

Einfluss des Mikrobioms auf die Präsenz mucosaler enterischer Gliazellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Hannah Neuhaus

aus Ahlen

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Wehner
2. Gutachter: PD Dr. Ronald Jabs

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.03.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff

Für Bastian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Enterische Gliazellen (EGC)	10
1.1.1 Morphologie, Heterogenität und Subtypen der EGC	10
1.1.2 Funktionen der EGC	11
1.1.3 Embryonale Entwicklung der EGC	14
1.1.4 Gliazellmarker	16
1.1.5 Klinische Relevanz der EGC	21
1.2 Perinatale Entwicklung des intestinalen Mikrobioms	23
1.3 Toll-Like Rezeptoren: Vermittler zwischen Mikrobiom und Darm	26
1.4 Bedeutung des intestinalen Mikrobioms für die Darmfunktionalität	27
1.5 Relevanz des intestinalen Mikrobioms für die mEGC	28
1.6 Fragestellung	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Versuchstiere	32
2.2 Experimentelle Gruppen	32
2.2.1 Adulte Versuchsgruppen	33
2.2.1.1 Antibiosebehandlung in Wildtypmäusen	33
2.2.1.2 Konventionalisierung gnotobiotischer Wildtypmäuse	34
2.2.1.3 Konventionalisierung gnotobiotischer MyD88 ^{-/-} -Mäuse	35
2.2.2 Untersuchung neonataler Wildtyp- und MyD88 ^{-/-} -Mäuse	35
2.3 Probengewinnung und Präparation	36
2.4 Immunhistochemie (IHC)	37
2.5 Quantitative Echtzeit Reverse-Transkriptase PCR (qRT-PCR)	38
2.6 Westernblot	40
2.7 Untersuchung der mikrobiellen Darmbesiedlung	42
2.8 Verwendete Chemikalien	43
2.9 Statistische Datenanalyse	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Generelle Beobachtungen	45

3.2 Antibiosebehandlung in Wildtypmäusen	45
3.2.1 Antibiosebehandlung eradiziert effektiv das kultivierbare intestinale Mikrobiom	45
3.2.2 Antibiosebehandlung führt nicht zur Reduktion glialer Marker in der IHC	46
3.2.3 Antibiosebehandlung hat keinen Einfluss auf die Genexpression glialer Marker ...	48
3.2.4 Antibiosebehandlung führt zu einer reduzierten Expression des Proteins SOX-10 in der ME	49
3.3 Gnotobiotische und konventionalisierte Wildtyp- und MyD88 ^{-/-} -Mäuse im Vergleich.	50
3.3.1 Konventionalisierung führt zur bakteriellen Besiedlung des Darms.....	50
3.3.2 Konventionalisierung hat keinen Einfluss auf gliale Marker in der IHC	51
3.3.3 Konventionalisierung führt MyD88-abhängig zur vermehrten Genexpression glialer Marker	54
3.4 Postnatale Entwicklung in Wildtyp- und MyD88 ^{-/-} -Mäusen	57
3.4.1 Postnatal ist die mucosale Gliamarkerepression MyD88-abhängig.....	57
3.4.2 Postnatale Entwicklung der mucosalen TLR- und IL-1R1-Expression	59
3.4.3 Postnatale Entwicklung der mucosalen GDNF-, IL-1 α - und IL-1 β -Expression	61
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	63
4. Diskussion	65
4.1 Mikrobieller Einfluss auf die mEGC-Regeneration in adulten Mäusen	65
4.2 Mikrobieller Einfluss auf die primäre mEGC-Formation in adulten Mäusen	67
4.3 MyD88-Abhängigkeit mEGC in adulten Mäusen	69
4.4 Postnatale mEGC-Formation unter MyD88-Abhängigkeit.....	70
4.5 Potenzielle Mediatoren der postnatalen mEGC-Formation	71
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Abbildungsverzeichnis	93
8. Tabellenverzeichnis	95
9. Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiose
ACSA2	<i>astrocyte cell surface marker 2</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
CFU	<i>colony forming unit</i> ; koloniebildende Einheit(en)
CONV-D	konventionalisiert
CTL	Kontrollgruppe
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	embryonaler Tag
EGC	Enterische Gliazellen
ENCC	<i>enteric neural crest derived cells</i>
ENS	Enterisches Nervensystem
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>glial cell-line derived neurotrophic factor</i>
GF	<i>germfree</i> ; gnotobiotisch; keimfrei
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GI	Gastrointestinal

HRP	Meerrettichperoxidase
IHC	Immunhistochemie
IL(-1 α , -1 β)	Interleukin(-1 α , -1 β)
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor Typ 1
LPARI	<i>lysophosphatidic acid receptor I</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MC	Mucosa (bestehend aus Lamina epithelialis, Lamina propria mucosae und Lamina muscularis mucosae)
ME	Muscularis externa
mEGC	mucosale EGC
MP	Plexus myentericus; myenterischer Plexus
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
OTU	<i>operating taxonomic unit</i>
P	postnataler Tag
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	PBS mit Triton versetzt
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLP	Paraformaldehyd-Lysin-Phosphat-Puffer
PLP-1	Proteolipidprotein-1

qRT-PCR	quantitative Echtzeit Reverse-Transkriptase PCR
SMP	Plexus submucosus; submuköser Plexus
SOX-10	<i>SRY (sex determining region Y)- box-containing gene 10</i>
TLR (2, 3, 4, 5)	Toll-Like Rezeptor(en) (2, 3, 4, 5)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VKE	Villus-Krypt-Einheiten
WT	Wildtyp(-mäuse)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Enterische Gliazellen (EGC)

Enterische Gliazellen (EGC) bilden den Großteil des Enterischen Nervensystems (ENS) (Gabella, 1971; Zeisel et al., 2018). Man unterteilt das ENS in den submukösen (SMP) und den myenterischen Plexus (MP). Man findet EGC in allen Schichten der Darmwand (Neunlist et al., 2014). Quantitativ gemessen übertreffen EGC Neurone vielfach, wie Studien, die die Glia : Neuronen Ratio untersucht haben, zeigen. Allgemein ist das Verhältnis Glia : Neuronen im MP größer als im SMP (Gulbransen, 2014; Hoff et al., 2008). Es gibt zudem interspezifische Unterschiede: Im Menschen beträgt die Ratio Glia : Neuronen im MP ca. 6-7 : 1, in Mäusen ca. 1 : 1. Im SMP ist das Verhältnis mit 1,3-1,9 : 1 im Menschen ebenfalls höher als in Mäusen mit 0,64 : 1 (Gulbransen, 2014; Hoff et al., 2008). In einer Untersuchung myenterischer Ganglien des humanen Colons hat man im Durchschnitt ca. 129 Glia/mm³ und 39 Neuronen/mm³ messen können, womit sich eine Ratio von ca. 3,3 : 1 ergeben würde (Graham et al., 2020). Zudem variiert die EGC-Dichte im humanen ENS abhängig von der Darmregion (Hoff et al., 2008). Insgesamt schätzt man, dass das humane ENS mehrere hundert Millionen EGC enthält (Hoff et al., 2008). EGC interagieren mit Neuronen, Muskel-, Endothel-, Immun-, Epithel- und enteroendokrinen Zellen, sowie extrinsischen Nervenfasern (Grubišić und Gulbransen, 2017; Neunlist et al., 2014; Rosenberg und Rao, 2021). EGC kommen als Schnittstelle zwischen Immun-, Nerven-, enteroendokrinem System und der Umwelt eine bedeutsame Rolle in der Homöostase des Gastrointestinalen (GI) Traktes zu (Rosenberg und Rao, 2021). Die Beteiligung EGC an zahlreichen (patho-)physiologischen Mechanismen im Darm ist bereits belegt (siehe **Kapitel 1.1.2** und **1.1.5**). Die detaillierten Zusammenhänge sind Gegenstand aktueller Forschung (Rosenberg und Rao, 2021).

1.1.1 Morphologie, Heterogenität und Subtypen der EGC

Die Morphologie EGC ist bisher hauptsächlich in Nagern und weniger in Menschen beschrieben worden (Rosenberg und Rao, 2021).

Morphologisch unterscheiden sich die EGC maßgeblich von dem ansonsten im peripheren Nervensystem vorherrschenden Gliazelltyp, den Schwann-Zellen (Gabella, 1971; Grubišić und Gulbransen, 2017). EGC haben feine, dendritisch verzweigte Fortsätze, mit

denen sie zwischen die Perikarya und Axone der Neurone reichen, jedoch ohne Myelinscheiden auszubilden (Gabella, 1971). Eine vergleichende Genexpressionsanalyse EGC mit anderen Gliazellen (wie Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia, Schwann-Zellen) verdeutlicht deren Heterogenität: EGC unterscheiden sich grundlegend von anderen Gliazelltypen und sind mit diesen nicht vergleichbar (Rao et al., 2015). Auch unter den EGC gibt es eine große Diversität: Sie sind heterogen in ihrer Lokalisation, Morphologie, ihren Transkriptionsmustern und ihren Interaktionen mit anderen Zelltypen (Grundmann et al., 2019).

Vor einigen Jahren wurde eine Unterscheidung EGC anhand ihrer Morphologie und Lokalisation in vier verschiedene Subtypen vorgenommen: intraganglionäre bzw. protoplasmatische, interganglionäre bzw. fibröse, muköse und intramuskuläre EGC (Boesmans et al., 2015; Gulbransen und Sharkey, 2012). Mittlerweile ist es obsolet, EGC lediglich anhand dieser Einteilung zu unterscheiden. Durch die Entwicklung neuer Methoden zur *single-cell*- und *single-nuclei*-RNA-Sequenzierung wurde eine genauere Analyse und Differenzierung der EGC möglich. Es wurde dabei deutlich: EGC unterscheiden sich untereinander maßgeblich durch ihre heterogenen Transkriptionsmuster (Drokhlyansky et al., 2020; Zeisel et al., 2018). Bisher konnten Drokhlyansky et al. (2020) anhand dieser Methoden allein in der humanen Muscularis propria der Mucosa sechs verschiedene Subtypen klassifizieren. Zeisel et al. (2018) klassifizierten im murinen ENS bereits sieben verschiedene Subtypen.

Derzeit wird eine Unterscheidung anhand funktioneller Subtypen angestrebt (Drokhlyansky et al., 2020; Rosenberg und Rao, 2021). Man weiß mittlerweile, dass EGC eine hohe Plastizität aufweisen und sich phänotypisch stark verändern können (Valès et al., 2018). Ob die beobachtete hohe morphologische Diversität tatsächlich durch funktionell grundlegend unterschiedliche Subtypen, oder durch eine hohe Plastizität begründet ist, ist derzeit nicht geklärt und Bestandteil der aktuellen Forschung (Grundmann et al., 2019; Rosenberg und Rao, 2021).

1.1.2 Funktionen der EGC

Entsprechend ihrer Heterogenität und ihrer Interaktionen mit verschiedensten Zelltypen, sind die Funktionen EGC in der Darmphysiologie komplex (Rosenberg und Rao, 2021).

Auch wenn bisher kaum Aussagen zu funktionellen Subtypen gemacht werden können, wurden zahlreiche Funktionen der EGC im Laufe der letzten Jahre beobachtet (Rosenberg und Rao, 2021). Einige davon werden im Folgenden beschrieben.

Die Beteiligung EGC an verschiedenen inflammatorischen Prozessen ist mehrfach beschrieben worden, dennoch ist die genaue Rolle der EGC in diesen noch nicht vollends verstanden (Neunlist et al., 2014; Rosenberg und Rao, 2021). Grundsätzlich sind EGC fähig, auf äußere proinflammatorische Stimuli zu reagieren. Sie können beispielsweise durch den Interleukin-Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) auf Chemokine wie Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) zur reaktiven Gliose aktiviert werden (Schneider et al., 2022; Stoffels et al., 2014). Zudem können IL-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie Lipopolysaccharide (LPS) EGC zur Freisetzung von *glial cell-line derived neurotrophic factor* (GDNF) stimulieren (von Boyen et al., 2006). Auch können sie durch inflammatorische Stimuli zur *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)-Freisetzung stimuliert werden, was wiederum zur Aktivierung von Makrophagen führt (Grubišić et al., 2020). Neben Makrophagen können EGC durch ihre antigenpräsentierende Funktion T- und B-Lymphozyten aktivieren und interagieren somit neben dem unspezifischen auch mit dem spezifischen Immunsystem (Chow et al., 2021).

In einer älteren Publikation wurde eine massive hämorrhagische und nekrotisierende, tödlich verlaufende Enteritis in Folge einer EGC-Ablation in Mäusen beschrieben (Bush et al., 1998). Auch Cornet et al. (2001) konnten ähnliche Beobachtungen machen. Man postulierte daher eine entscheidende Rolle der EGC für die Aufrechterhaltung der intestinalen Epithelzellbarriere und somit der Darmintegrität (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Diese Hypothese wurde auch durch weitere Studien unterstützt. Insbesondere S-Nitrosoglutathion, *transforming growth factor β -1* (TGF β -1), 15-Deoxy-Delta-12,14-Prostaglandin J2 (15dPGJ2) und *pro epidermal growth factor* (proEGF) wurden als von EGC freigesetzte Mediatoren ermittelt, die die Homöostase der Epithelzellbarriere aufrechterhalten (Bach-Ngohou et al., 2010; Neunlist et al., 2007; Savidge et al., 2007; van Landeghem et al., 2011). Insgesamt scheinen EGC somit zelladhäsions- und differenzierungsfördernde Wirkung auf Epithelzellen zu haben (van Landeghem et al., 2009).

Neuere Publikationen zweifeln die von Bush et al. (1998) postulierte Mucosa-Zerstörung als Folge der EGC-Ablation an (Rao et al., 2017). Zwei weitere in vivo Versuche zeigten

keine Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion durch die Ablation EGC in Mäusen (Nasser et al., 2006; Rao et al., 2017). Es konnte gegenteilig sogar gezeigt werden, dass eine EGC-Ablation den Inflammationsprozess in einem Colitis-Mausmodell eindämmen konnte (MacEachern et al., 2015).

Ungeachtet dessen: Aktuelle Versuche belegen eine Beteiligung EGC an der Regeneration mucosaler Schäden: EGC stimulieren die Makrophagen-Migration, sowie deren Differenzierung zu einem antiinflammatorisch wirkenden Typus nach mucosaler Schädigung (Stakenborg et al., 2022). Außerdem fördern sie unter akuter und chronischer Inflammation die Erneuerung intestinaler Stammzellen, aus welcher sich neue Epithelzellen generieren (Baghdadi et al., 2022). Unter inflammatorischen Bedingungen von EGC vermehrt freigesetztes GDNF hat einen antiapoptotischen Einfluss auf die Epithelzellbarriere und die EGC selbst (Steinkamp et al., 2003; Steinkamp et al., 2012; von Boyen et al., 2006). Auch eine neuere Arbeit bestätigt die Bedeutsamkeit des von EGC produzierten GDNFs für die Aufrechterhaltung der Epithelzellbarriere (Meir et al., 2021).

Mehrere Studien belegen die Relevanz EGC für die Darmmotilität bzw. -peristaltik. In verschiedenen Publikationen kam es in Folge einer selektiven EGC-Ablation zu Störungen der Darmperistaltik mit einer konsekutiven Verlängerung des GI-Transits (Nasser et al., 2006; Rao et al., 2017). Unsere Arbeitsgruppe hat bereits bewiesen, dass inflammatorische Prozesse, durch GI-Manipulation oder Trauma ausgelöst, über die Aktivierung EGC (reaktive Gliose) wesentlich zur Pathogenese des postoperativen Ileus beitragen (Hupa et al., 2019; Schneider et al., 2021; Schneider et al., 2022; Stoffels et al., 2014). Die Aktivierung EGC erfolgt hierbei vor allem durch von Leukozyten freigesetztem IL-1 β und durch Adenosintriphosphat (ATP) (Hupa et al., 2019; Schneider et al., 2021; Stoffels et al., 2014). Die EGC-Aktivierung führt zur reaktiven Gliose, Interleukin-6- und *monocyte chemoattractant protein-1*-Freisetzung sowie zur Makrophagen-Aktivierung und letztlich zur Entwicklung eines Ileus (Schneider et al., 2022; Stoffels et al., 2014).

Des Weiteren wird eine wichtige Rolle EGC in der Entwicklung enterischer Neurone und dem Ausbau des enterischen neuronalen Netzwerkes (axonale Ausläufer und Synapsenbildung) vermutet (Le Berre-Scoul et al., 2017). Sie scheinen eine Art Reservoirfunktion für die Neurogenese im adulten Darm zu haben und könnten als neuronale Progenitorzellen fungieren (Guyer et al., 2021; siehe auch **Kapitel 1.1.3**). Es wurden auch

neuroprotektive Wirkungen der EGC sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter vermehrten oxidativen Stress beobachtet (Abdo et al., 2010; Guyer et al., 2021). Rao et al. (2017) konnten nach EGC-Ablation wiederum keine Auswirkungen auf die neuronale Überlebensfähigkeit beobachten und zweifeln diese an.

Neuere Erkenntnisse lassen annehmen, dass EGC zusammen mit der extrazellulären Matrix an dem Aufbau einer Schrankenfunktion zwischen Blut und myenterischen Plexus beteiligt sind, ähnlich der Blut-Hirn-Schranke. Eine Rolle dieser bestünde darin, proinflammatorische Leukozyten und Zytokine an der Invasion in den myenterischen Plexus zu hindern und somit vor einer Neuroinflammation zu schützen (Dora et al., 2021).

