Band1. Urban & Fischer Verlag, München. 2003, 17. Auflage.
- J. M. Bird, S. J. Kimber. Oligosaccharides containing fucose linked $\alpha(1-3)$ and $\alpha(1-4)$ to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae. *Dev. Biol.* 1984 Aug;104(2): 449-60.
- M. Bjerknes, H. Cheng. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat.* 1981 Jan; 160 (1):51-63.
- M. Bjerknes, H. Cheng. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *Am J Anat.* 1981 Jan; 160(1): 77-91.

M. Bjerknes, H. Cheng. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*. 1999 Jan; 116(1): 7-14.

M. Bjerknes, H. Cheng. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22): 12497-502.

C. Booth, C. S. Potten. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest*. 2000 Jun; 105(11): 1493-9.

M. Brittan, N. A. Wright. The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif*. 2004 Feb; 37(1): 35-53.

N. Bursac, M. Papadaki, J. A. White, S. R. Eisenberg, G. Vunjak-Novakovic, L. E. Freed. Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties. *Tissue Eng*. 2003 Dec;9(6): 1243-53.

A. Capela, S. Temple. LeX/SSEA-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*. 2002 Aug 29;35(5): 865-75.

A. Capela, S. Temple. LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev Biol*. 2006 Mar 15;291(2): 300-13.

H. Cheng, C. P. Leblond. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat*. 1974 Dec; 141(4): 461-79.

H. Cheng. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells. *Am J Anat*. 1974 Dec; 141(4): 481-501.

H. Cheng, C. P. Leblond. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *Am J Anat*. 1974 Dec; 141(4): 503-19.

H. Cheng. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells. *Am J Anat*. 1974 Dec; 141(4): 521-35.

E. Dabelsteen. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol*. 1996 Aug;179(4): 358-69.

P. de Santa Barbara, G. R. van den Brink, D. J. Roberts. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jul;60(7): 1322-32.

C. Dieterich, M. Schandar, M. Noll, F. J. Johannes, H. Brunner, T. Graeve, S. Rupp. *In vitro* reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology*. 2002 Feb; 148(Pt 2): 497-506.

U. Drews. Taschenatlas der Embryologie. Thieme, Stuttgart. 2006, 2. Auflage.

D. B. Edelman, E. W. Keefer. A cultural renaissance in vitro cell biology embraces three-dimensional context. *Exp Neurol*. 2005 Mar;192(1): 1 – 6.

I. Eggens, B. Fenderson, T. Toyokuni, B. Dean, M. Stroud, S.-I. Hakomori. Specific interaction between Lex and Lex determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1989 Jun 5;264(16): 9476-84.

E. A. Evans, D. A. Calderwood. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*. 2007 May 25; 316(5828): 1148-53.

G. S. Evans, N. Flint, A. S. Somers, B. Eyden, C. S. Potten. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci*. 1992 Jan; 101(Pt1): 219-31.

G. S. Evans, N. Flint, C. S. Potten. Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 1994;56: 399-417.

B. A. Fenderson, U. Zehavi, S.-I. Hakomori. A multivalent lacto-N-fucopentaose III-lyssyllysine conjugate decompacts preimplantation mouse embryos, while the free oligosaccharide is ineffective. *J Exp Med*. 1984 Nov 1;160(5): 1591-6.

B. A. Fenderson, E. M. Eddy, S.-I. Hakomori. Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. *Bioessays*. 1990 Apr;12(4): 173-9.

P. W. Finch, G. R. Cunha, J. S. Rubin, J. Wong, D. Ron. Pattern of keratinocyte growth factor and keratinocyte growth factor receptor expression during mouse fetal development suggests a role in mediating morphogenetic mesenchymal-epithelial interactions. *Dev. Dyn*. 1995; 203 (2):223-40.

K. D. Forsyth, A. C. Simpson, R. J. Levinsky. CD15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 1989 Jul;19(7): 1331-4.

N. Fox, I. Damjanov, A. Martinez-Hernandez, B. B. Knowles, D. Solter. Immunohistochemical localisation of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev Biol*. 1981 Apr 30;83(2): 391-8.

C. Fritsch, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, G. S. Evans. Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology*. 1997 Mar; 112(3): 826-38.