1.1.3 Embryonale Entwicklung der EGC

Die Entwicklung des ENS beginnt in der embryonalen Phase (Burns und Le Douarin, 1998). Aus der ektodermalen Neuralleiste entspringende Zellen (ENCC, *enteric neural crest derived cells*) wandern in das mesenchymale Darmrohr ein und bilden die Progenitorzellen sowohl der enterischen Neurone als auch der EGC (Le Douarin und Teillet, 1973). Im murinen Darm findet man diese Zellen ab dem embryonalen Tag (E) 9.5, im humanen Darm ab der 4. Schwangerschaftswoche (Nagy und Goldstein, 2017). Der größte Teil des ENS wird von Zellen aus der vagalen Neuralleiste gebildet. Sie besiedeln den gesamten Darm in rostrokaudaler Richtung (Le Douarin und Teillet, 1973; Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020). Sie bilden zuerst den myenterischen Plexus und wandern von dort aus radiär nach innen, um den submukösen Plexus zu bilden (Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020). In Mäusen entwickelt sich der submuköse Plexus erst postnatal, in Menschen schon früher (Nagy und Goldstein, 2017). Zumindest in Mäusen bilden auch Zellen der sakralen Neuralleiste Teile des ENS. Diese bilden zunächst den Plexus pelvicus und wandern anschließend entlang der Nervenfasern in den Hinterdarm ein und bilden ebenso enterische Neurone und EGC (Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020). Im humanen Darm ist dies noch nicht untersucht (Nagy und Goldstein, 2017). Die ENCCs unterliegen bezüglich ihrer Proliferation, Migration, Ganglien- und Synapsenbildung sowie ihrer Differenzierung präzisen und komplexen Regulationsmechanismen (Nagy und Goldstein, 2017).

Die präzise Regulierung der neuronalen und glialen Differenzierung ist entscheidend für eine regelhafte ENS-Funktionalität (Lake und Heukeroth, 2013; Nagy und Goldstein, 2017). Die Differenzierung der ENCC findet in der gesamten embryonalen und fetalen Entwicklung sowie in den ersten drei postnatalen Wochen statt (Pawolski und Schmidt, 2020). Aktuell gehen Pawolski und Schmidt (2020) davon aus, dass ENCC sich zu drei verschiedenen Zelltypen differenzieren: zu neuronalen und glialen Progenitoren sowie bipotenten, proliferierenden Neuro-Glia-Progenitoren. Während der Differenzierung verändern diese Zellen die Expression verschiedener Proteine und Transkriptionsfaktoren (siehe **Abb. 1** und **Kapitel 1.1.4**). Sobald die Zellen neuronal differenziert sind, verlieren sie ihre Fähigkeit zur Proliferation (Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020). Progenitorzellen und EGC hingegen können weiterhin durch Proliferation neue Zellen generieren (Cossais et al., 2016; Lake und Heukeroth, 2013).

Das ENS liegt in einer sehr dynamischen und vulnerablen Umgebung. Es muss sich ständig im Rahmen einer Neuro- und Gliogenese regenerieren. Gliogenese findet auch im Adulten ständig statt (Joseph et al., 2011). Ob im Adulten auch Neurogenese stattfindet, ist derzeit unklar (Pawolski und Schmidt, 2020). Während Joseph et al. (2011) dem widersprechen, sprechen die Ergebnisse von Kulkarni et al. (2017) für eine ständige neuronale Apoptose und Neurogenese.

Der Ursprung der sich neu bildenden enterischen Neurone und EGC ist noch ungeklärt (Pawolski und Schmidt, 2020). Vermutlich verbleibt im Adulten eine Art sich selbst erneuernde, den ENCC ähnliche Stammzellpopulation, aus welcher sich neue Zellen des ENS bilden können (Lake und Heukeroth, 2013; Pawolski und Schmidt, 2020). In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt: Im adulten murinen und humanen Darm verbleiben ruhende Progenitorzellen, die fähig sind, sich zu Neuronen, Glia und Myofibroblasten zu differenzieren sowie sich selbst zu erneuern (Kruger et al., 2002; Metzger et al., 2009; Nagy und Goldstein, 2017; Natarajan et al., 1999). Einige Autoren vermuten, dass neue Neurone aus sich transdifferenzierenden EGC generiert werden (Guyer et al., 2021; Laranjeira et al., 2011; Pawolski und Schmidt, 2020; Valès et al., 2018). Schließlich wurde gezeigt, dass neuronale Vorläuferzellen Gliazellmarker exprimieren (Laranjeira et al., 2011). Bei diesen könnte es sich neben differenzierten EGC jedoch ebenso um eine unreife EGC-Subpopulation oder einem EGC-ähnlichen Zelltyp handeln (Grundmann et al., 2019).

Letztendlich ist es derzeit ungeklärt, ob sich im Adulten neue ENS-Zellen aus verbleibenden Stammzellen, EGC oder sogar Schwann-Zell-Vorläufern bilden (Pawolski und Schmidt, 2020). Diese Fragestellung ist insbesondere interessant für die Entwicklung neuer Therapieansätze bei Erkrankungen mit ENS-Defekten, wie einer autologen Stammzelltherapie (Lake und Heukeroth, 2013).

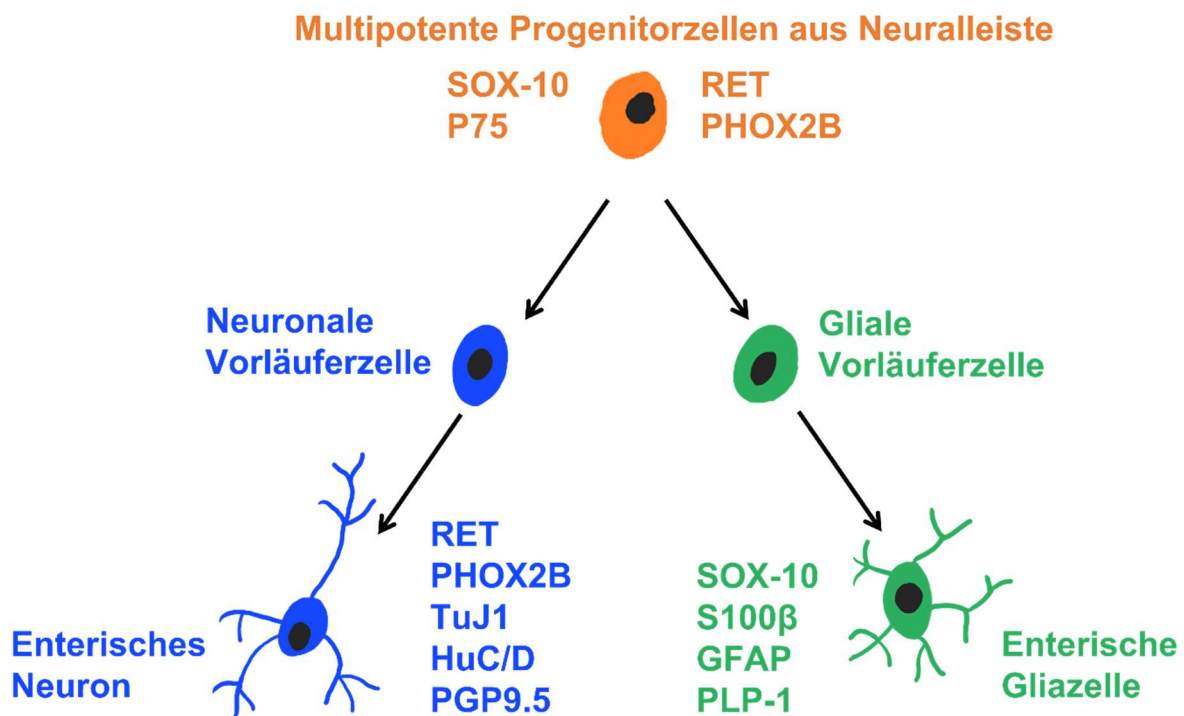


Abb. 1: Progenitorzellen des Enterischen Nervensystems können sich zu Enterischen Gliazellen und Neuronen differenzieren und verändern dabei die Expression verschiedener Marker.

Modifiziert nach Lake und Heukeroth (2013) und Pawolski und Schmidt (2020). In der Abbildung sind typische Marker für die jeweiligen Zelltypen dargestellt.

1.1.4 Gliazellmarker

Traditionelle, häufig verwendete Marker EGC sind S100β, *SRY* (*sex determining region Y*)-*box-containing gene 10* (SOX-10) und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Sie werden intrazellulär exprimiert (Grubišić und Gulbransen, 2022). Keiner dieser Marker markiert alle EGC (Grundmann et al., 2019). Alle EGC exprimieren mindestens einen oder zwei

dieser Marker (Pawolski und Schmidt, 2020). Touvron et al. (2022) haben festgestellt, dass sich die (sub-)mukösen und myenterischen EGC entsprechend ihrer vermutlich unterschiedlichen Funktionen auch in der Expression dieser Marker unterscheiden.

Im Folgenden werden diese EGC-Marker kurz beschrieben.

Der Transkriptionsfaktor SOX-10 wird bereits von den aus der Neuralleiste migrierenden Progenitorzellen exprimiert. Bei einer glialen Differenzierung wird die Expression aufrechterhalten, bei einer neuronalen Differenzierung geht sie verloren (Lake und Heukeroth, 2013; Young et al., 2003; siehe **Abb. 1**). SOX-10 fördert die Entwicklung zu EGC (Britsch et al., 2001; Lake und Heukeroth, 2013; Paratore et al., 2001). SOX-10 markiert fast alle EGC (Boesmans et al., 2015). Es gibt nur wenige SOX-10⁻ EGC, die jedoch von SOX-10⁺ Vorläufern abstammen (Boesmans et al., 2015). (Sub-)muköse EGC exprimieren weniger SOX-10 als myenterische (Touvron et al., 2022).

Das kalziumbindende Protein S100 β findet man weder in undifferenzierten Progenitorzellen aus der Neuralleiste noch in direkten glialen Vorläufern. Es wird in Mäusen ab E14.5 in EGC exprimiert (Young et al., 2003). Im Menschen findet man S100 β ab der 12. Schwangerschaftswoche. Die Expression nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf bis zum 2. Trimenon zu, beginnt vor allem im myenterischen Plexus und etwas später im submukösen und mukösen Plexus (Grundmann et al., 2019). Die S100 β -Expression ist in allen Wandschichten des humanen Darms stark ausgeprägt (Grundmann et al., 2019). Fast alle S100 β exprimierende EGC exprimieren auch SOX-10. Andersrum gilt dies nicht (Pawolski und Schmidt, 2020).

Das gliale Intermediärfilament GFAP kann im murinen Darm ab dem Zeitpunkt E16 detektiert werden, es wird nicht von den Progenitorzellen exprimiert und gilt als relativ später Marker glialer Zellen (Rothman et al., 1986). Im humanen Darm kann man eine GFAP-Expression erst postnatal beobachten (Grundmann et al., 2019).

Neben den EGC wird GFAP im Darm auch von Schwann-Zellen exprimiert, die mit (peripheren) extrinsischen Nerven in die Darmwand einwachsen (Rothman et al., 1986). GFAP wird nur von einem Teil EGC exprimiert (Pawolski und Schmidt, 2020). Die Expression unterliegt einem zeitlichen Wandel, sie ist auch im adulten murinen Darm transient, was für eine hohe Plastizität EGC spricht (Grundmann et al., 2019; Pawolski und Schmidt, 2020). Die Bedeutung hiervon ist noch unklar. Es werden Zusammenhänge mit mechanischen Einflüssen und physiologischen Funktionen diskutiert. Zudem könnte die

Expression ein Marker glialer Reifung sein (Pawolski und Schmidt, 2020). Man hat auch interspezifische Unterschiede festgestellt: In Nagern kann man immer GFAP-exprimierende Zellen finden, im Menschen nur im kompromittierten Darm (Grundmann et al., 2019). Die GFAP-Expression verändert sich insbesondere unter entzündlichen und krankhaften Bedingungen, so hat man bei Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa aber auch beim kolorektalem Karzinom eine vermehrte GFAP-Expression festgestellt (Grundmann et al., 2019).

Vor wenigen Jahren wurde der EGC-Marker Proteolipidprotein-1 (PLP-1) entdeckt. Es handelt sich um ein normalerweise für die Myelinisierung wichtiges Protein. Es wird von nahezu allen EGC exprimiert, obwohl diese nicht myelinisierend sind (Rao et al., 2015). Die Funktion von PLP-1 im ENS ist noch unbekannt (Grundmann et al., 2019).

Die meisten EGC coexprimieren SOX-10, S100 β und PLP-1, während GFAP nur von wenigen EGC exprimiert wird (Rao et al., 2015).

Zuletzt hat man neue EGC-Marker entdeckt, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden: ACSA2 (*astrocyte cell surface marker 2*) und LPAR1 (*lysophosphatidic acid receptor 1*). Beide zeigten sich als gliaspezifisch im Darm. ACSA2, ein bekannter Astrozytenmarker, wird vor allem von mucosalen und myenterischen EGC, jedoch nur von 60 - 72 % der intramuskulär gelegenen EGC exprimiert. Die ACSA2-Expression zeigt sich unter gesunden und inflammatorischen Bedingungen als stabiler Marker. LPAR1 hingegen wird von allen EGC exprimiert, unter Inflammation jedoch deutlich reduziert (Grubišić und Gulbransen, 2022).

Trotz der unterschiedlichen Expressionsmuster ist es wahrscheinlich, dass alle EGC aus dem gleichen Typ Progenitorzelle hervorgehen. Die Expressionsmuster der EGC scheinen dynamisch und in Abhängigkeit von Lokalisation und Zeit in Rahmen einer Spezialisierung oder Antwort auf äußere Reize variabel zu sein. Diese Plastizität wird möglicherweise bis in das adulte Alter aufrechterhalten (Boesmans et al., 2015). Hierfür sprechen auch die von Cornet et al. (2001) beobachtete Aufregulation von GFAP in kranken Darmarealen von Colitis Ulcerosa Patienten oder die GFAP-Aufregulation im Rahmen einer reaktiven Gliose nach Reperfusion eines ischämischen Darms (Klein et al., 2017).

Zur weiteren Untersuchung EGC kann der neurotrophe Faktor GDNF (*glial cell-line derived neurotrophic factor*) verwendet werden. Zum einen wird GDNF von EGC sezerniert

niert. Dies ist insbesondere bei Inflammation der Fall (von Boyen et al., 2004; von Boyen et al., 2006). GDNF hat eine antiapoptotische Wirkung auf Epithelzellen im Colon und auf EGC selbst (Steinkamp et al., 2003; Steinkamp et al., 2012). Es kann die epitheliale Barriere stärken und dessen Permeabilität herabsetzen (Zhang et al., 2010). Zum anderen ist GDNF ein wichtiger Regulator der ENS-Entwicklung: Während der embryonalen Entwicklung fördert es die oben beschriebene Migration (siehe **Kapitel 1.1.3**), Proliferation und das Überleben der ENCC. Als Chemoattraktant fördert es sowohl die rostrokale als auch radiäre Migration der ENCC (Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020).

Die wichtigsten Eigenschaften der genannten Gliazellmarker und von GDNF sind in der **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tab. 1: Gliazellmarker und GDNF im Vergleich.

Legende: * bei GDNF handelt es sich nicht um einen Gliazellmarker.

Quellen: ¹Boesmans et al. (2015); ²Britsch et al. (2001); ³Brun et al. (2015); ⁴Cornet et al. (2001); ⁵Grubišić und Gulbransen (2022); ⁶Grundmann et al. (2019); ⁷Klein et al. (2017); ⁸Lake und Heukeroth (2013); ⁹Nagy und Goldstein (2017); ¹⁰Paratore et al. (2001); ¹¹Pawolski und Schmidt (2020); ¹²Rao et al. (2015); ¹³Rothman et al. (1986); ¹⁴Steinkamp et al. (2003); ¹⁵Steinkamp et al. (2012); ¹⁶Touvron et al. (2022); ¹⁷von Boyen et al. (2004); ¹⁸von Boyen et al. (2006); ¹⁹Young et al. (2003); ²⁰Zhang et al. (2010).

	Funktion, Lokalisation	Beginn der Expression im Darm	Exprimieren-der EGC-Typ	Weitere exprimier-ende Zelltypen (im Darm)	Weitere Besonderheiten
SOX-10	Transkriptionsfaktor, intrazellulär ⁵	E10.5 (Progenitorzellen) ^{13,19}	Fast alle EGC ^{2,10,19}	Gliale und neuronale Progenitorzellen ^{10,19}	Wichtig für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Status der Progenitorzellen; wichtig für die Differenzierung zur EGC ^{2,8,10}
S100β	Kalziumbindendes Protein, intrazellulär ⁵	In Mäusen: E14.5 ¹⁹ (in EGC) In Menschen: ab 12. SSW (in EGC) ⁶		Einige submuköse Neurone ¹⁶	
GFAP	Intermediärfilament, intrazellulär ⁵	In Mäusen: ab E16 ¹³ (in EGC) In Menschen: postnatal ⁶	Vor allem intraganglionäre EGC ¹	Enterische Schwannzellen ¹³	Situativ gesteigerte Expression in EGC bzw. transiente Expression ^{4,6,7,11} In Menschen nur im kompromittierten Darm, insbesondere unter Inflammation ⁶
PLP-1	Myelinisierendes Protein, Funktion im ENS unbekannt ⁶	Bisher nur postnatal gezeigt ^{6,12}	Fast alle EGC ¹²		
ACSA2	Auf Zelloberfläche ¹⁶		Vor allem mucosale und myenterische EGC ⁵		Stabiler Marker ⁵ , eignet sich für FACS-Sorting ⁵
LPARI	Auf Zelloberfläche ⁵		alle EGC ⁵		Unter Inflammation deutlich reduziert ⁵ , eignet sich für FACS-Sorting ⁵
GDNF*	Neurotropher Faktor			Glatte Muskelzellen ³	Inbesondere im inflammatorischen Geschehen von GFAP ⁺ EGC sezerniert ^{17,18} , stärkt Epithelzellarbarriere ²⁰ , wirkt antiapoptotisch auf Epithelien ¹⁴ und EGC ¹⁵ , Chemoattraktive Wirkung auf ENCC ^{9, 11} Fördert Proliferation und Überleben der ENCC ^{9,11}

1.1.5 Klinische Relevanz der EGC

Aus den oben genannten Funktionen EGC resultiert eine vielseitige klinische Relevanz der EGC. Auch wenn die genauen Zusammenhänge noch nicht im Detail erforscht sind, ergeben sich deutliche Hinweise für eine Beteiligung EGC an der Entstehung einiger Darmerkrankungen. Neuere Studien lassen zudem eine Beteiligung an neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS vermuten (Rosenberg und Rao, 2021).

Ältere Publikationen von Bush et al. (1998) und Cornet et al. (2001), in welchen es in Folge einer selektiven Ablation EGC zur hämorrhagischen Enterokolitis kam, vermuteten hierin einen möglichen Pathomechanismus von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Auch wenn, wie in **Kapitel 1.1.2** beschrieben, mittlerweile die Rolle EGC für die Aufrechterhaltung der mucosalen Epithelzellbarriere umstritten ist, liegt eine Beteiligung EGC an der Pathophysiologie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa aufgrund ihrer Rolle in inflammatorischen Prozessen nahe (Pochard et al., 2018). Tatsächlich konnte man in Gewebeproben aus den Därfen von Morbus Crohn-Patienten geschwächte EGC-Netzwerke und bei Colitis Ulcerosa-Patienten eine Aufregulation von GFAP feststellen (Cornet et al., 2001). Eine andere Publikation beschreibt vermehrt apoptotische EGC in humanen Proben von diesen Patienten (Bassotti et al., 2009). Welche Rolle diese Veränderungen letztendlich klinisch für die Entwicklung dieser Erkrankungen spielen, ist derzeit noch unklar (Pochard et al., 2018; Rosenberg und Rao, 2021).

Schon vor einigen Jahren vermutete man, dass eine Fehlfunktion bzw. das Fehlen EGC die Entstehung der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) begünstigt (Bush, 2002). Die NEC ist ein Krankheitsbild, das insbesondere Frühgeborene betrifft und häufig tödlich verläuft (Neu und Walker, 2011). Vor kurzer Zeit wurde ein möglicher Pathomechanismus beschrieben, der diese Vermutung weiter unterstützt: Man vermutet, dass eine Inflammation in Folge einer Dysmotilität zur EGC-Depletion führt und dies wiederum zur NEC führt. Unter gesunden Bedingungen würden EGC BDNF sezernieren und dies wiederum protektiv gegen die NEC-Entstehung wirken (Kovler et al., 2021).

Es gibt auch erste Hinweise für eine Beteiligung EGC an der Genese des kolorektalen Karzinoms. Die Datenlage hierzu ist bisher spärlich und zum Teil gegensätzlich (Rosenberg und Rao, 2021). Valès et al. (2019) und Yuan et al. (2020) fanden erste Hinweise für eine protumorigene Wirkung EGC auf die Entstehung eines Karzinoms: Sie scheinen in diesen Studien die Entwicklung präkanzeröser dysplastischer Verän-

derungen, die Tumorentstehung und das Tumorwachstum zu fördern (Valès et al., 2019; Yuan et al., 2020). Andererseits scheint eine höhere GFAP-Expression in humanen Proben eher mit gut differenzierten Tumoren und einer niedrigen Proliferationsrate assoziiert und somit ein prognostisch günstiger Faktor zu sein (Târtea et al., 2017).

Die bedeutende Funktion EGC für den GI-Transit ist bereits in **Kapitel 1.1.2** beschrieben worden. Insbesondere unsere Arbeitsgruppe hat entscheidende pathomechanistische Schritte in der Entstehung des postoperativen Ileus aufgedeckt (siehe **Kapitel 1.1.2**). Die EGC-Aktivierung in Folge einer postoperativen Entzündungsreaktion ist dabei entscheidend und stellt einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien dar (Hupa et al., 2019; Schneider et al., 2021; Schneider et al., 2022; Stoffels et al., 2014).

Interessanterweise gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem enterischen Mikrobiom und der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen belegen. Das ENS wird als Brücke zwischen dem Darmmikrobiom und dem ZNS gesehen. Das Darmmikrobiom beeinflusst wesentlich die Entwicklung des ENS. Bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen wurden mehrfach sowohl Veränderungen im ENS als auch im Darmmikrobiom beobachtet. Das ENS ist bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen vulnerabel. Viele Patienten mit Morbus Parkinson, Myasthenia gravis, Multipler Sklerose, Guillan-Barré-Syndrom, Amyotropher Lateralsklerose oder nach einem Schlaganfall leiden unter Symptomen wie Dysphagie und Obstipation. Ein starker Zusammenhang zwischen intestinalem Mikrobiom, ENS, neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen wird über die Darm-Hirn-Achse vermutet. Diesbezüglich steht die Forschung jedoch noch am Anfang (Geng et al., 2022).

Speziell bei Morbus Parkinson wird ein pathophysiologischer Zusammenhang mit dem ENS und auch mit den EGC im Speziellen vermutet. Die für die Erkrankung typischen neuronalen alpha-Synuclein-Einschlusskörper findet man nicht nur im ZNS, sondern auch im ENS von Parkinson-Patienten. Vermutlich nimmt die Erkrankung ihren Ursprung im ENS und breitet sich von dort bis ins ZNS aus (Braak et al., 2006; Rosenberg und Rao, 2021). In Colon-Biopsien von Parkinson-Patienten wurde eine gesteigerte Expression der Gliamarker GFAP und SOX-10 sowie proinflammatorischer Zytokine beobachtet (Clairembault et al., 2014; Devos et al., 2013). Genauere Zusammenhänge sind weiter noch nicht bekannt.

Ähnlich verhält es sich mit dem aktuellen Wissensstand zur Multiplen Sklerose. Sowohl in einem Maus-Modell zur Multiplen Sklerose als auch in Gewebeproben von Patienten mit Multipler Sklerose sind degenerative Veränderungen des ENS beobachtet worden, zum Teil sogar noch vor Veränderungen des ZNS (Spear et al., 2018; Wunsch et al., 2017). Man hat hier sowohl im Mausmodell als auch in humanen Proben Antikörper gegen enterische gliale und neuronale Antigene nachweisen können (Spear et al., 2018; Wunsch et al., 2017). Die Expression des Gliamarkers GFAP zeigte sich zudem sowohl bei Spear et al. (2018), als auch bei Wunsch et al. (2017) verändert.

Insgesamt sind EGC klinisch höchst relevant, auch wenn die zugehörigen Pathomechanismen noch nicht im Detail geklärt sind. Hierdurch ergibt sich der große Stellenwert der umfassenden Erforschung EGC.

1.2 Perinatale Entwicklung des intestinalen Mikrobioms

Die Entwicklung des humanen Darmmikrobioms beginnt vor der Geburt. In Mekoniumproben von Neugeborenen konnte eine bakterielle Besiedlung festgestellt werden (Gosalbes et al., 2013). Ebenso konnte man in den Basalplatten von Plazenten intrazelluläre gram⁺ und gram⁻ Bakterien finden (Stout et al., 2013). Beides spricht für einen intrauterin beginnenden Mikrobiomerwerb.

Neugeborene sind in unterschiedlichen Habitaten, wie Haut, Mund, Nasopharynx und Darm von einem einheitlichen Mikrobiom besiedelt. Die Zusammensetzung dieses homogenen Mikrobioms wird entscheidend von dem Geburtsvorgang geprägt. Nach vaginalen Geburten ähnelt das Mikrobiom dem der mütterlichen Vagina. Es enthält vor allem *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* und *Sneathia* spp.. Nach einem Kaiserschnitt ähnelt das Mikrobiom dem der mütterlichen Hautflora, wird zudem jedoch durch nicht-mütterliches Mikrobiom beeinflusst. Es enthält vor allem *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* spp., sowie *Acinetobacter* (Dominguez-Bello et al., 2010). Des Weiteren nimmt das Neugeborene mütterliches Mikrobiom über die Muttermilch auf, welche Bifidobakterien enthält und als wertvolles Synbiotikum gilt (Gueimonde et al., 2007).

Die weitere Entwicklung des Darmmikrobioms in den ersten Lebensjahren ist durch eine zunehmende phylogenetische Vielfalt geprägt, die sich mit dem Alter und unter verschiedenen Einflussfaktoren graduell verändert (Koenig et al., 2011). Das sich entwickelnde kindliche Mikrobiom setzt sich nicht zufällig, sondern aus miteinander interagierenden

Bakterien zusammen (Koenig et al., 2011). Es zeigen sich dabei interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Kombination verschiedener Spezies und ihrem zeitlichen Auftreten (Palmer et al., 2007). Die Stuhlproben von verschiedenen Kindern ähneln sich innerhalb des ersten Lebensjahres untereinander immer mehr, interindividuelle Unterschiede bleiben jedoch bestehen (Palmer et al., 2007). Die qualitative Zusammensetzung ist vor allem durch die Zeit, die quantitative durch verschiedene Ereignisse geprägt (Koenig et al., 2011). Insbesondere die Nahrungsumstellung nimmt großen Einfluss (Koenig et al., 2011; Palmer et al., 2007). Nach der Entwöhnung von der Muttermilch ähnelt das Darmmikrobiom immer mehr dem eines Erwachsenen und entwickelt die Möglichkeiten zur Zersetzung xenobiotischer Verbindungen und zur Vitaminsynthese (Koenig et al., 2011).

Auch in Mäusen wurde die Entwicklung des Darmmikrobioms untersucht. Beim Vergleich des Mikrobioms in Menschen und Mäusen sind grundlegende Unterschiede zu beachten. Menschen und Mäuse ähneln sich zwar in anatomischen, histologischen und physiologischen Gesichtspunkten bezüglich des Darms, es gibt jedoch auch viele Unterschiede, die entscheidende Einflüsse auf das Darmmikrobiom zeigen, wie Hugenholtz und de Vos (2018) zusammengefasst haben: Menschen und Mäuse unterscheiden sich unter anderem hinsichtlich Ernährung (Mäuse als reine Herbivoren, Menschen als Herbi- und Carnivoren), der relativen Darmlänge (bei Mäusen sind sowohl Dünndarm als auch Dickdarm in Bezug auf das Körpergewicht um ein Vielfaches länger als bei Menschen), pH-Wert im Magen (Mäuse: pH 3-4, Menschen: pH 1) histologische Aspekte der Darmmucosa (Kerkring-Falten, Villi-Struktur), Dicke der Mukus-Schicht im Darm und intestinale Transitzeit (die totale Transitzeit ist bei Mäusen um ein Vielfaches schneller als bei Menschen). Nur wenige bakterielle Gene zwischen Mensch und Maus stimmen überein (Hugenholtz und de Vos, 2018). Insgesamt gibt es große qualitative Unterschiede in Bezug auf die bakteriellen Taxa. Bei gleichen bakteriellen Gattungen gibt es große quantitative Unterschiede (Hugenholtz und de Vos, 2018).

Pantoja-Feliciano et al. (2013) untersuchten die postnatale Entwicklung des Darmmikrobioms in Mäusen und verglichen sie mit dem maternalen. Diese Entwicklung ist in Anlehnung an Pantoja-Feliciano et al. (2013) in der **Abbildung 2** dargestellt. Zu Beginn war die Gattung *Streptococcus* dominant, das intestinale Mikrobiom des Nachwuchses ähnelte eher dem vaginalen als dem intestinalen Mikrobiom der Mutter. Nach Entwöhnung

von der mütterlichen Milch (nach P9) dominierten anschließend Lachnospiraceae, Lactobacillus, Clostridiales und Bacteroides. Das Mikrobiom näherte sich dem maternalen an (Pantoja-Feliciano et al., 2013).

Ebenso wie bei Menschen beschrieben, stellt die Nahrungsumstellung von Milch auf feste Nahrung auch im murinen Modell einen entscheidenden Faktor dar (Koenig et al., 2011; Palmer et al., 2007; Pantoja-Feliciano et al., 2013).

Es lässt sich festhalten: Die Entwicklung und Zusammensetzung des humanen und murinen Darmmikrobioms hängen von vielen verschiedenen Faktoren ab. Anatomische und physiologische Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen, Geburtsmodus, Mauslinie, räumliche Umgebung sowie Lebensumstände haben wesentliche Einflüsse, sodass sich die Zusammensetzung des Darmmikrobioms nicht generalisieren lässt. Der Aufbau des Mikrobioms beginnt pränatal, wird postnatal grundlegend geformt und ändert sich im zeitlichen Verlauf. Die mikrobielle Diversität nimmt zu. Die Zusammensetzungen des Mikrobioms im neonatalen und adulten Zustand unterscheiden sich stark. Die Umstellung von der Muttermilch auf feste Nahrung stellt einen besonders einflussreichen Faktor dar.

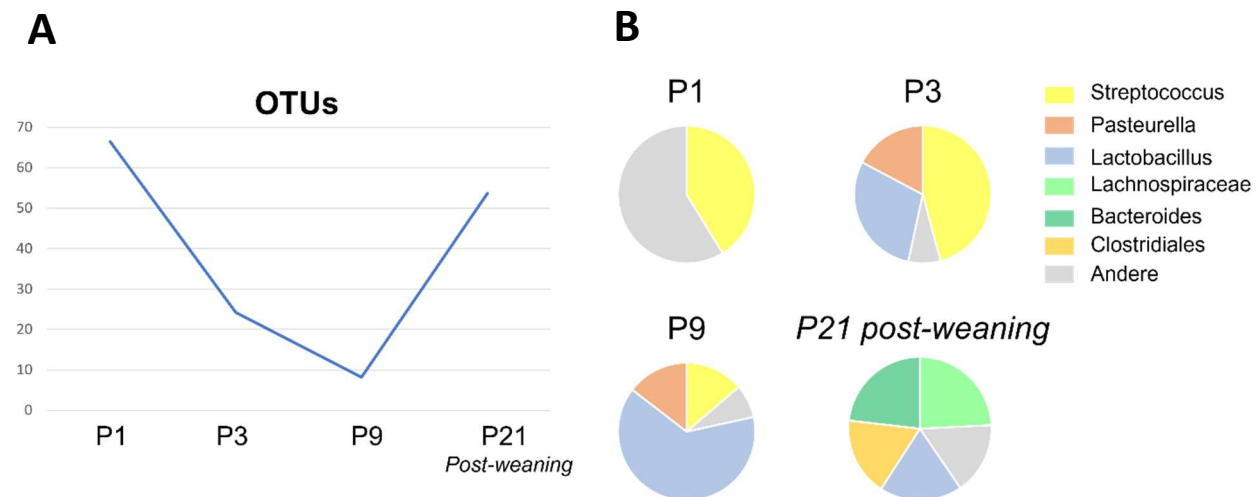


Abb. 2: Postnatale Entwicklung des murinen Darmmikrobioms in Anlehnung an Pantoja-Feliciano et al. (2013).

(A) Dargestellt sind die Mittelwerte der *operating taxonomic units* (OTUs), die Pantoja-Feliciano et al. (2013) in murinen Proben des Darmmikrobioms an den postnatalen Tagen 1, 3, 9 und 21 (P1, P3, P9 und P21) messen konnten. Die mikrobielle Diversität des Darm-

mikrobioms ist an P1 vergleichsweise hoch und nimmt in den folgenden Tagen deutlich ab. Nach der Umstellung von Muttermilch auf feste Nahrung (*post-weaning*; P21) konnte eine deutliche Zunahme der Diversität, insbesondere bei den anaeroben Bakterien, beobachtet werden (Pantoja-Feliciano et al., 2013).

(B) Die bakteriellen Gattungen, die zu den jeweiligen Zeitpunkten (P1, P3, P9, P21) am dominantesten waren, sind dargestellt. Bei P1 ähnelte das Darmmikrobiom dem vaginalen Mikrobiom der Mutter, bei P21 dem maternalen Stuhlmikrobiom. Der zu Beginn dominante Streptococcus-Anteil nahm im Verlauf von ca. 40 % bei P1 auf ca. 2 % bei P21 ab. Während des Säugens stieg der Anteil von Lactobacillus auf über 60 % bei P9 an. Nach der Entwöhnung von der Muttermilch und der Umstellung auf feste Nahrung (*post-weaning*) veränderte sich die Zusammensetzung des Darmmikrobioms zum Zeitpunkt P21 deutlich (Pantoja-Feliciano et al., 2013).

1.3 Toll-Like Rezeptoren: Vermittler zwischen Mikrobiom und Darm

Die mucosale Oberfläche des menschlichen GI-Trakts wird auf etwa 32 m² geschätzt und bildet im Organismus nach der Haut die zweitgrößte Interaktionsfläche mit der Umwelt (Gionchetti et al., 2000; Helander und Fändriks, 2014). Im menschlichen Darm findet man Trillionen von Mikroben, welche mit den menschlichen Zellen in Interaktion treten können (Lozupone et al., 2012). Im Adulten ist die Zusammensetzung des Darmmikrobioms relativ konstant und besteht zum größten Teil aus Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria und Proteobacteria (Geng et al., 2022). Dennoch unterliegt die Zusammensetzung verschiedenen Einflüssen, wie Ernährung, Medikation und Krankheiten (Geng et al., 2022). Insbesondere die postnatale Besiedlung scheint besonders sensibel für solche Einflüsse zu sein (siehe **Kapitel 1.2**).