K. Fujimoto, R. D. Beauchamp, R. H. Whitehead. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology*. 2002 Dec; 123(6): 1941-8.

H. Fukumachi. Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J Cell Sci*. 1992 Oct;103(Pt 2):511-9.

Gilbert, S. *Developmental biology*. Palgrave Macmillan, Hampshire. 2003, 7. Auflage.

M. Gomperts, M. Garcia-Castro, C. Wylie, J. Heasman. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*. 1994 Jan;120(1): 135-41.

H. C. Gooi, T. Feizi, A. Kapadia, B. B. Knowles, D. Solter, M. J. Evans. Stage-specific embryonic antigen involves $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosylated type 2 blood group chains. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819): 156-8.

F. Grahammer, G. Henke, C. Sandu, R. Rexhepaj, A. Hussain, B. Friedrich, T. Risler, M. Metzger, L. Just, T. Skutella, P. Wulff, D. Kuhl, F. Lang. Intestinal function of gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jun; 290(6): G1114-23.

A. Gregorieff, D. Pinto, H. Begthel, O. Destrée, M. Kielman, H. Clevers. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*. 2005 Aug; 129(2): 626-38.

J. Groden, A. Thilveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, M. Robertson, L. Sargeant, K. Krapcho, E. Wolff, R. Burt, J. P. Hughes, J. Warrington, J. McPherson, J. Wasmuth, D. Le Paslier, H. Abderrahm, D. Cohen, M. Leppert, R. White. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9; 66: 589-600.

J. Grossmann, J. M. Maxson, C. M Whitacre, D. E. Orosz, N. A. Berger, C. Focchi, A. D. Levine. New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):53-62.

R. W. Groves, M. H. Allen, E. L. Ross, G. Ahsan, J. N. Barker, D. M. MacDonald. Expression of selectin ligands by cutaneous squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 1993 Oct;143(4): 1220-5.

S. N. S. Hanjan, F. J. Kearney, M. D. Cooper. A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982 May;23(2): 172-88.

A. P. Haramis, H. Begthel, M. van den Born, J. van Es, S. Jonkheer, G. J. Offerhaus, H. Clevers. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*. 2004 mar 12; 303(5664): 1684-6.

P. D. Howdle. Organ culture in the study of the gastrointestinal tract in health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 1983 Aug; 65(2): 105-10.

J. R. Howe, J. L Bair, M. G. Sayed, M. E. Anderson, F. A. Mitros, G. M. Petersen, V. E. Velculescu, G. Traverso, B. Vogelstein. Germine mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet*. 2001 Jun; 28(2): 184-7.

S. H. Itzkowitz, M. Yuan, Y. Fukushi, Al. Palekar, P. C. Phelps, A. M. Shamsuddin, B. F. Trump, S. Hakomori, Y. S. Kim. LewisX- and sialylated Lewisx-related antigen expression in human malignant and non-malignant colonic tissues. *Cancer Res.* 1984 May;46(5): 2627-32.

C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, J. D. Capra. *Immuno biology, the immune system in health and disease.* Elsevier Science Ltd, Garland. 1999, 4. Auflage.

M. Jenny, C. Uhl, C. Roche, I. Duluc, V. Guillermin, F. Guillemot, J. Jensen, M. Kedinger, G. Gradwohl. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J.* 2002 Dec 2; 21(23): 6338-47.

J. Jensen, E. E. Pedersen, P Galante, J. Hald, R. S. Heller, M. Ishibashi, R. Kageyama, F. Guillemot, P. Serup, O. D. Madsen. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet.* 2000 Jan; 24(1): 36-44.

P. H. Jones. Epithelial stem cells. *Bioessays.* 1997 Aug;19(8): 683-90.

L. C. Junqueira, J. Carneiro. *Histologie.* Springer Verlag, Berlin. 2004, 6. Auflage.

L. Just, M. Timmer, J. Tinius, F. Stahl, A. Deiwick, G. Nikkhah, A. Bader. Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by *in situ* hybridisation with Alu probe. *J Neurosci Methods.* 2003 Jun 15;126(1): 69-77.

B. Kaeffer. Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: a mini-review. *In Vitro Cell Cev Biol Anim.* 2002 Mar; 38(3): 123-34.