Über die große Oberfläche des Darms treten verschiedenste intestinale Zellen ständig mit dem Mikrobiom und seinen Stoffwechselprodukten in Interaktion. Als wichtige Vermittler der Interaktionen zwischen Darm und Mikrobiom gelten die *Toll-Like* Rezeptoren (TLR). Hiervon sind im menschlichen Organismus zehn bekannt. Sie gehören zu der Gruppe der *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRRs) und sind in der Lage, bestimmte mikrobielle Strukturen, sogenannte *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), zu erkennen und konsekutiv eine intrazelluläre Signalkaskade zu aktivieren (Frosali et al., 2015). Solche Strukturen findet man sowohl auf der Oberfläche grampositiver als auch gramnegativer Bakterien (Geng et al., 2022). Durch die TLR-Aktivierung kommt es zur Produktion von Interleukinen, Chemokinen und der Transkription bestimmter Gene. Dies ermöglicht dem Körper, auf mikrobielle Reize zu reagieren und Infektionen zu kontrollieren (Frosali et al., 2015). Eine wichtige Rolle in dieser Kaskade spielt das Protein *myeloid*

differentiation factor 88 (MyD88), welches als Adaptermolekül für alle TLR, außer dem Toll-Like Rezeptor 3 (TLR3), vorkommt (Frosali et al., 2015; Medzhitov et al., 1998). Verschiedene Zelltypen im Darm exprimieren TLR, darunter Enterozyten, Makrophagen, Neurone, Glia-, Muskel- und Endothelzellen (Brun et al., 2013; Frosali et al., 2015; Geng et al., 2022).

1.4 Bedeutung des intestinalen Mikrobioms für die Darmfunktionalität

Man vermutet, dass insbesondere im jungen Alter Mikrobiomveränderungen die Darmfunktionalität stören können (Caputi et al., 2017; Hung et al., 2020).

Die Interaktionen zwischen Darmmikrobiom, Darmmotilität, Epithelzellbarriere und ENS wurden in verschiedenen Publikationen untersucht.

Insgesamt berichten mehrere aktuelle Publikationen von einer beeinträchtigten GI-Motilität und verlängerten GI-Transit-Zeit in Folge einer mikrobiomabladierten, mehrwöchigen antibiotischen Therapie in Mäusen (Anitha et al., 2012; Caputi et al., 2017; Ge et al., 2017; Hung et al., 2020; Obata et al., 2020; Vicentini et al., 2021; Yarandi et al., 2020). Nach einem anschließendem Wiederaufbau des Mikrobioms konnte eine Normalisierung der Motilität beobachtet werden (Vicentini et al., 2021). Auch in neonatalen, gnotobiotischen Tieren konnte man eine beeinträchtigte Darmmotilität beobachten (Collins et al., 2014).

Die Homöostase des intestinalen Epithels wird vermutlich durch kommensale Bakterien aufrechterhalten. Durch die Aktivierung von TLR kommt es zur Freisetzung zytoprotektiver Faktoren, wodurch eine resistenzfördernde Wirkung des Epithels gegenüber Verletzungen folgt (Rakoff-Nahoum et al., 2004). So zeigen Toll-Like Rezeptor 2 (TLR2)^{-/-} und Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4)^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Vulnerabilität nach Induktion einer Kolitis in einem Mausmodell (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Darüber hinaus führt die Inhibition der TLR-*Downstream*-Kaskade zu einer gestörten Epithelzellbarriere (Markov et al., 2010; Patel et al., 2012).

Ebenso wurde eine Mikrobiomabhängigkeit des ENS und seiner normalen Funktion beobachtet (Vicentini et al., 2021). Während der Nahrungsumstellung in adoleszenten Mäusen verändert sich neben dem intestinalen Mikrobiom auch die Architektur des ENS wesentlich (Parathan et al., 2020). Auch findet man in keimfrei aufwachsenden neonatalen Mäusen eine deutliche Reduktion der Neurone im myenterischen Plexus (Collins

et al., 2014). Sowohl in neonatalen als auch in juvenilen und adulten Mäusen konnte eine Reduktion enterischer Neurone durch unterschiedliche mikrobiomabladiende Antibiose-Regime beobachtet werden (Caputi et al., 2017; Hung et al., 2019; Vicentini et al., 2021). Vicentini et al. (2021) und Yarandi et al. (2020) konnten eine verstärkte Neurogenese nach Beendigung der antibiotischen Therapie und spontanem Wiederaufbau des Mikrobioms beobachten. Die Antibiose führt auch zu einer veränderten Zusammensetzung der neuronalen Subtypen (Hung et al., 2020). Obata et al. (2020) beschrieben auch einen Einfluss des Mikrobioms auf die neuronale Genexpression und zeigten somit einen möglichen Pathomechanismus für die beeinträchtigte GI-Motilität in Folge einer antibiotischen Therapie auf.

Das intestinale Mikrobiom justiert die intestinale Neuro-Immun-Achse. Zellen des ENS und des Immunsystems besitzen Rezeptoren zur Detektion mikrobieller Bestandteile. Zwischen ENS und Immunsystem findet ständig eine bidirektionale Kommunikation statt. Dies ist wichtig für die adäquate Reaktion auf Gewebeschäden und Infektionen. Eine intestinale Dysbiose stört sowohl die Funktionalität des ENS als auch des Immunsystems. Gleichzeitig reguliert das ENS die Mikrobiomzusammensetzung (Jacobson et al., 2021). Interessanterweise sind nicht nur Erkrankungen des ENS, sondern auch des ZNS mit einem veränderten Darmmikrobiom assoziiert. Die Darmflora hat scheinbar lebenslang über die sogenannte Darm-Hirn-Achse Einfluss auf das ZNS (Geng et al., 2022). Man vermutet eine große Bedeutung der Darmflora für die Entwicklung einiger neurodegenerativer und psychiatrischer Erkrankungen, auch wenn der genaue Zusammenhang noch nicht verstanden ist (Geng et al., 2022) (siehe **Kapitel 1.1.5**).

Zusammenfassend ist die regelrechte Entwicklung und Aufrechterhaltung des intestinalen Mikrobioms von erheblicher Relevanz für die Gesundheit und Funktionalität des Darms in verschiedenen Bereichen, wie Epithelzellbarriere, ENS und Peristaltik. Die Relevanz des Mikrobioms für EGC im Speziellen wird in **Kapitel 1.5** gesondert betrachtet.

1.5 Relevanz des intestinalen Mikrobioms für die mEGC

Wie in **Kapitel 1.1.3** genannt, persistieren multipotente Progenitorzellen lebenslang im Plexus myentericus und im Plexus submucosus und halten durch ständige Gliogenese das EGC-Netzwerk aufrecht. Ein Teil der EGC residiert subepithelial in der Lamina propria

und wird als mucosale EGC (mEGC) bezeichnet (Boesmans et al., 2015; Gulbransen und Sharkey, 2012).

Insbesondere die mEGC liegen in einer sehr dynamischen Umgebung. Die darmlumenauskleidende Mucosa (MC) ist sich ständig wechselnden Umweltfaktoren, insbesondere dem Darmmikrobiom, ausgesetzt. Auch die in der Mucosa residierenden EGC stehen in Interaktion mit dem Mikrobiom. EGC exprimieren zahlreiche TLR (Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013; Geng et al., 2022; Turco et al., 2014). Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass EGC durch TLR-Aktivierung auf Mikroben reagieren. Beispielsweise kann die TLR-Aktivierung durch Pathogene in EGC zur Aufregulation des Gliamarkers S100 β und der Freisetzung von Stickstoffmonoxid führen (Turco et al., 2014). Turco et al. (2014) beschrieben zudem eine Modulierbarkeit der TLR-Expression durch den Mikrobenkontakt. Der TLR-Ligand LPS kann zu einer vermehrten GDNF-Freisetzung aus EGC führen (von Boyen et al., 2006). In Kombination mit Interferon- γ scheint LPS durch die TLR-Aktivierung einen proinflammatorischen Phänotyp in EGC hervorzurufen (Yang et al., 2020). Yang et al. (2020) zeigten, dass EGC Moleküle in den Überständen von *Bifidobacterium bifidum* und *Bacteroides fragilis* detektieren und darauf mit einer veränderten Expression inflammatorischer Zytokine reagieren können.

Kabouridis et al. (2015a) postulierten eine starke Abhängigkeit der Entwicklung und Aufrechterhaltung des mucosalen EGC-Netzwerkes vom Darmmikrobiom. Sie untersuchten die Präsenz mEGC unter unterschiedlichen Bedingungen und zeigten, dass die Entwicklung mEGC erst postnatal erfolgt. Dieser postnatale Aufbau des mEGC-Netzwerkes wurde als mikrobiomabhängig identifiziert, indem das EGC-Netzwerk in gnotobiotischen Mäusen mit diesem in Mäusen verglichen wurde, welche entweder von Geburt an oder erst im adulten Alter einem Mikrobiom ausgesetzt wurden. Unter gnotobiotischen Bedingungen zeigten sich dabei deutlich weniger Gliazellen in der Mucosa als unter unsterilen Bedingungen. Dabei war der Phänotyp zwischen den beiden mikrobiom-exponierten Gruppen (von Geburt an oder erst im adulten Alter) vergleichbar. Demnach kann die mikrobiomabhängige Entwicklung des mEGC-Netzwerkes im adulten Alter nachgeholt werden, sofern sie in der postnatalen Entwicklung ausgeblieben ist. Kabouridis et al. (2015a) wiesen des Weiteren nach, dass auch im adulten Alter kontinuierlich neue mEGC aus den peripheren Plexus in die Lamina propria einwandern und das mEGC-

Netzwerk regenerieren. Vermutlich bleibt die Gliapopulation in den Plexus als eine Art Reservoir stabil. Auch diese lebenslang stattfindende Regeneration wurde von Kabouridis et al. (2015a) als mikrobiomabhängig postuliert: In unter herkömmlichen Bedingungen aufgewachsenen Mäusen wurde durch eine dreiwöchige Antibiosebehandlung das intestinale Mikrobiom depletiert. Anschließend wurde eine deutliche Reduktion der mEGC im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet (Kabouridis et al., 2015a).

Zusammengefasst postulierten Kabouridis et al. (2015a) eine starke Abhängigkeit sowohl der postnatalen Entwicklung als auch der lebenslangen Regeneration des mEGC-Netzwerkes vom luminalen Mikrobiom.

Wie genau die Interaktion zwischen EGC und Mikrobiom abläuft, ist noch unklar. Kabouridis et al. (2015b) stellen hierfür verschiedene mögliche Mechanismen vor, die sich nicht gegenseitig ausschließen. Eine Möglichkeit bestünde darin, dass EGC die Mikroben oder ihre metabolischen Produkte selbst erkennen und somit zur Migration in die Mucosa stimuliert werden, z.B. anhand von TLR (direkter Mechanismus) (Kabouridis et al., 2015b). Neben TLR-Liganden kommen für diese Interaktion auch andere mikrobielle Produkte, wie kurzkettige Fettsäuren oder Neurotransmitter in Frage (Geng et al., 2022). Hierfür müsste die Epithelzellbarriere überwunden werden, was denkbar wäre, wenn diese gestört wäre (Kabouridis et al., 2015b). Ein solcher Fall läge in einem noch „unreifen“ Darm vor oder auch in einem entzündeten Darm (Clayburgh et al., 2004; Patel et al., 2012). Außerdem ist zu beachten, dass das Mikrobiom durch eine Mukus-Schicht von der Mucosa getrennt ist und nur wenige Mikroben diese überwinden können (Geng et al., 2022).

Eine andere Möglichkeit bestünde in einem indirekten Mechanismus. Hierbei würden an das Lumen angrenzende Enterozyten oder Immunzellen das Mikrobiom über ihre Rezeptoren detektieren und durch die konsekutive Ausschüttung von Attraktantien die EGC zur Migration in die Mucosa stimulieren (Kabouridis et al., 2015b). Glatte Muskelzellen, endokrine oder enteroendokrine Zellen kommen ebenfalls in Betracht, an der Interaktion beteiligt zu sein (Geng et al., 2022).

1.6 Fragestellung

Zum aktuellen Zeitpunkt ist bekannt, dass EGC entscheidende Akteure der Darmhomöostase sind.

Die Entwicklung der EGC beginnt bereits pränatal. In Mäusen wurde gezeigt: Bei der Geburt sind EGC in der Tunica muscularis bereits vorhanden, die Einwanderung in die Tunica mucosa erfolgt hingegen erst postnatal und scheint mikrobiomabhängig zu sein. Ebenso ist eine Mikrobiomabhängigkeit der lebenslangen Regeneration mEGCs beobachtet worden. Unklar ist derzeit, welcher Mechanismus für diesen Zusammenhang verantwortlich ist.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, diesen Zusammenhang in Mäusen genauer zu erörtern. Hierfür wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Bleibt durch Depletion des intestinalen Mikrobioms die Regeneration eines bereits bestehenden mEGC-Netzwerkes aus?
- Wird in adulten gnotobiotischen Mäusen die initiale Entstehung des mEGC-Netzwerkes verhindert? Bzw. kann bei einer nachträglichen mikrobiellen Besiedlung (Konventionalisierung) dieser die Formation des mEGC-Netzwerkes nachgeholt werden?
- Sollte letzteres der Fall sein: Wird die nachträgliche Einwanderung EGC in die Mucosa in adulten Mäusen durch das Fehlen des TLR-Signalproteins MyD88 verhindert?
- Wird die postnatale Einwanderung EGC in die Mucosa durch das Fehlen des TLR-Signalproteins MyD88 verhindert?
- Welche Rezeptoren und Mediatoren sind in der postnatalen mEGC-Netzwerk-Entstehung relevant?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere zur Antibiose (AB)-Behandlung wurden C57BL/6JRj-Mäuse (männlich, ca. 25 g, 7 - 8 Wochen alt) von der Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen.

Adulte gnotobiotische sowohl C57BL/6JZtm-Mäuse als auch transgene MyD88^{-/-}-Mäuse (B6.129P2-MyD88tm 1 Aki) (männliche und weibliche, ca. 20 - 25 g, 7 - 16 Wochen alt) wurden freundlicherweise von Dr. Marijana Basic von dem Zentralem Tierlaboratorium und Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule in Hannover zur Verfügung gestellt. Stuhlproben zur Gavage dieser keimfreien Mäuse wurden von adulten Wildtypmäusen, welche unter konventionellen Bedingungen aufwuchsen, gewonnen.

Neonatale Mäuse sowohl des Wildtyps als auch des MyD88^{-/-}-Genotyps stammen aus jeweils eigenen Verpaarungen mit MyD88^{+/-}- und MyD88^{-/-}-Mäusen. Für die Auswertung wurden nur Proben von homozygoten Knockout- bzw. Wildtypmäusen verwendet. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch die technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe. Die Organentnahmen fanden an dem postnatalen Tag 0 (P0) bzw. 15 (P15) statt.

Die Genotypisierung erfolgte *post mortem* anhand Proben der Mausschwänze.

Gehalten wurden die Tiere im Haus für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn. Die Unterbringung erfolgte in einem vollklimatisierten Raum mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus. Den Tieren standen handelsübliches Mausfutter und autoklaviertes Wasser ad libitum zu Verfügung.

Die Versuche wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt und der Tierversuchsantrag (AZ 81-02.04.2017.A408) von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

2.2 Experimentelle Gruppen

Es wurden vier Versuchsserien angesetzt:

1) Adulte Versuchsgruppen

1.1) Antibiosebehandlung in Wildtypmäusen (siehe **Kapitel 2.2.1.1**)

1.2) Konventionalisierung gnotobiotischer Wildtypmäuse (siehe **Kapitel 2.2.1.2**)

- 1.3) Konventionalisierung gnotobiotischer MyD88^{-/-}-Mäuse (siehe **Kapitel 2.2.1.3**)
 2) Untersuchung neonataler Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäuse (siehe **Kapitel 2.2.2**)

2.2.1 Adulte Versuchsgruppen

2.2.1.1 Antibiosebehandlung in Wildtypmäusen

In dieser Versuchsserie galt es, die von Kabouridis et al. (2015a) in adulten Tieren postulierte Abhängigkeit der mEGC-Regeneration vom intestinalen Mikrobiom zu untersuchen. Hierfür führten wir eine Antibiosebehandlung wie Kabouridis et al. (2015a) mit modifiziertem Vorgehen durch. Es wurden 10 Wildtypmäuse (WT) über 21 Tage mit einem Antibiosegemisch gavagiert. Zudem erhielten sie alle 2 - 3 Tage frisch autoklavierte Käfige und Einstreu, um das intestinale Mikrobiom zu eradizieren. Anders als bei Kabouridis et al. (2015a) erhielten die Tiere die Antibiose nicht ad libitum im Trinkwasser, da dies nach Reikvam et al. (2011) zu einem vermeidenden Trinkverhalten mit konsekutivem Gewichtsverlust, vermutlich aufgrund des bitteren Geschmackes des Metronidazols, führt. Das Antibiosegemisch enthielt in Anlehnung an Reikvam et al. (2011) 50 mg/kg KG Vancomycin (Hikma Farmacêutica (Portugal) S.A., Terrugem, Portugal), 100 mg/kg KG Gentamicin (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 100 mg/kg KG Metronidazol (Euro OTC Pharma GmbH, Bönen, Deutschland) und 1 mg/kg KG des Antimykotikums Amphotericin-B (FungizoneTM; Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Ltd., Swords, Irland). Zudem wurde das Trinkwasser, ebenfalls in Anlehnung an Reikvam et al. (2011), mit 1 mg/ml Ampicillin (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) versetzt. Die Gavage erfolgte mithilfe einer speziellen Fütterungskanüle aus Edelstahl (Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA) in den ersten sieben Tagen zweimal, in den darauffolgenden Tagen einmal täglich. Das Gavagevolumen betrug jeweils 200 µl. Reikvam et al. (2011) zeigten, dass eine solche Antibiosebehandlung zu einer erheblichen Reduktion der kultivierbaren aeroben und anaeroben Bakterien führt. Kabouridis et al. (2015a) zeigten zusätzlich, dass eine vergleichbare Antibiosebehandlung über 21 Tage zu einer deutlichen Reduktion der Gliazellmarker S100β und SOX-10 in der Darmmucosa führt. Zur Kontrollgruppe (CTL) gehörten 10 Wildtypmäuse, die anstatt mit dem Antibiosegemisch mit sterilem Wasser gavagiert wurden und Trinkwasser ohne Ampicillin-Zusatz erhielten.