K. H. Kaestner, D. G. Silberg, P. G. Traber, G. Schütz. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev.* 1997 Jun 15; 11(12): 1583-95.

S. M. Karam. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci.* 1999 Mar 15; 4: D286-98.

T. Kayahara, M. Sawada, S. Takaishi, H. Fukui, H. Seno, H. Fukuzawa, K. Suzuki, H. Hiai, R. Kageyama, H. Okano, T. Chiba. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett.* 2003 Jan 30; 535(1-3): 131-5.

M. Kedinger, K. Haffen, P. Simon-Assmann. Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation.* 1987;36(1): 71-85.

R. G. Kessel, R. H. Kardon. *Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy.* W. H. Freeman and Company. 1979.

H. Klassen, M. R. Schwartz, A. H. Bailey, M. J. Young. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci Lett.* 2001 Oct 26;312(3): 180-2.

V. Korinek, N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P. J. Peters, H. Clevers. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet.* 1998 Aug; 19(4): 379-83.

S. Liu, H. Liu, S. Tang, Y. Pan, K. Ji, H. Ning, S. Wang, Z. Qi, L. Li. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 expression during early stages of human embryogenesis. *Oncol Rep.* 2004 Dec;12(6): 1251-6.

J. M. Mariadason, M. Bordonaro, F. Aslam, L. Shi, M. Kuraguchi, A. Velcich, L. H. Augenlicht. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 2001 Apr 15; 61(8): 3465-71.

E. Marshman, C. Booth, C. S. Potten. The intestinal stem cell. *BioEssays.* 2002 Jan; 24(1): 91-8.

B. Mayer, I. Funke, J. P. Johnson. High expression of a LewisX-related epitope in gastric carcinomas indicates metastatic potential and poor prognosis. *Gastroenterology.* 1996 Dec;111(6): 1433-46.

D. Ménard, P. Arsenault. Human fetal colon in organ culture. *Anat Embryol (Berl).* 1987; 176(4): 441-8.

M. Metzger, S. Conrad, G. Alvarez-Bolado, T. Skutella, L. Just. Gene expression of the repulsive guidance molecules during development of the mouse intestine. *Dev Dyn.* 2005 Sep; 234(1): 169-75.

W. A. Müller, M. Hassel. *Entwicklungsbiologie.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2003 3. Auflage.

S. Nakamori, M. Kameyama, S. Imaoka, H. Furukawa, O. Ishikawa, Y. Sasaki, T. Kabuto, T. Iwanaga, Y. Matsushita, T. Irimura. Increased expression of sialyl LewisX antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 1993 Aug 1;53(15): 3632-7.

S.-I. Nakamura, J. Goto, M. Kitayama, I. Kino. Application of the crypt-isolation technique to flow-cytometric analysis of DNA content in colorectal neoplasms. *Gastroenterology.* 1994 Jan;106(1): 100-7.

F. Nakayama, S. Nishihara, H. Iwasaki, T. Kudo, R. Okubo, M. Kaneko, M. Nakamura, M. Karube, K. Sasaki, H. Narimatsu. CD15 expression in mature granulocytes is determined by α 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by α 1,3-fucosyltransferase IV. *J Biol Chem.* 2001 May 11;276(19): 16100-6.

T. Narita, H. Funahashi, Y. Satoh, T. Watanabe, J. Sakamoto, H. Takagi. Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer.* 1993 May 15;71(10): 3044-53.