Die Tiere wurden alle 2 - 3 Tage gewogen, um eine gesundheitliche Gefährdung auszuschließen. Wöchentlich wurden Stuhlproben der Tiere gesammelt und auf Columbia-Blut-Agarplatten ausgestrichen und bebrütet, um die Eradikation des Darmmikrobioms zu kontrollieren.

Nach 21 Tagen erfolgte die Organentnahme und die anschließende Analyse mittels Immunfluoreszenzfärbung, Genexpressionsanalyse und Westernblot.

2.2.1.2 Konventionalisierung gnotobiotischer Wildtypmäuse

In dieser Versuchsserie war es das Ziel zu untersuchen, ob die Abwesenheit des intestinalen Mikrobioms die initiale Entstehung des mucosalen glialen Netzwerkes verhindern kann bzw. ob durch eine nachträgliche mikrobielle Besiedlung die Formation eines solchen in adulten Tieren nachgeholt werden kann. Hierfür wurde sich 9 gnotobiotischer Wildtypmäuse bedient, welche unter sterilen Bedingungen aufwuchsen und somit entsprechend der von Kabouridis et al. (2015a) aufgestellten Hypothese keine EGC in der Mucosa aufweisen sollten. 6 dieser Tiere wurden in diesem gnotobiotischen Zustand (*germfree*, GF) euthanasiert und ihre Organe entnommen. Die anderen 3 Tiere hingegen wurden über 28 Tage konventionalisiert (CONV-D). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit gnotobiotischer Tiere konnten die Versuchsgruppen nicht größer gehalten werden. Konventionalisierung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass man die gnotobiotisch aufgewachsenen Tiere sowohl einer unsterilen Umgebung aussetzte als auch aktiv an den Tagen 1 und 8 mit jeweils 100 µl einer Stuhlbreilösung nicht-gnotobiotischer, sondern konventionell gehaltener Wildtypmäuse gavagierte. Die Herstellung hiervon erfolgte an den jeweiligen Tagen frisch aus 1 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 2 Stuhlpellets von 2 unter konventionellen Bedingungen lebenden Mäusen gleichen Genotyps mit intaktem Mikrobiom. Zudem erhielten die Mäuse ausschließlich gebrauchte Einstreu von den gleichen Tieren. Das Ziel der Konventionalisierung war der nachträgliche Aufbau einer mikrobiellen Darmbesiedlung.

Die Tiere wurden alle 2 - 3 Tage gewogen, um eine gesundheitliche Gefährdung auszuschließen. Wöchentlich wurden Stuhlproben der Tiere gesammelt und auf Columbia-Blut-Agarplatten mit 5 % Schafsblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen und bebrütet, um die anfängliche Sterilität bzw. die mikrobielle Besiedlung sicherzustellen.

Nach 28 Tagen erfolgte die Organentnahme und die anschließende Analyse mittels Immunfluoreszenzfärbung und Genexpressionsanalyse.

2.2.1.3 Konventionalisierung gnotobiotischer MyD88^{-/-}-Mäuse

Diese Versuchsserie diente der Überprüfung der Rolle des Adaptermoleküls MyD88 bei der Konventionalisierung gnotobiotischer Mäuse. MyD88 kommt als Adaptermolekül in den Signaltransduktionswegen aller TLR, außer TLR3, vor (Frosali et al., 2015; Medzhitov et al., 1998). In MyD88^{-/-}-Mäusen sind diese TLR somit nicht funktionsfähig. Durch die Untersuchung der MyD88-Abhängigkeit sollte indirekt auch Schlüsse auf eine mögliche TLR-Abhängigkeit gezogen werden. Hierfür wurden 5 MyD88^{-/-}-Mäuse im keimfreien Zustand euthanasiert und 3 MyD88^{-/-}-Mäuse über 28 Tage konventionalisiert. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit gnotobiotischer Tiere konnten die Versuchsgruppen nicht größer gehalten werden. Versuchsablauf und -bedingungen glichen dem der Konventionalisierung gnotobiotischer Wildtypmäuse.

2.2.2 Untersuchung neonataler Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäuse

Die letzte Versuchsreihe diente der Untersuchung des Adaptermoleküls MyD88 in der postnatalen Entwicklung unter gewöhnlichen, unsterilen Bedingungen. Es wurde beobachtet, dass die mEGC in den ersten postnatalen Lebenstagen mikrobiomabhängig in die Mucosa migrieren (Kabouridis et al., 2015a). Kabouridis et al. (2015a) beobachteten dabei insbesondere zwischen P0 und P10 eine deutliche Zunahme der mEGC. Über welchen Mechanismus die Detektion des Mikrobioms abläuft, ist weitestgehend unbekannt. Da EGC selbst, aber auch andere in der Nachbarschaft gelegene Zellen, wie zum Beispiel Enterozyten, TLR exprimieren und diese der Detektion luminal gelegener mikrobieller Bestandteile dienen, könnten diese an dem Zusammenspiel zwischen EGC und Mikrobiom eine maßgebliche Rolle spielen (Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013; Frosali et al., 2015; Rakoff-Nahoum et al., 2004). Die meisten TLR, ausgenommen TLR3, lösen über das Adaptermolekül MyD88 eine intrazelluläre Signalkaskaden aus (Frosali et al., 2015; Medzhitov et al., 1998). Sollte ein TLR, welcher über MyD88 signalisiert, an diesem Zusammenspiel beteiligt sein, ist davon auszugehen, dass ein Fehlen von MyD88 zu einer fehlenden oder zumindest verzögerten postnatalen Entwicklung des mEGC-Netzwerkes führt.

Zur Untersuchung der Rolle von TLR bzw. MyD88 wurden Organe von Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 entnommen, via Genexpressionsanalyse untersucht und miteinander verglichen. Zum Zeitpunkt P15 sollte die Migration der EGC in die Mucosa zumindest in Wildtypen zu einem großen Teil fortgeschritten und ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen, wenn vorhanden, deutlich erkennbar sein. Die Proben stammten von 5 Wildtyp- und 7 MyD88^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt P0 bzw. 4 Wildtyp- und 11 MyD88^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt P15. Die Größe der Versuchsgruppen richtete sich nach der Anzahl der neonatalen Tiere, die durch eigene Verpaarungen zur Verfügung standen.

2.3 Probengewinnung und Präparation

Die adulten Tiere erhielten eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Piramal Healthcare UK Limited, Morpeth, UK) und wurden durch zervikale Dislokation getötet. Bei den neonatalen Mäusen erfolgte eine Dekapitation. Es erfolgte anschließend die Eröffnung des Bauchsitus mittels Medianlaparotomie. Entnommen wurde ein Organpaket bestehend aus Duodenum, Jejunum und Ileum. Die weitere Präparation erfolgte in einer Sylgard[®]-Schale mit gekühltem Krebs-Ringer-Puffer (Chemikalien siehe **Kapitel 2.8**).

Bei den adulten Tieren wurde jeweils ein etwa 1 cm langes Stück des terminalen Ileums zur Herstellung von Kryoschnitten genutzt. Der gesamte Rest des Dünndarms der adulten Tiere wurde für die Genexpressionsanalyse aufbereitet. Hierfür wurde der Dünndarm in etwa 2 cm lange Stücke geteilt, welche anschließend auf einen dünnen Glasstab aufgezogen wurden. Mit einer Pinzette wurde das Mesenterium abgezupft und mithilfe feuchter Watteträger die außengelegene Muscularis externa (ME) von der Mucosa (MC; bestehend aus Lamina epithelialis, Lamina propria mucosae und Lamina muscularis mucosae) abgetrennt. Bei den neonatalen Tieren erfolgte die Trennung von ME und MC mit Pinzetten unter einem Präparationsmikroskop (Leica MZ8; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Proben wurden weiter zerkleinert und in sterilen Kryotubes (CryoTube[™] vials; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung (siehe **Kapitel 2.5**) bei -80 °C gelagert.

2.4 Immunhistochemie (IHC)

Die Präsenz mEGC im Dünndarm lässt sich phänotypisch anhand einer Immunhistochemischen (IHC) Färbung von Kryoschnitten untersuchen, bei welchen die EGC mithilfe eines Anti-S100 β -Antikörpers sichtbar gemacht werden (Kabouridis et al., 2015a).

Organproben aus dem terminalen Ileum wurden nach Entnahme für 24 Stunden bei 4 °C in PLP-Puffer (Chemikalien siehe **Kapitel 2.8**) fixiert und für 48 Stunden bei 4 °C in einer Sucrose-Lösung (Chemikalien siehe **Kapitel 2.8**) entwässert. Anschließend erfolgte das Einbetten in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V, Alphen aan den Rijn, Niederlande) und das Schockgefrieren in einem auf Trockeneis gelagertem Bad aus Isopentan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

An einem Mikrotom (Microm HM550; Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, USA) erfolgte das Anfertigen von 12 μ m dicken Kryoschnitten und die Überführung auf SuperFrost Plus™-Objektträger (Gerhard Menzel B.V & Co. KG, Braunschweig, Deutschland). Auf diesen trockneten die Proben bei Raumtemperatur. Es folgte das Fixieren auf einer 70 °C warmen Heizplatte für 10 min.

Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde eine 1%ige BSA-PBT-Lösung (Chemikalien siehe **Kapitel 2.8**) auf die Probenschnitte gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gelöst in 1%iger BSA-PBT-Lösung über Nacht bei 4 °C. Genutzt wurde ein Anti-S100 β -Antikörper (Z0311; Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) in der Verdünnung 1 : 500. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper verdünnt in 1%iger BSA-PBT-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hier wurde ein Cy3 Donkey anti-Rabbit Antikörper (1,5ng/ml; 711-165-152; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in der Verdünnung 1 : 800 genutzt. Danach erfolgte die Inkubation mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI; BioLegend Way, San Diego, USA) in der Verdünnung 1 : 5.000 für 5 min, um die Zellkerne mit einem Fluoreszenzfarbstoff blau anzufärben.

Es folgte das Aufkleben von Deckgläsern mit Shandon™ Immu-Mount™ (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA).

Die Untersuchung des Phänotyps des glialen Netzwerkes in der Mucosa und die fotografische Dokumentation erfolgten unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Die Auswertung erfolgte durch das Auszählen Glia⁺ Villus-Krypt-Einheiten (VKE) und der Bildung des Quotienten aus Glia⁺

Villus-Krypt-Einheiten und der Gesamtheit aller ausgewerteten Villus-Krypt-Einheiten. Eine Villus-Krypt-Einheit umfasst dabei gemäß Kabouridis et al. (2015a) einen Villus und das ihm assoziierte Kryptenareal (**Abb. 3**). Verglichen wurden die antibiotisch behandelten Mäuse mit den Kontrolltieren und gnotobiotische mit konventionalisierten Wildtyp- bzw. MyD88^{-/-}-Mäusen. Es erfolgte zudem eine einfaktorielle Varianzanalyse der vier zuletzt genannten Gruppen untereinander.

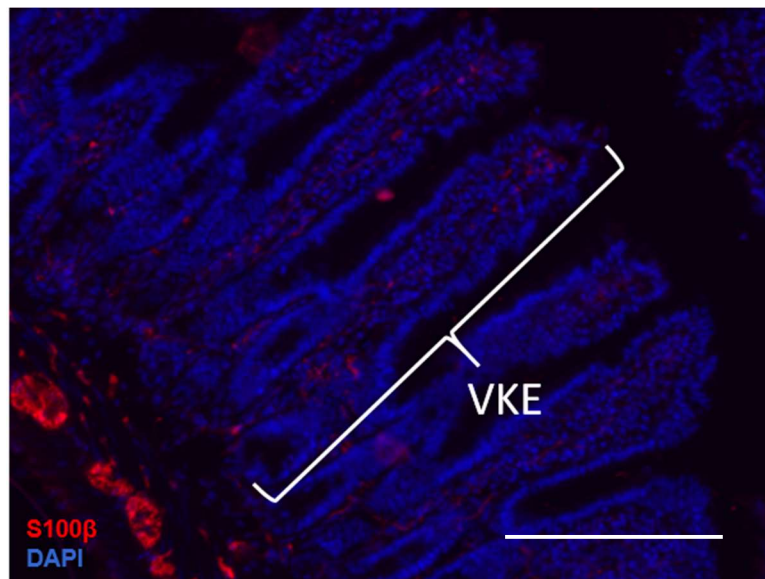


Abb. 3: Villus-Krypt-Einheit.

Gezeigt wird eine sogenannte Villus-Krypt-Einheit (VKE) in einem Kryoschnitt aus dem terminalen Ileum. Eine VKE ist definiert als ein Villus mit dem ihm assoziierten Kryptenareal. Der Gliazellmarker S100 β ist hier rot, die Zellkerne sind blau dargestellt. Verwendet wurden ein Anti-S100 β -Antikörper als Primär-, ein Cy3-Anti-Rabbit-Antikörper als Sekundärantikörper und DAPI.

Maßstab= 100 μ m

2.5 Quantitative Echtzeit Reverse-Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Die Methodik der quantitativen Echtzeit Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (PCR) (qRT-PCR) bietet die Möglichkeit, die Expression auch sehr geringer Proteinmengen zu quantifizieren (Giulietti et al., 2001).

Verwendet wurden hierfür die in MC und ME aufgetrennten Dünndärme der Versuchstiere (siehe **Kapitel 2.3**). Pro Probe wurden ca. 15-20 mg Material der MC bzw. ME verwendet. Aus den Proben wurde zunächst die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) aus den Zellen isoliert: Hierfür erfolgte zunächst eine Homogenisierung des Probenmaterials im Precellys 24-Dual Homogenisator (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux,

Frankreich) mittels Keramikkugeln (SiLibeads® Zirkonoxyd Kugeln, Yttrium stabilisiert, Typ ZY-P1,2-1,4 mm bzw. ZY-P2,60-3,30 mm, Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach, Deutschland), dann die RNA-Extraktion anhand des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers. Die Konzentrationen der daraus resultierenden mRNA-Proben wurden anschließend ermittelt: Hierzu erfolgte im Spektralphotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Wilmington, USA) die Bestimmung der Absorption der jeweiligen Proben bei 260 und 280 nm Wellenlänge. Die Bildung des Quotienten der bei 260 und 280 nm gemessenen Absorptionen ermöglichte darüber hinaus eine Qualitätskontrolle der Proben: Der Wert sollte zwischen 1,8-2,1 liegen, um die Reinheit der RNA zu gewährleisten. Anhand der ermittelten Konzentrationen konnten im Anschluss die jeweilig benötigten Probenvolumina berechnet werden, um von jeder Probe die gleiche Menge mRNA zu verwenden. Mittels des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Waltham, USA) wurden die mRNA-Proben nach Herstellerangaben in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt: Hierzu wurden die mRNA-Proben mit dem Master Mix im Mastercycler Nexus GX2 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 25°C, für 120 min bei 37°C und für 5 min bei 85°C inkubiert. Die cDNA-Proben wurden anschließend im Verhältnis 1 : 20 verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung zwischengelagert.

Die Vervielfältigung der cDNA-Proben erfolgte anhand eines modifizierten Vorgehens nach der PCR-Methodik, welche grundlegend von Mullis et al. (1986) entwickelt wurde. Die Modifikation bestand in der Verwendung sogenannter *Taqman*-Sonden: Während der exponentiellen Vervielfältigung der DNA ermöglichen diese die Messung eines Fluoreszenzsignals. Der Anstieg dessen ermöglicht dabei quantitative Aussagen über die DNA-Menge der untersuchten Ziel-Sequenzen (Giulietti et al., 2001). Man nennt dieses Verfahren quantitative Echtzeit-PCR. Untersucht wurden die Gliazellmarker S100 β und GFAP sowie GDNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-1R1, TLR2, -4 und -5 im Verhältnis zum *Housekeeper*-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Die verwendeten Primer und Taqman-Sonden sind in der **Tabelle 2** aufgeführt. Die PCR-Amplifizierung wurde mit dem Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, USA) oder Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, USA) im 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte durch die technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe.

Tab. 2: Herkunft, Sequenzen, bzw. ID-Nummern der bei der q-RT-PCR verwendeten Primer bzw. Sonden.

Genname	Primersequenzen (Metabion)	
	vorwärts	rückwärts
GFAP	ACATCGAGATCGCCACCTAC	CCTTCTGACACGGATTTGGT
S100 β	TGGTTGCCCTCATTGATGTCT	CCCATCCCCATCTTCGTCC
GDNF	CAGTGACTCCAATATGCCTGA	CCGCTTGTTTATCTGGTGAC
IL-1R1	GAAAAGTGCTAGAACATCCTTTGAG	GTACCAATGGAGGCCAGAAG
TLR2	GCTTCACTTCTCTGCTTTTCGT	CACATGACAGAGACTCCTGAGC
TLR4	GAAACTCAGCAAAGTCCCTGAT	TTGTTTCAATTTACACCTGGA
TLR5	ATCTGTGAGACACCCCTTGC	TTGAGGATCCAGGGAATCTG

Genname	QuantiTect Primer Assay ID (Qiagen)
IL-1 α	QT00113505

Genname	Taqman Probes Assay ID (Applied Biosystems)
IL-1 β	Mm00434228
GAPDH	Mm99999915_g1

2.6 Westernblot

Zur weiteren Überprüfung des glialen Phänotyps in der Dünndarmmucosa und -muscularis im Antibioseversuch wurden die Gliamarker S100 β und SOX-10 in den MC- und ME-Isolaten via Immunoblotting dargestellt und anschließend anhand der Chemilumineszenzsignale quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde eine murine Gehirnprobe verwendet. Das Vorgehen wird im Folgenden erläutert.