- M. Neunlist, P. Aubert, S. Bonnaud, L. Van Landeghem, E. Coron, T. Wedel, P. Naveilhan, A. Ruhl, B. Lardeux, T. Savidge, F. Paris, J. P. Galmiche. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jan; 292(1): G231-41.
- S. Nishimura, N. Wakabayashi, K. Toyoda, K. Kashima, S. Mitsufuji. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci*. 2003 Aug; 48(8): 1523-9.
- I. Nishisho, Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba, P. Hedge. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 1991 Aug 9; 253(5020): 665-9.
- H. Okano, H. Kawahara, M. Toriya, K. Nakao, S. Shibata, T. Imai. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res*. 2005 Jun 10; 306(2): 349-56.
- A. J. Ouellette, M. E. Selsted. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J*. 1996 Sep; 10(11): 1280-9.
- T. Peeters, G. Vantrappen. The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut*. 1975 Jul; 16(7): 553-8.
- F. Pincet, T. Le Bouar, Y. Zhang, J. Esnault, J. M. Mallet, E. Perez, P. Sinay. Ultraweak sugar-sugar interactions for transient cell adhesion. *Biophys J*. 2001 Mar;80(3): 1354-8.
- D. Pinto, A. Gregorieff, H. Begthel, H. Clevers. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*. 2003 Jul 15; 17(4): 1709-13.
- C. S. Potten. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature*. 1977 Oct 6; 269(5628): 518-21.
- C. S. Potten. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998 Jun 29;353(1370): 821-30.
- C. S. Potten, C. Booth, G. L. Tudor, D. Booth, G. Brady, P. Hurley, G. Ashton, R. Clarke, S. Sakakibara, H. Okano. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation*. 2003 Jan; 71(1): 28-41.
- S. S. Poulsen, E. Nexø, P. S. Olsen, J. Hess, P. Kirkegaard. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in rat and man. *Histochemistry*. 1986; 85(5): 389-94.
- A. Quaroni, R. J. May. Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Methods Cell Biol*. 1980;21B: 406-27.
- J. M. Quinlan, W. Y. Yu, M. A. Hornsey, D. Tosh, J. M. Slack. *In vitro* culture of embryonic mouse intestinal epithelium: cell differentiation and introduction of reporter genes. *BMC Dev Biol*. 2006 May 25; 6: 24.

M. Ramalho-Santos, D. A. Melton, A. P. McMahon. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*. 2000 Jun; 127(12): 2763-72.

J. F. Rehfeld. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev*. 1998 Oct; 78(4): 1087-108.

T. Reya, H. Clevers. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14; 434(7035): 843-50.

A. Z. Rizvi und M. H. Wong. Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells*. 2005 Feb; 23(2): 150-65.

G. Rogler, R. Daig, E. Aschenbrenner, D. Vogl, K. Schlottmann, W. Falk, V. Gross, J. Schölmerich, T. Andus. Establishment of long-term cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest*. 1998 Jul; 78(7): 889-90.

K. Schlottmann, F. P. Wachs, J. Grossmann, D. Vogl, M. Maendel, W. Falk, J. Schölmerich, T. Andus, G. Rogler. Interferon gamma downregulated IL-8 production in primary human colonic epithelial cells without induction of apoptosis. *In J Colorectal Dis*. 2004 Sep;19(5): 421-9.

N. Schröder, A. Gossler. Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expr Patterns*. 2002 Dec; 2(3-4): 247-50.

D. H. Scoville, T. Sato, X. C. He, L. Li. Current view: Intestinal stem cells and signalling. *Gastroenterology*. 2008 Mar; 134(3): 849-64.

P. Simon-Assmann, N. Turck, M. Sidhoum-Jenny, G. Gradwohl, M. Kedinger. *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 2007 Jul;23(4):241-56.

F. S. Sjöstrand. A simple and rapid method to prepare dispersions of columnar epithelial cells from the rat intestine. *J Ultrastruct Res*. 1968 Mar;22(5):424-42.

M. J. Smalley, T. C. Dale. Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1999; 18(2): 215-30.

D. Solter, B. B. Knowles. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978 Nov;75(11):5565-9.

T. S. Stappenbeck, J. I. Gordon. Rac1 mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine. *Development*. 2000 Jun; 127(12): 2629-42.

D. G. Stokes, G. Liu, R. Dharmavaram, D. Hawkins, S. Piera-Velazquez, S. A. Jimenez. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*. 2001 Dec 1;360(Pt 2): 461-70.

K. Takaku, H. Miyoshi, A. Matsunaga, M. Oshima, N. Sasaki, M. M. Taketo. Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res.* 1999 Dec 15; 59(24): 6113-7.

X. Tan, W. Hsueh, F. Gonzalez-Crussi. Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)-alpha transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells, intestinal eosinophils, and macrophages. *Am J Pathol.* 1993 Jun; 142(6): 1858-65.

A. Torii, A. Ankayama, A. Harada, A. Nakao, T. Nonami, J. Sakamoto, T. Watanabe, M. Ito, H. Takagi. Expression of the CD15 antigen in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1993 Jun 15;71(12): 3864-7.

J. S. Trier. Organ-culture methods in the study of gastrointestinal-mucosal function and development. *N Engl J Med.* 1976 Jul 15; 295(3): 150-5.

S. Tsubouchi, C. P. Leblond. Migration and turnover of entero-endocrine and caveolated cells in the epithelium of the descending colon, as shown by radioautography after continuous infusion of 3H-thymidine into mice. *Am J Anat.* 1979 Dec; 156(4): 431-51.

M. van de Wetering, E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Battle, D. Coudreuse, A. P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, H. Clevers. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 2002 Oct 18; 111(2): 241-50.

G. R. van den Brink, P. de Santa Barbara, D. J. Roberts. Epithelial cell differentiation – a matter of choice. *Science.* 2001 Dec 7; 294(5549): 2115-6.

G. R. van den Brink, S. A. Bleuming, J. C. Hardwick, B. L. Schepman, G. J. Offerhaus, J. J. Keller, C. Nielsen, W. Gaffield, S. J. van Deventer, D. J. Roberts, M. P. Peppelenbosch. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet.* 2004 Mar; 36(3): 277-82.

L. C. Wang, F. Nassir, Z. Y. Liu, L. Ling, F. Kuo, T. Crowell, D. Olson, N. O. Davidson, L. C. Burkly. Disruption of hedgehog signaling reveals a novel role in intestinal morphogenesis and intestinal-specific lipid metabolism in mice. *Gastroenterology.* 2002 Feb; 122(2): 469-82.

M. Werner, A. Chott, A. Fabiano, H. Battifora. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2000 Jul;24(7): 1016-9.

R. H. Whitehead, A. Brown, P. S. Bhathal. A method for the isolation and culture of human colonic crypts in collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1987 Jun;23(6):436-42.

A. Wodarz, R. Nusse. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 1998; 14: 59-88.

T. P. Yamaguchi. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol.* 2001 Sep 4; 11(17): R713-24.

Q. Yang, N. A. Bermingham, M. J. Finegold, H. Y. Zoghbi. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science.* 2001 Dec 7; 294(5549): 2155-8.

7 Anhang

7.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Schema zur Gliederung des Verdauungssystems des Menschen...	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Verdauungskanal.....	3
Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Dün- und Dickdarms der Ratte.....	5
Abbildung 4: Die intestinale Stammzelle und deren Differenzierung.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung des epithelialen Stammzellkompartiments in der Mucosa des Colons.....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Stammzellhierarchie epithelialer Stammzellen.....	11
Abbildung 7: Expressionsmuster von Wnt-Signalkomponenten im adulten Darm der Maus.....	13
Abbildung 8: Der Notch-Signalweg im Darm.....	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Isolation von Darmepithelzellen aus Colongewebe.....	60
Abbildung 10: FACS-Analyse mit verschiedenen Oberflächenantikörpern an isolierten Primärzellen des Darmepithels und der Caco-2 Zelllinie.....	63
Abbildung 11: Vergleich der FACS-Analyse mit unterschiedlich isolierten Darmepithelzellen.....	64
Abbildung 12: Histochemische Färbung mit Hämalau und Alcianblau und Immunhistologie mit dem Proliferationsmarker Ki-67 an humanem Colongewebe, humanem Colonkarzinomgewebe und der Zelllinie Caco-2.....	65
Abbildung 13: Immunhistologische Charakterisierung an humanem Darmepithel des Colon, Colonkarzinom sowie der Karzinomzelllinie Caco-2.....	67
Abbildung 14: Immuncytochemische Charakterisierung mit aus der FACS-Analyse positiven Antikörpern an der Karzinomzelllinie Caco-2.....	69
Abbildung 15: Immunhistochemische Charakterisierung mit aus der FACS-Analyse positiven Antikörpern an humanem Colongewebe.....	69
Abbildung 16: Lebendfärbung von Krypten aus humanem Colon mit dem Oberflächenantikörper SSEA-1.....	72