Es wurden jeweils 30 - 50 mg gefrorene Mucosa und Muscularis als Proben verwendet. Zur Proteinextraktion wurde ein Aufschlusspuffer (Chemikalien siehe **Kapitel 2.8**) gemischt mit einem Proteinaseinhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) zu den Proben gegeben. Anschließend wurde ein Radio-Immunpräzipitationsassay-Lysepuffer

(EMD Millipore Corp., Billerica, USA) hinzugegeben. Nach dem Homogenisieren und Zentrifugieren wurden die Überstände weiterverarbeitet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Herstellerangaben in einem Mikroplatten-Leser (Safire; Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) ermittelt. Anschließend wurden jeweils 20 µg Protein zur weiteren Verarbeitung entnommen.

Zur Vorbereitung auf die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) wurden zu diesen Proben NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Thermo Scientific, Rockford, USA) gegeben. Die Proben wurden bei 72 °C und 500 rpm für 10 min erhitzt (ThermoMixer® comfort; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Taschen in einem NuPAGE™ 4 - 12 % Bis-Tris Midi Gel (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) wurden mit den Proben und einer Proteinleiter (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) befüllt, bevor die gelelektrophoretische Auftrennung bei 200 V für ca. 50 min mittels NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (Novex® by life technologies, Carlsbad, USA) erfolgte.

Es folgte das Blotten der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einer Immobilon®-P Membran (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Irland) mit NuPAGE® Transfer Buffer (Novex® by life technologies, Carlsbad, USA) bei 80 V für ca. 90 min in einem Eisbad.

Nach dem Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern jeweils bei 4 °C über Nacht. Verwendet wurden ein Anti-S100β-Antikörper (Z0311; Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), ein Anti-SOX-10-Antikörper (SAB1402361; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bzw. ein Anti-β-Aktin-Antikörper als *Housekeeping*-Protein (A5316; Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgte für jeweils 1 Stunde bei Raumtemperatur. Verwendet wurden ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter Anti-Rabbit-Antikörper (7074; Cell Signalling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland) bzw. ein HRP-gekoppelter Anti-Mouse-Antikörper (7076; Cell Signalling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland). Alle Antikörperlösungen wurden jeweils in einer Verdünnung 1 : 2.000 verwendet. Super Signal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA) wurde auf die Membran gegeben. Mit dem Fujifilm LAS-3000 Imager (Fuji Photo Film CO., LTD., Tokio, Japan) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht und die Chemilumineszenz-Signale mit der Software Multi

Gauge V3.1 (Fujifilm, Tokio, Japan) gemessen. Die jeweiligen Proteinmengen in der Kontrollgruppe wurden als 100 % genormt und mit denen der antibiotisch behandelten Gruppe verglichen.

2.7 Untersuchung der mikrobiellen Darmbesiedlung

Zur Sicherstellung der erfolgten Depletion des intestinalen Mikrobioms bzw. der mikrobiellen Darmbesiedlung wurden regelmäßig Stuhlproben der Tiere untersucht. Dies erfolgte bei den antibiotisch behandelten Tieren, deren Kontrollgruppe und den zu konventionalisierenden Tieren einmal wöchentlich sowie bei den gnotobiotischen Tieren einmalig nach deren Ankunft.

Hierfür wurden die Tiere während der Defäkation in der Hand fixiert und die Stuhlpellets direkt in sterilen Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aufgefangen. Pro Stuhlprobe wurde ein Reaktionsgefäß (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland) mit autoklavierten Keramikugeln (SiLibeads® Zirkonoxyd Kugeln, Yttrium stabilisiert, Typ ZY-P1,2-1,4 mm bzw. ZY-P2,60-3,30 mm, Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach, Deutschland) befüllt. Pro mg Stuhl wurden in das Reaktionsgefäß 50 µl einer 4%igen Thioglykolat-Lösung (Chemikalien siehe **Kapitel 2.8**) hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben im Precellys 24-Dual Homogenisator (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, Frankreich) bei 5.000 rpm 2 x 30 sec homogenisiert. Von diesem Homogenisat wurden 20 µl entnommen und in einem Safe-Lock Tube mit 1.980 µl Thioglykolat verdünnt. Auch von dieser Verdünnung wurden erneut 20 µl entnommen und gemäß den zuletzt genannten Schritten verdünnt. Anschließend wurden 100 µl auf einer Columbia-Blut-Agarplatte mit 5 % Schafsblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen. Laut Herstellerangaben handelt es sich hierbei um ein Erstisolierungsmedium, auf welchem der Großteil aller aeroben Mikroorganismen, jedoch keine mit hochspezifischen Nährstoffanforderungen, anzüchtbar sind. Die verwendeten Spatel wurden zwischen den einzelnen Proben mit 70%igem Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) abgeflammt und sterilisiert.

Die Platten wurden bei 37 °C für 48 Stunden im Inkubator bebrütet.

2.8 Verwendete Chemikalien

Der Krebs-Ringer-Puffer wurde vor Benutzung frisch angefertigt und enthielt auf einen Liter 120 mmol Natriumchlorid, 5,9 mmol Kaliumchlorid, 15,5 mmol Natriumbikarbonat, 1,4 mmol Natriumdihydrogenphosphat und 17,5 mmol Glucose, sowie 1,468 ml einer 1,7-molaren Calciumchlorid-Dihydrat-Lösung und 0,972 ml einer 1,23-molaren Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Lösung.

Zur Organfixierung bei der Herstellung der Kryoschnitte wurden die benötigten Puffer immer frisch angesetzt. Aus Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (jeweils Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), wurden jeweils mit destilliertem Wasser 0,2-molare Lösungen hergestellt. Aus diesen Lösungen wurde mit Wasser ein Phosphat-Puffer hergestellt, dessen pH-Wert mit 1-molarer Salzsäure (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) bzw. 1-molarer Natronlauge (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf 7,4 eingestellt wurde. Zur Herstellung einer Lysin-Lösung wurden 6,59 g Lysin (L-Lysin-Monohydrat; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in 200 ml Phosphat-Puffer gelöst und der pH ebenfalls auf 7,4 eingestellt. 2,5 ml 4%iges Paraformaldehyd (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), 3,75 ml Lysin-Lösung und 0,0212 g Natriumperiodat ($\text{IO}_4\text{-Na}$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden vermischt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit Phosphat-Puffer auf 10 ml Gesamt-Lösung aufgefüllt (Paraformaldehyd-Lysin-Phosphat (PLP)-Puffer). Zur Entwässerung der Organproben wurde eine 30%ige Sucrose-Lösung aus D(+)-Sucrose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und PLP-Puffer genutzt.

PBS (*phosphate buffered saline*; Life Technologies limited, UK) wurde mit 0,05 % Triton® X-100 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt (PBT). Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen und zum Lösen der Antikörper wurde PBT zusätzlich mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt (BSA-PBT).

Die Magermilchpulverlösung zum Blocken und Färben der Banden der Western Blots wurde aus 5 % Magermilchpulver (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in 1x TBST hergestellt.

Zur Herstellung von 1l 10x TBS wurden 24g Tris Base (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) und 88g NaCl in destilliertem Wasser aufgelöst und der pH auf 7,6 eingestellt.

1x TBS versetzt mit 0,1 % Tween 20 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) ergab die genutzte TBST-Lösung.

Zur Herstellung des Aufschlusspuffers wurden 74,45 mg Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 76,07 mg Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml PBS gelöst.

Für die Thioglykolat-Lösung zum Ausstreichen der Stuhlproben wurde Thioglykolat-Pulver (4g pro Liter) (Sigma Aldrich, St. Missouri, USA) unter Kochen in destilliertem Wasser aufgelöst und anschließend autoklaviert.

2.9 Statistische Datenanalyse

Im Text und in den Graphiken sind die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, bei der Untersuchung der neonatalen Tiere davon abweichend als Mittelwerte \pm Standardfehler.

Bei den Versuchen, bei denen zwei isolierte Gruppen miteinander verglichen wurden, erfolgte ein t-Test zur Prüfung eines signifikanten Unterschiedes.

Bei den Versuchen, bei denen die Einflüsse zweier verschiedener Faktoren auf eine abhängige Variable untersucht wurden, erfolgte die Auswertung anhand einer 2-way ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey's-*post-hoc*-Test.

Zur Datenanalyse wurde Graph Pad Prism Version 8.4.3 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) genutzt. Zur Erstellung der Graphiken wurden Graph Pad Prism und Microsoft Power Point (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet.

Als Signifikanzlevel galten * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Generelle Beobachtungen

Alle Tiere, die mit Antibiose behandelt oder konventionalisiert wurden, zeigten sich weder in ihrem Allgemeinzustand beeinträchtigt noch in ihrem Verhalten auffällig. Auch die regelmäßig durchgeführten Gewichtskontrollen waren unauffällig, es kam zu keinen wesentlichen Gewichtszu- oder abnahmen. Äußerlich waren die antibiotisch behandelten Tiere nicht von den entsprechenden Kontrolltieren zu unterscheiden. Bei den keimfreien Tieren waren aufgetriebene Abdomina zu beobachten, die sich während der Konventionalisierung ohne Gewichtsabnahme deutlich zurückbildeten.

Die neonatalen Mäuse wiesen keine Auffälligkeiten auf und entwickelten sich regelrecht. Es konnten äußerlich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

3.2 Antibiosebehandlung in Wildtypmäusen

3.2.1 Antibiosebehandlung eradiziert effektiv das kultivierbare intestinale Mikrobiom

Die ersten Stuhlproben der antibiotisch behandelten Tiere wurden nach 7 Tagen Behandlung auf den Columbia-Blut-Agarplatten ausgestrichen und bebrütet. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnte kein wesentliches Bakterienwachstum festgestellt werden: Auf den meisten Agarplatten zeigten sich keine koloniebildenden Einheiten (CFU; *colony forming unit*). Vereinzelt konnte maximal eine einzelne Kolonie gefunden werden. Auch bei den folgenden Stuhlproben, entnommen 14, bzw. 21 Tage nach Beginn der Antibiosebehandlung, blieb das Wachstum von Bakterienkolonien aus (**Abb. 4B**). Stichprobenartig wurden auch Stuhlproben vehikelbehandelter Tiere untersucht. Hier konnten zahlreiche, zwischen 50 bis 160 CFUs unterschiedlicher Größe gezählt werden (**Abb. 4A**). Zum Zeitpunkt der Organentnahmen fiel auf, dass die Caeca der antibiotisch behandelten Tiere, im Gegensatz zu denen der Kontrolltiere, stark erweitert und mit flüssigem Stuhl gefüllt waren (**Abb. 4C**). Die Caecumerweiterung war vermutlich Folge eines erhöhten luminalen osmotischen Drucks in Folge der Mikrobiomeradikation (Wostmann und Bruckner-Kardoss, 1959).

Insgesamt schlossen wir auf eine erfolgreiche Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch die Antibiose-Gavage.

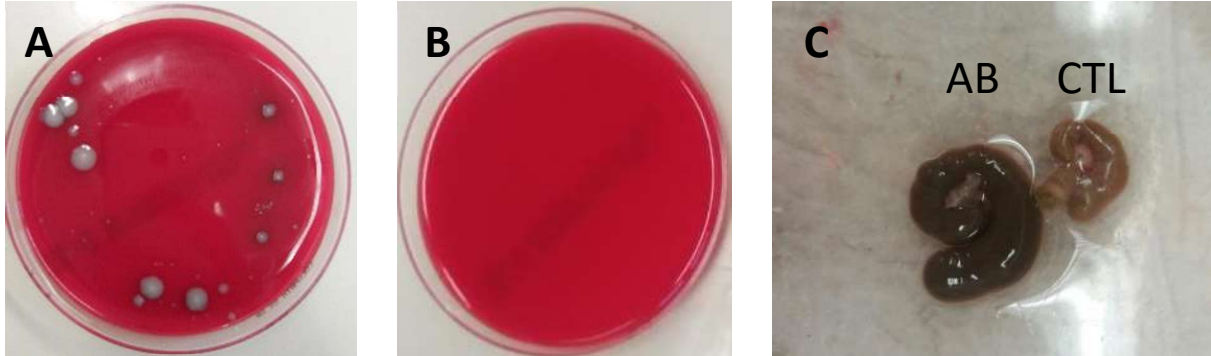


Abb. 4: Eradikation des Mikrobioms durch Antibiosebehandlung.

Dargestellt sind standardisiert verdünnte Ausstriche von murinen Stuhlproben von vehikel- (A) und antibiotisch behandelten (B) Mäusen auf bebrüteten Columbia-Blut-Agarplatten. Eine Woche nach Behandlungsbeginn der Tiere konnte bei den antibiotisch behandelten Mäusen auf den Agarplatten kein Wachstum aerober Bakterienkolonien nachgewiesen werden.

(C) Infolge der Mikrobiomeradikation zeigten sich zum Zeitpunkt der Organentnahme bei den antibiotisch behandelten Tieren (AB) im Vergleich zu den Kontrollen (CTL) deutlich erweiterte Caeca.

3.2.2 Antibiosebehandlung führt nicht zur Reduktion glialer Marker in der IHC

Nach der 21-tägigen Antibiosegabe erfolgte das Auszählen der Glia⁺ und Glia⁻ VKEs via IHC (Methodik siehe **Kapitel 2.4**).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren stellten sich die Darmzotten der Antibiose-Tiere deutlich verändert dar (**Abb. 5**). Sie erschienen aufgequollen und in ihrer Struktur zerstört. Im Hinblick auf die Präsenz der mEGC konnten auf den ersten Blick keine Unterschiede ausgemacht werden: Die Extensionen der EGC reichten sowohl bei den Antibiose- als auch den Kontrolltieren bis an die Spitzen der Villi. Auch in den Krypten war ein ausgeprägtes EGC-Netzwerk zu beobachten. Der Anteil Glia⁺ VKE an allen VKE betrug in der Kontrollgruppe $85,49 \pm 3,3 \%$ und war entgegen unserer Erwartungen in den antibiotisch behandelten Tieren nicht reduziert, sondern um ca. 6 % erhöht ($91,84 \pm 1,1 \%$) (**Abb. 6**; ** $p \leq 0,01$).

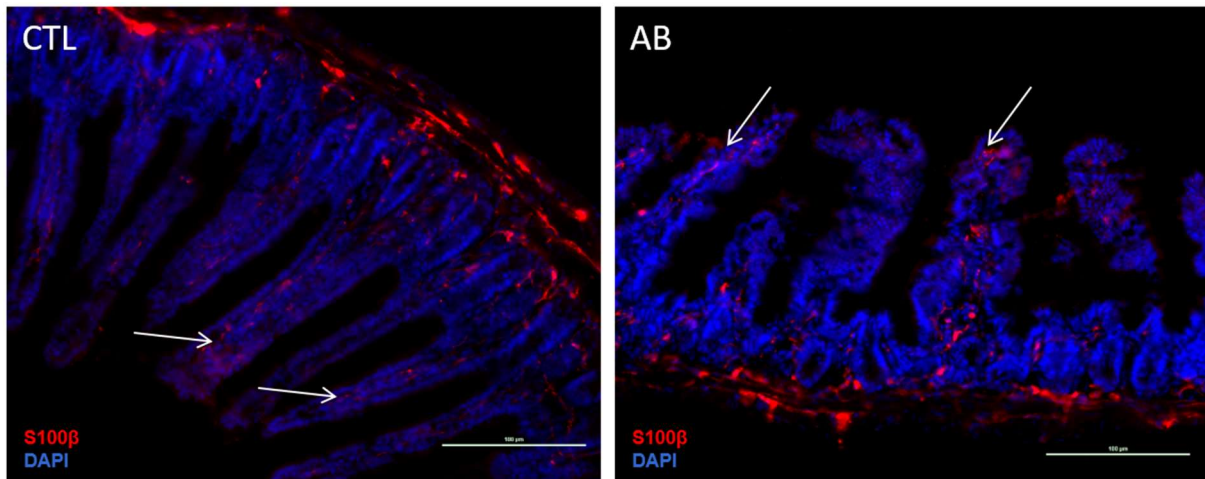


Abb. 5: Destruktion der Zottenstruktur in antibiotisch behandelten Tieren.

Abgebildet sind immunhistochemisch gefärbte Kryoschnitte der terminalen Ilea von adulten C57BL/6JRj Mäusen nach Vehikel- (CTL) und Antibiosebehandlung (AB). Antibiosegabe führte zu einem ödematösen Aufquellen der Villi, bei gleichzeitiger Kondensation und unregelmäßiger Darstellung der epithelialen Struktur. Die Pfeile markieren exemplarisch mEGC, die bis in die Villispitzen projizieren. Maßstab = 100 μ m.

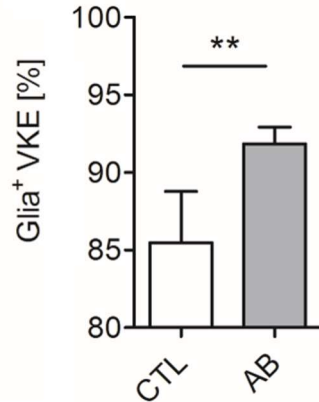


Abb. 6: Der Anteil Glia⁺ VKE ist in antibiotisch behandelten Tieren erhöht.