Abbildung 17: Lebendfärbung von Krypten aus humanem Dünndarm mit dem Oberflächenantikörper SSEA-1.	72
Abbildung 18: Zellzyklusanalyse mit isolierten Darmepithelzellen.	73
Abbildung 19: SSEA-1 positive und negative Zellen, die mit MACS sortiert wurden.	74
Abbildung 20: FACS-Analyse von MACS isolierten SSEA-1 positiven Zellen. ...	74
Abbildung 21: Kultivierungsprinzip der Organkulturmodelle aus adultem und fötalem Darm der Maus.	75
Abbildung 22: Histologische und histochemische Charakterisierung des intestinalen Gewebekulturmodells mit Hämatoxylin, Alcianblau und alkalischer Phosphatase.	76
Abbildung 23: Immunhistologische Charakterisierung der organotypischen Kultur verglichen mit adultem Darm der Maus.	77
Abbildung 24: Charakterisierung der adulten Gewebekultur mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie.	79
Abbildung 25: Erhöhte Expression der SGK1 mRNA in epithelialen Zellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> nach Behandlung mit Dexamethason. <i>In situ</i> Hybridisierung für die SGK1 mRNA auf Kryostatschnitten vom Colon der adulten Maus und von der Gewebekultur.	81
Abbildung 26: Infektion der Gewebekultur mit den <i>Candida albicans</i> Stämmen Can 14 (Wildtyp) und Can 34 (Δ cph1/ Δ efg1) für 8 h und 24 h.	82
Abbildung 27: Schematische Darstellung zur Reorganisation der dreidimensionalen Schnittkultur des fötalen Darmes der Maus im Laufe der Kultivierung.	83
Abbildung 28: Histologische Charakterisierung des fötalen Gewebekulturmodells mit Hämatoxylin und Alcianblau.	84
Abbildung 29: Immunhistologische Charakterisierung der organotypischen Kultur.	84
Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der fötalen Schnittkultur von murinem Colon, die für 14 Tage kultiviert wurde.	85
Abbildung 31: Implantation humaner Caco-2 Zellen in das fötale Gewebekulturmodell des murinen Colons.	86
Abbildung 32: Implantation einer mit Thermolysin isolierten, humanen Darmepithelkrypte in eine dreidimensionale Schnittkultur aus dem fötalen, murinen Colon.	87

7.2 **Abkürzungsverzeichnis**

AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous polyposis coli
BMP	Bone morphogenic protein
BMPR1A	BMP-Rezeptor 1A
Bp	Basenpaare
BrdU	5-brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovine serum albumin
Caco-2	Colonkarzinomzelllinie
CBC	Crypt base columnar cell
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
Dkk1	Dickkopf1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENS	Enterisches Nervensystem
EP4	Prostaglandin E Receptor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fötales bovines Serum
Fkh6	Forkhead homolog 6
FSC	Forward scatter
Fzd	Frizzled
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HE	Hämalaun/Eosin
HES	Hairy/enhancer of split
Ig	Immunglobulin
Lef	Lymphoid enhancer factor

Lgr5	L eucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor
Lrp	L ow density lipoprotein-related receptor p rotein
MACS	M agnetic cell sorting
PBS	P hosphate buffered solution
PCR	P olymerase chain reaction
PFA	P araformaldehyd
PI	P ropidiumiodid
PK	P roteinase K
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RGM	R epulsive guidance molecule
RNA	R ibonucleic acid
sFRP	S ecreted frizzled related protein
SGK1	S erum- und G lukokortikoid-induzierbaren K inase 1
SSC	S ide scatter
SSC	S aline- S odium- C itrat
SSEA-1	S tage- S pecific E mryonic A ntigen 1
TA Population	T ransient amplifying population
TBS	T ris buffered saline
Tcf	T -cell factor
TGF- β	T ransforming growth factor β
TNF- α	T umornekrosisfaktor- α
TuJ1	β -tubulin III
Wnt	W ingless, I nt
YPD	Y east/ P epton/ D extrose Medium
ZNS	Z entrales N ervensystem

7.3 Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei all denen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Prof. Dr. T. Skutella für die Stellung des Promotionsthemas, das stete Interesse am Erfolg der Arbeit, sowie deren Begutachtung.

Prof. Dr. A. Nordheim für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit an der Fakultät für Biologie der Eberhard Karls-Universität Tübingen zu vertreten.

Ganz besonders danken möchte ich PD Dr. L. Just, für die Betreuung meiner Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen, das es mir erlaubte frei zu forschen.