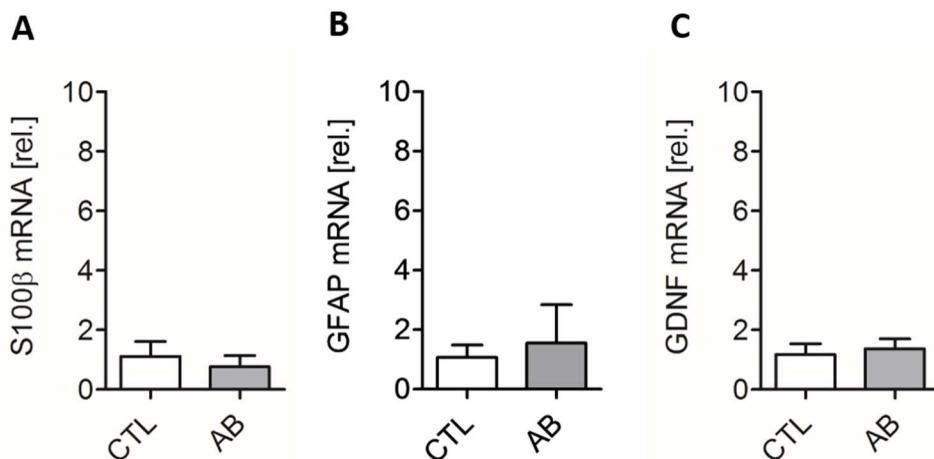
Gezeigt wird der Anteil der Glia⁺ Villus-Krypt-Einheiten (VKE) in antibiotisch behandelten (AB) Tieren im Vergleich zu vehikelbehandelten (CTL) Tieren. Die Auszählung erfolgte in immunhistochemisch gefärbten Kryoschnitten nach 21-tägiger Behandlung. Nach der Mikrobiomablation kam es zu einer prozentual signifikanten Steigerung der Glia⁺ VKEs. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (** $p \leq 0,01$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

(CTL: n= 4 Tiere, AB: n= 5 Tiere. Technische Replikate jeweils =6)

3.2.3 Antibiosebehandlung hat keinen Einfluss auf die Genexpression glialer Marker

Ergänzend zu den morphologischen Beobachtungen wurden als nächstes Genexpressionsanalysen verschiedener glialer Marker in der MC und der ME im Dünndarm durchgeführt. Untersucht wurden S100 β , SOX-10, GFAP und GDNF. Da SOX-10 bei diesem Verfahren sowohl in den Kontrollen als auch in den antibiotisch behandelten Tieren nicht detektierbar war, werden die Ergebnisse in dieser Auswertung grafisch nicht dargestellt.

Mucosa



Muscularis externa

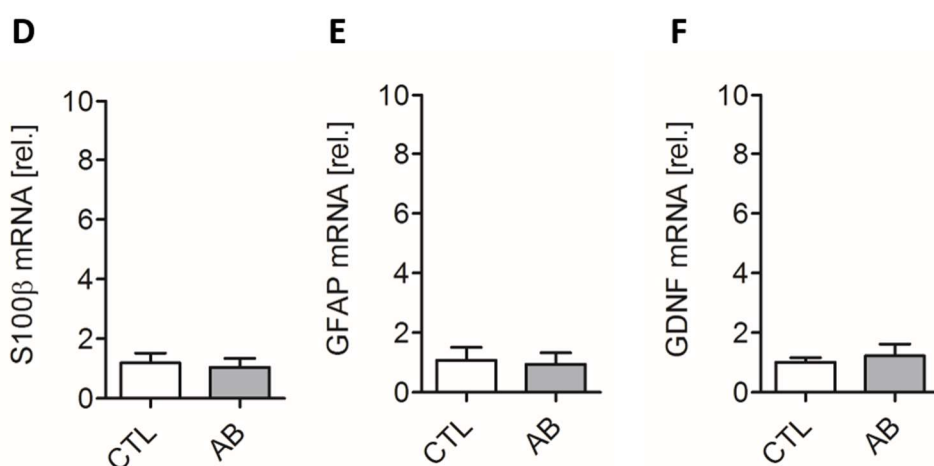


Abb. 7: Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP sowie des neurotrophen Faktors GDNF in der Mucosa (A-C) und der Muscularis externa (D-F) nach Vehikel- (CTL) und Antibiosebehandlung (AB).

Gemessen wurde die relative mRNA-Expression der jeweiligen Gene im Vergleich zum *Housekeeper*-Gen GAPDH mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR).

Die 21-tägige Antibiosebehandlung führte weder in der Mucosa noch in der Muscularis externa zu signifikanten Veränderungen der relativen mRNA-Expression von S100 β , GFAP und GDNF.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels t-Test.

(n = 10 Tiere pro Gruppe. Technische Replikate jeweils = 3)

Entsprechend der Beobachtung der prozentualen Zunahme der Glia⁺ VKE vermuteten wir auch eine Zunahme in der Gliamarkerepression. Weder für die jeweiligen Gliamarker S100 β und GFAP (**Abb. 7A, B, D und E**) noch für den neurotrophen Faktor GDNF (**Abb. 7C und F**) konnten nach Antibiosebehandlung signifikante Unterschiede in der MC oder ME detektiert werden. Die in den vorherigen morphologischen Analysen detektierte moderate Erhöhung der VKE konnte auf transkriptioneller Ebene nicht bestätigt werden.

3.2.4 Antibiosebehandlung führt zu einer reduzierten Expression des Proteins SOX-10 in der ME

Zur weiteren Evaluierung des glialen Phänotyps wurde ein Westernblot ergänzt, da unsere Ergebnisse der IHC und der Genexpressionsanalyse nicht mit den Ergebnissen von Kabouridis et al. (2015a) in Einklang waren und wir bislang keine Reduktion glialer Marker durch Antibiosebehandlung beobachten konnten.

In der Westernblotanalyse konnten in der MC keine Signale detektiert werden. Daher sind die Ergebnisse hier nicht graphisch dargestellt. In der ME ergaben sich für S100 β unscharfe Banden auf unterschiedlicher Höhe, sodass die erfolgte Quantifizierung als ungenau bewertet werden muss (**Abb. 8A**). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen für S100 β (**Abb. 8A**). Für SOX-10 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proteinmenge in der ME behandelte Tiere: Während der Wert der Kontrollgruppe entsprechend der Normierung bei $100,0 \pm 7,7$ lag, ergab sich für die Antibiose-Gruppe $66,04 \pm 10,2$ und somit eine Reduktion um ca. 34 % (**Abb. 8B**; * $p \leq 0,05$). Die β -Aktin-Banden bestätigten die gleichmäßige Beladung der Taschen und wurden für die Normalisierung der Proteinmengen herangezogen (**Abb. 8C**).

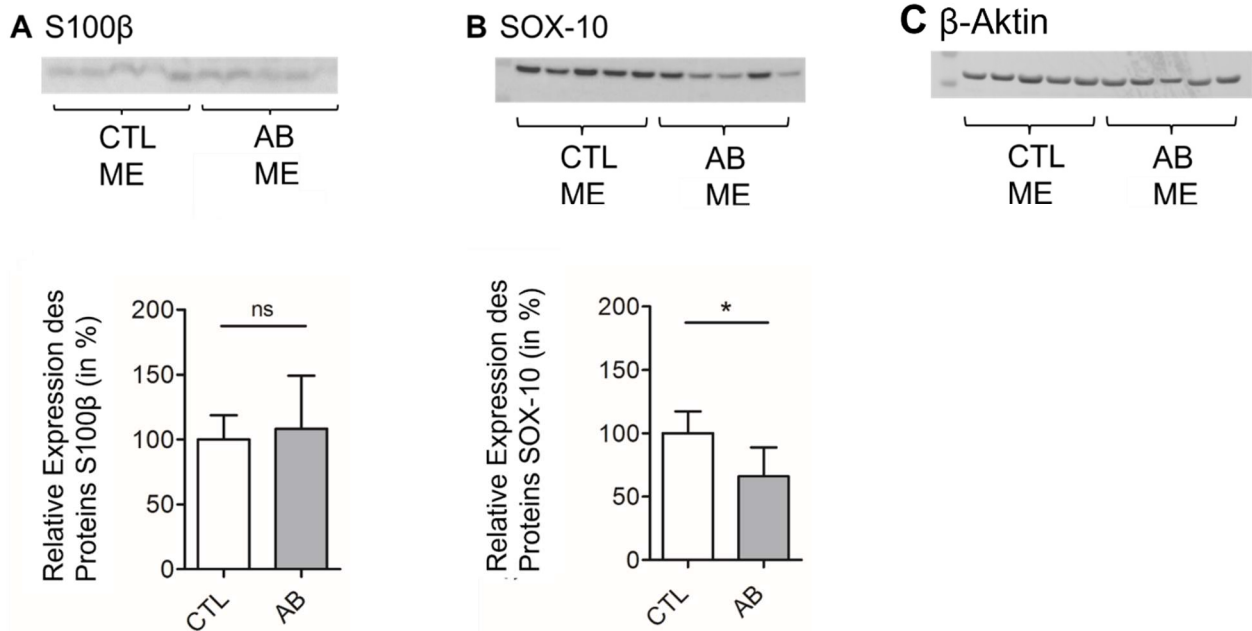


Abb. 8: Proteinexpression von S100β (A), SOX-10 (B) und des *Housekeeping*-Proteins β-Aktin in der Muscularis externa (ME) nach Vehikel- (CTL) und Antibiose-Behandlung (AB).

Es erfolgte die Messung der Proteinexpression mittels Westernblot.

(A) Die Expression von S100β zeigte sich durch die Antibiose-Therapie nicht verändert.

(B) Die Expression von SOX-10 zeigte sich nach der Antibiose-Therapie signifikant vermindert.

(C) Die Expression des *Housekeepers* β-Aktin diente der Ladungskontrolle.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$). Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels t-Test.

($n = 5$ Tiere pro Gruppe. Technische Replikate jeweils = 2)

In Zusammenschau der Ergebnisse aus IHC, Genexpressionsanalyse und Westernblot konnten wir keine Reduktion der mEGC bzw. deren Marker durch AB erreichen.

3.3 Gnotobiotische und konventionalisierte Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäuse im Vergleich

3.3.1 Konventionalisierung führt zur bakteriellen Besiedlung des Darms

Als nächstes sollte der EGC-Phänotyp in gnotobiotischen und konventionalisierten adulten Mäusen untersucht werden. Entsprechend den Beobachtungen bei den Antibiose-Tieren (**Abb. 4C**) waren die Caeca der gnotobiotischen Tiere zum Zeitpunkt der Organentnahme erweitert und mit Stuhl gefüllt, wodurch die Abdomina leicht aufgetrieben waren. Die Stuhlproben, die vor der Konventionalisierung gewonnen wurden, führten zu

keinem Wachstum bakterieller Kolonien auf den Agarplatten. Bereits eine Woche nach der ersten Stuhlgavage sowie in den folgenden Wochen konnten zahlreiche CFUs nachgewiesen werden, die die erfolgreiche mikrobielle Besiedlung des Darms anzeigten. Bei der Organentnahme nach 28 Tagen waren die Caeca gewöhnlich groß.

Wir schließen daraus, dass die Konventionalisierung der gnotobiotischen Mäuse erfolgreich durchgeführt wurde.

3.3.2 Konventionalisierung hat keinen Einfluss auf gliale Marker in der IHC

Im Folgenden wurde überprüft, ob die Haltung von Mäusen unter sterilen Bedingungen zu einer reduzierten Präsenz EGC in der MC führt und ob die anschließende mikrobielle Darmbesiedlung als Stimulus für die Ausbildung eines intakten EGC-Netzwerkes dient. Zudem wurde unter Verwendung von MyD88^{-/-} Mäusen die Rolle des TLR-Adaptermoleküls MyD88 in diesem Zusammenhang untersucht. Hierdurch sollte eine mögliche TLR-Beteiligung in diesem Zusammenhang analysiert werden.

Es erfolgte die immunhistochemische Analyse der Glia⁺ VKE, um die beiden unabhängigen Variablen Genotyp und Sterilität zu untersuchen.

Die mikroskopische Analyse zeigte keine Unterschiede weder zwischen den Genotypen noch zwischen sterilem und keimbesiedeltem Zustand. Sowohl die Zottenstruktur als auch das mEGC-Netzwerk erschienen unter allen vier Bedingungen ähnlich: Die Zotten präsentierten sich, anders als nach Antibiosebehandlung (**Abb. 5**), intakt und nicht aufgequollen. Zudem konnte man mEGC sowohl in den Zottenspitzen als auch in den Krypten finden (**Abb. 9 und 10**).

Eine Quantifizierung der VKE ergab für die gnotobiotischen Wildtypen einen Anteil Glia⁺ VKE an allen VKE von $77 \pm 1,3$ % (**Abb. 11**). Bei den gnotobiotischen MyD88^{-/-}-Mäusen lag dieser bei $83,75 \pm 5,7$ %, sodass im keimfreien Zustand keine signifikanten Differenzen zwischen den Genotypen ausgemacht werden konnten. Anders verhielt es sich im konventionalisiertem Zustand: Der Anteil Glia⁺ VKE bei den Wildtypen wurde mit $71,80 \pm 6,6$ % bestimmt, bei den Knockout-Tieren mit $84,54 \pm 2,8$ % (**Abb. 11**). Hier ergab sich ein signifikanter Anstieg der Glia⁺ VKE in den konventionalisierten MyD88^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den konventionalisierten Wildtypen (* $p \leq 0,05$). Zwischen gnotobiotischen und konventionalisierten MyD88^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Schlussendlich scheint die nachträgliche mikrobielle Besiedlung des Darms im adulten Alter entgegen unseren Erwartungen keinen Effekt auf den immunhistochemischen Phänotyp mEGC zu haben.

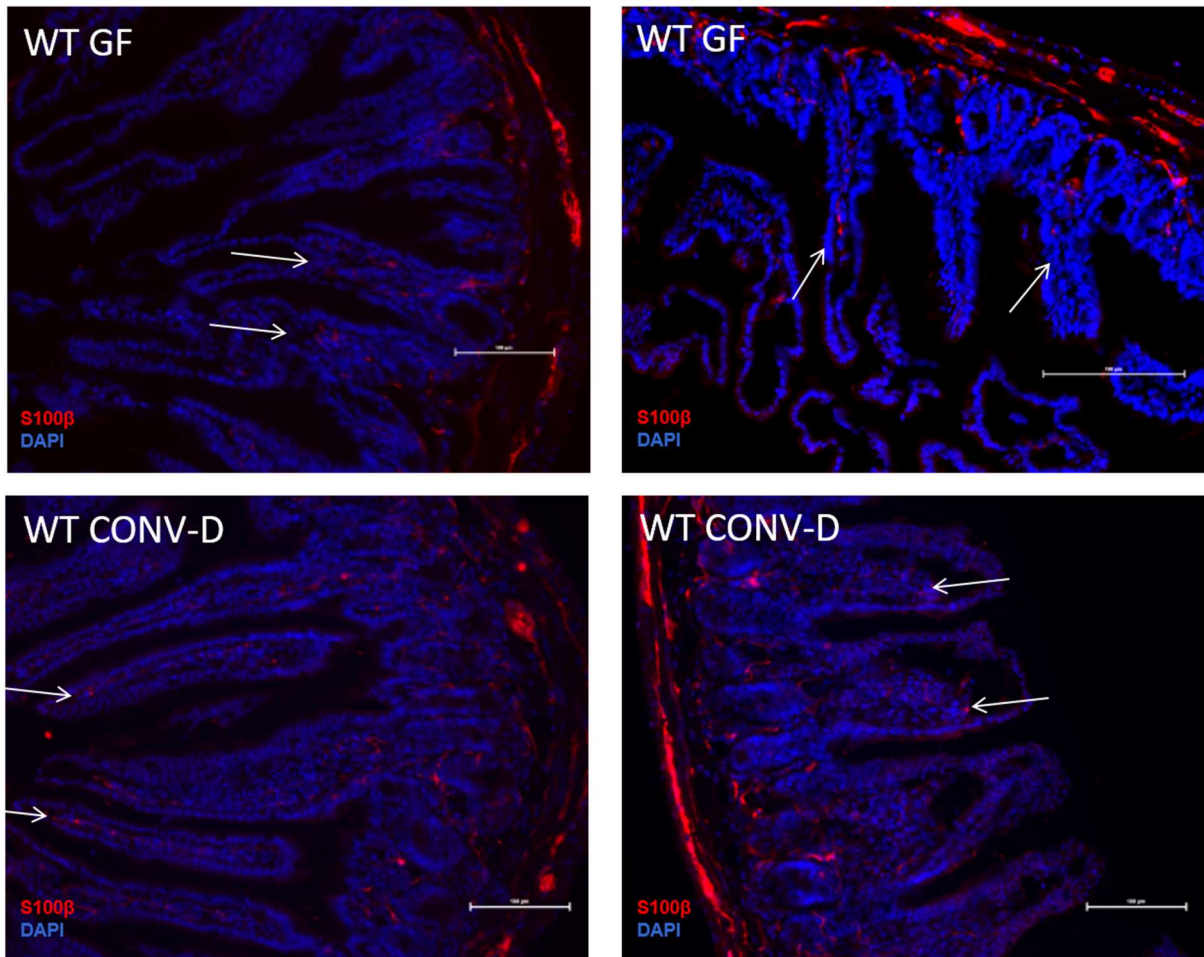


Abb. 9: Konventionalisierung verändert nicht den mEGC-Phänotyp in Wildtypmäusen. Abgebildet sind immunhistochemisch gefärbte Kryoschnitte der terminalen Ileä von Wildtypmäusen (WT) im gnotobiotischem (GF) und konventionalisiertem (CONV-D) Zustand. Die Zotten stellen sich intakt dar, mEGC sind sowohl in den Zottenspitzen als auch in den Krypten zu sehen. Zwischen GF und CONV-D sind keine Unterschiede zu erkennen. Die Pfeile markieren exemplarisch mEGC. Maßstab = 100 μ M