Prof. Dr. H. Brunner und die Peter und Traudl Engelhorn Stiftung ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen Kooperationspartnern, durch deren Interesse und Hilfe diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden konnte: Dr. H.-J. Bühring, G. Geiger, die Mitarbeiter der Hirnforschung, Prof. Dr. F. Lang, Dr. A. Mack, Dr. F. Obermayr/Prof. Dr. J. Fuchs, Dr. H. Schwarz, T. Sinnberg, Dr. K. Sohn/Dr. S. Rupp und Dr. S. Wagner/Prof. Dr. A. Königsrainer.

Des Weiteren danke ich allen Kollegen und insbesondere der „Darmgruppe“, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Nicht vergessen möchte ich meine Eltern, Freunde, meine Schwester und Jens, die stets Vertrauen in mich hatten und immer für mich da waren.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Petra Marion Bareiß
Geboren: 04.04.1977, Mutlangen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Grundschule Schlechtbach	09/1983 – 08/1987
Realschule Rudersberg	09/1987 – 07/1993
Ausbildung zur Kauffrau für Bürokommunikation, Kreissparkasse Waiblingen	09/1993 – 02/1996
Anstellung KSK Waiblingen, Filialdirektion Schorndorf	02/1996 – 09/1996
Wirtschaftsoberschule Stuttgart	09/1996 – 07/1998
Studium der Biologie (Grundstudium) Universität Hohenheim	10/1998 – 09/2000
Studium der Biologie (Hauptstudium) Universität Tübingen	10/2000 – 01/2004
<u>Thema der Diplomarbeit:</u> Experimentelle Untersuchung zur Mikrosatellitenvariation in <i>Drosophila</i> -Arten.	
Promotion Universität Tübingen, Anatomisches Institut/Abteilung Tissue Engineering	02/2004 – 02/2009
<u>Thema der Dissertation:</u> Charakterisierung und Isolierung von adulten, entodermalen Vorläufer- und Stammzellen aus dem Mikro- kompartiment der Darmkrypte	

7.5 Veröffentlichungen

7.5.1 Publikationen

P. M. Bareiss, H.-J. Buehring, S. Wagner, A. Koenigsrainer, T. Skutella, L. Just. Identification of a cell surface marker for isolation of intestinal precursor and stem cells of the human colon.

In Vorbereitung

V. L. Battula, S. Treml, **P. M. Bareiss**, F. Gieseke, H. Roelofs, P. de Zwart, I. Mueller, B. Schewe, T. Skutella, W. E. Fibbe, L. Kanz, H.-J. Buehring. Isolation of Functionally Distinct MSC Subsets Using Antibodies Against CD56, CD271, and Mesenchymal Stem Cell Antigen-1 (MSCA-1; W8B2 Antigen). *Hematologica*. Eingereicht.

M. Metzger*, **P. M. Bareiss***, T. Danker, S. Wagner, J. Hennenlotter, E. Guenther, A. Stenzl, A. Koenigsrainer, T. Skutella, and L. Just. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology*. In Revision.

*equally contribution

P. M. Bareiss, M. Metzger, K. Sohn, S. Rupp, J. S. Frick, I. B. Autenrieth, F. Lang, H. Schwarz, T. Skutella, L. Just. Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an infection model of intestinal mucosa. *Histochem Cell Biol*. 2008 Jun;129(6): 795-804. Epub 2008 Mar 5.

V. L. Battula, **P. M. Bareiss**, S. Treml, S. Conrad, I. Albert, S. Hojak, H. Abele, B. Schewe, L. Just, T. Skutella, and H.-J. Buehring. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*. 2007 Apr;75(4): 279-91. Epub 2006 Dec 11.

M. Metzger, **P. M. Bareiss**, I. Nikolov, T. Skutella, and L. Just. Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Dev Dyn*. 2007 Jan;236(1): 128-33.

L. Bachmann, **P. Bareiß**, and J. Tomiuk. Allelic variation, fragment length analyses and population genetic models: a case study on *Drosophila* microsatellites. *J Zool Sys Evol res*. 2004 42: 215-22.

7.5.2 Patent

Verfahren zur Isolierung von postnatalen und adulten epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen des Darms mithilfe eines monoklonalen Antikörpers.

DE 10 2006 0017 015 A1.