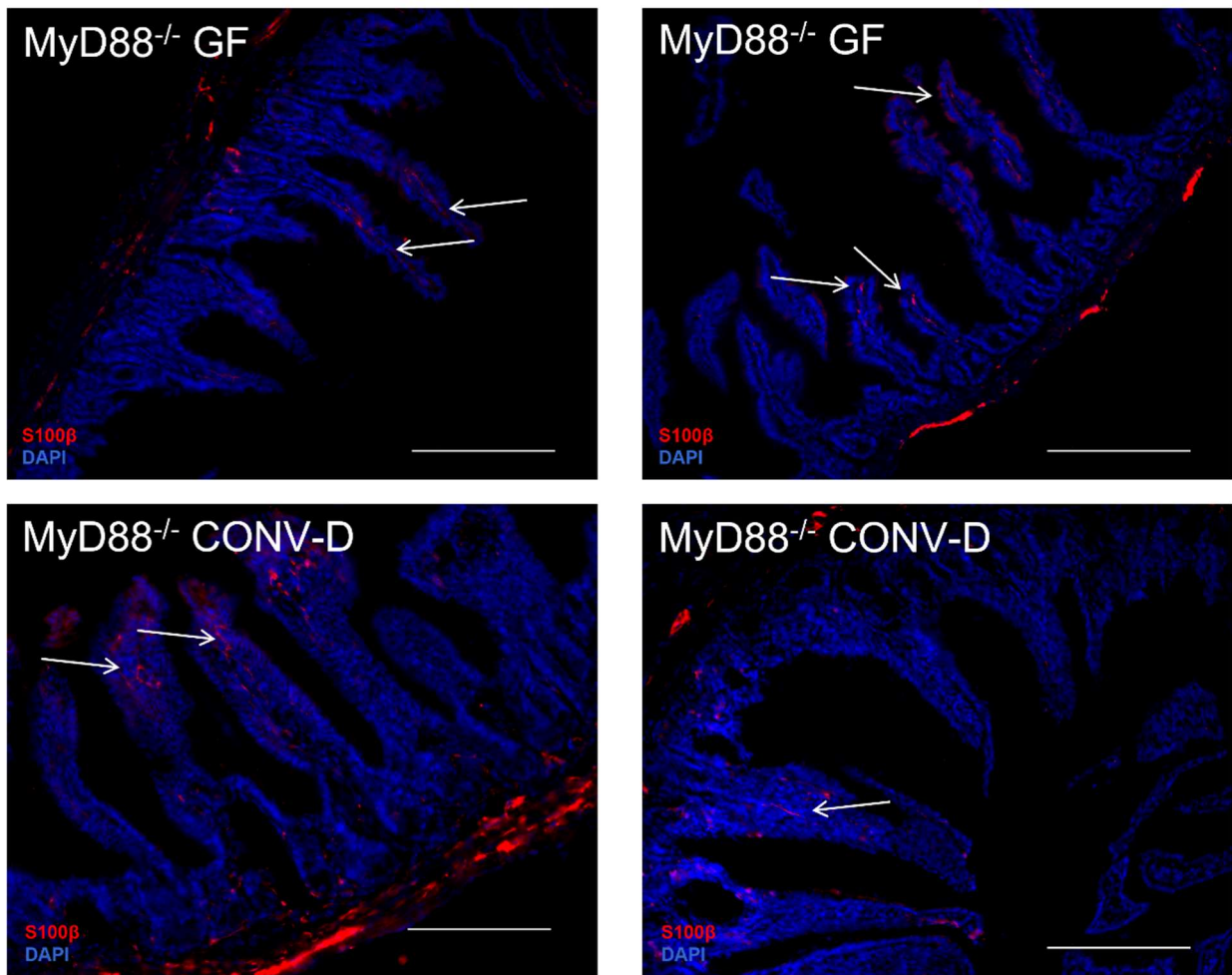


Abb. 10: Konventionalisierung verändert nicht den mEGC-Phänotyp in *MyD88*^{-/-}-Mäusen. Abgebildet sind immunhistochemisch gefärbte Kryoschnitte der terminalen Ilea von *MyD88*^{-/-}-Mäusen im gnotobiotischem (GF) und konventionalisiertem (CONV-D) Zustand. Die Zotten stellen sich intakt dar, mEGC sind sowohl in den Zottenspitzen als auch den Krypten zu sehen. Zwischen GF und CONV-D sind hier keine Unterschiede zu erkennen. Zudem sind keine Unterschiede zwischen WT (Abb. 9) und *MyD88*^{-/-}-Mäusen zu sehen. Die Pfeile markieren exemplarisch mEGC. Maßstab = 100 μ m

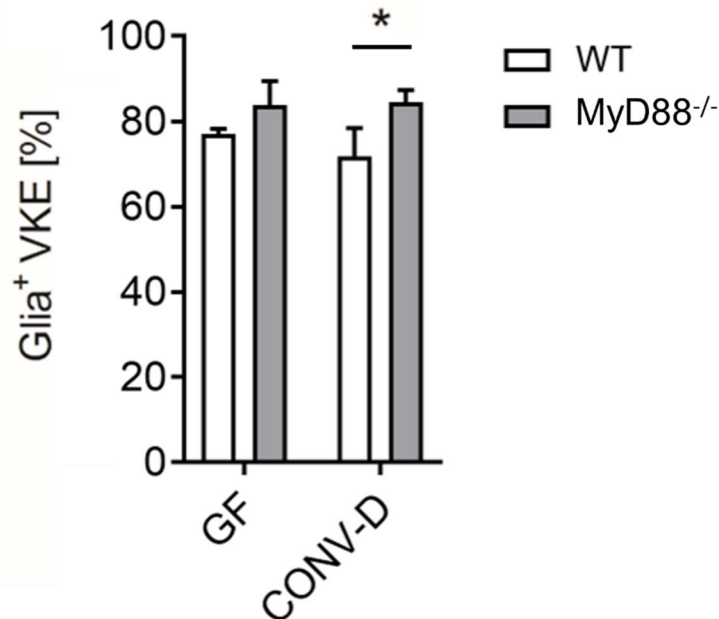


Abb. 11: Der Anteil Glia⁺ VKE ist in konventionalisierten MyD88^{-/-}-Mäusen erhöht.

Gezeigt wird der Anteil der Villus-Krypten-Einheiten (VKEs), die Gliazellen enthalten, in keimfreien (GF) und konventionalisierten (CONV-D) Mäusen. Differenziert wird weiterhin zwischen Wildtyp- (WT) und MyD88^{-/-}-Mäusen. Die Auszählung erfolgte in immunhistochemisch gefärbten Kryoschnitten. Der Anteil Glia⁺ VKEs ist in konventionalisierten MyD88^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu konventionalisierten Wildtypmäusen erhöht. Die Konventionalisierung an sich führte zu keinen signifikanten Veränderungen.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer 2-way ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey's-*post-hoc*-Test.

(GF WT: n= 3, GF MyD88^{-/-} : n= 5, CONV-D WT: n= 3, CONV-D MyD88^{-/-}: n= 3. Technische Replikate jeweils = 8)

3.3.3 Konventionalisierung führt MyD88-abhängig zur vermehrten Genexpression glialer Marker

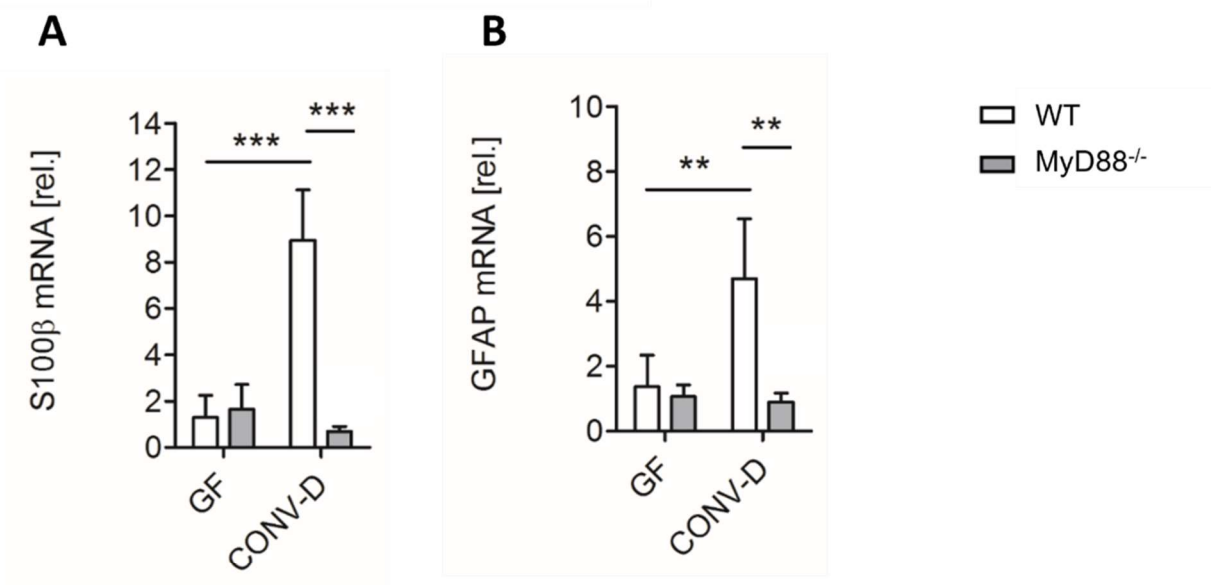
Neben den histologischen Untersuchungen wurde ebenfalls eine Genexpressionsanalyse der glialen Marker S100 β und GFAP in der MC und ME durchgeführt.

Vor der Konventionalisierung konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Gliamarkerexpression zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (**Abb. 12A-D**).

In Wildtypmäusen konnte nach der Konventionalisierung im Vergleich zu keimfrei gebliebenen Tieren eine signifikante Aufregulation (jeweils *** $p \leq 0,001$) von S100 β sowohl in

der MC als auch in der ME detektiert werden (**Abb. 12A**: $1,30 \pm 0,7$ fach vs. $8,94 \pm 2,2$ fach in der MC und **Abb. 12C**: $1,00 \pm 0,1$ fach vs. $2,03 \pm 0,4$ fach in der ME). Ähnliche Ergebnisse konnten für GFAP gemessen werden (**Abb. 12B**: $1,37 \pm 1,0$ fach vs. $4,70 \pm 1,8$ fach in der MC und **Abb. 12D**: $1,01 \pm 0,2$ fach vs. $2,36 \pm 0,7$ fach in der ME). Auch hierfür zeigten sich die Differenzen sowohl in der MC als auch in der ME als signifikant (jeweils $** p \leq 0,01$).

Mucosa



Muscularis externa

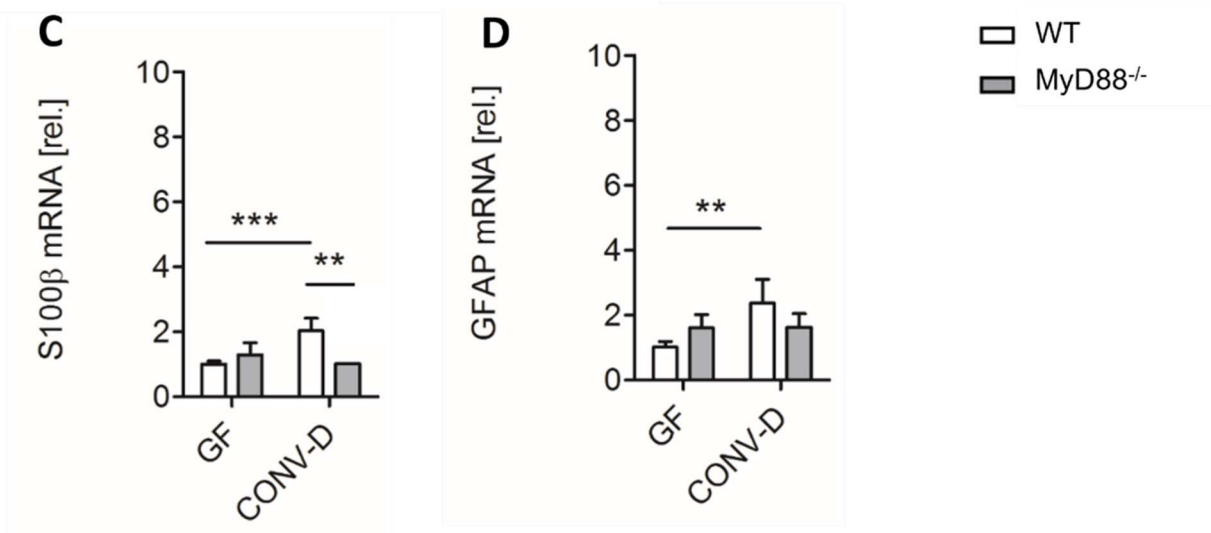


Abb. 12: Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP in der Mucosa (A, B) und der Muscularis externa (C, D) in gnotobiotischen (GF) und konventionalisierten (CONV-D) Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).

Keimfrei (GF) aufgewachsene Mäuse wurden über 28 Tage einem Mikrobiom ausgesetzt (konventionalisiert) und anschließend mit gnotobiotisch verbliebenen Mäusen verglichen. Wildtyp- (WT) und MyD88^{-/-}-Mäuse wurden jeweils separat untersucht.

Gemessen wurden die relative mRNA-Expressionen der jeweiligen Gene im Vergleich zum *Housekeeper*-Gen GAPDH mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR).

Nach Konventionalisierung kann in Wildtyp-, nicht aber in MyD88^{-/-}-Mäusen, eine Aufregulation der Genexpression glialer Marker beobachtet werden. In keimfreien Tieren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen detektiert werden. In den konventionalisierten Tieren ist die Expression glialer Marker in MyD88^{-/-}-Tieren gegenüber den Wildtypen deutlich reduziert.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und statistische Signifikanzen sind durch Sterne gekennzeichnet (** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer 2-way ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey's-*post-hoc*-Test.

(GF WT: n= 6, GF MyD88^{-/-} : n= 5, CONV-D WT: n= 3, CONV-D MyD88^{-/-}: n= 3. Technische Replikate jeweils = 3)

In den MyD88^{-/-}-Mäusen führte die Konventionalisierung zu keinen signifikanten Unterschieden in der Expression glialer Marker, weder in der MC noch in der ME (**Abb. 12A-D**). Tendenziell kann man allenfalls eine leicht verminderte Expression der Marker nach Konventionalisierung beobachten.

Für S100 β wurden in den konventionalisierten Tieren in der MC und in der ME geringere mRNA-Mengen in den MyD88^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen detektiert. Hier waren die Unterschiede sowohl in der MC als auch in der ME signifikant (**Abb. 12A**: 8,94 \pm 2,2fach vs. 0,70 \pm 0,2fach; *** $p \leq 0,001$ in der MC; **Abb. 12C**: 2,03 \pm 0,4fach vs. 1,02 \pm 0,0fach; ** $p \leq 0,01$ in der ME).

In den konventionalisierten Tieren zeigte sich auch für GFAP in der MC der MyD88^{-/-}-Tiere eine geringere Expression der mRNA im Vergleich zu den Wildtypen (**Abb. 12B**: 4,70 \pm 1,8fach in WT vs. 0,9 \pm 0,3fach in MyD88^{-/-}; ** $p \leq 0,01$). In der ME ergab sich in den konventionalisierten Tieren zwischen den Genotypen kein Unterschied hinsichtlich der GFAP-Expression (**Abb. 12D**).

Wir schlussfolgern, dass die nachträgliche mikrobielle Darmbesiedlung zu einer Steigerung der Gliamarker-mRNA-Expression in MC und ME führt und dieser Effekt MyD88-abhängig ist.

3.4 Postnatale Entwicklung in Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen

3.4.1 Postnatal ist die mucosale Gliamarkerexpression MyD88-abhängig

Es sollte die postnatale Entwicklung des EGC-Netzwerkes in der MC und der ME in neonatalen Mäusen nachvollzogen werden. Die Proben waren zu fein, um qualitativ hochwertige Kryoschnitte für eine IHC zu erhalten, daher entfällt diese Auswertung. Hier wurde die mRNA-Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP in der MC und ME untersucht. Verglichen wurden Wildtypen und MyD88^{-/-}-Tiere jeweils zu den Zeitpunkten P0 und P15. Die Werte wurden gegen P0 normalisiert, die an P15 erhobenen Messwerte ins Verhältnis zu denen von P0 gesetzt. Die Einflüsse der beiden unabhängigen Variablen (Genotyp, Alter) auf gliale Expressionsmuster sollten geprüft werden.

In Wildtypmäusen konnte eine deutliche, hochsignifikante Aufregulation der Gliamarker innerhalb der ersten 15 postnatalen Tage gemessen werden. Die S100 β -Expression in der MC steigerte sich von P0 zum Zeitpunkt P15 auf $28,12 \pm 10,0$ fach sichtlich (**Abb. 13A**; *** $p \leq 0,001$). Gleiches gilt für GFAP in der MC: Mit einer relativen mRNA-Expression von $8,27 \pm 1,7$ fach zum Zeitpunkt P15 stieg diese deutlich an (**Abb. 13B**; *** $p \leq 0,001$). In der ME waren ähnliche Effekte zu beobachten. So stieg an P15 die relative mRNA-Expression von S100 β auf $1,78 \pm 0,1$ fach (**Abb. 13C**; *** $p \leq 0,001$) und von GFAP auf $10,27 \pm 0,7$ fach (**Abb. 13D**; *** $p \leq 0,001$).

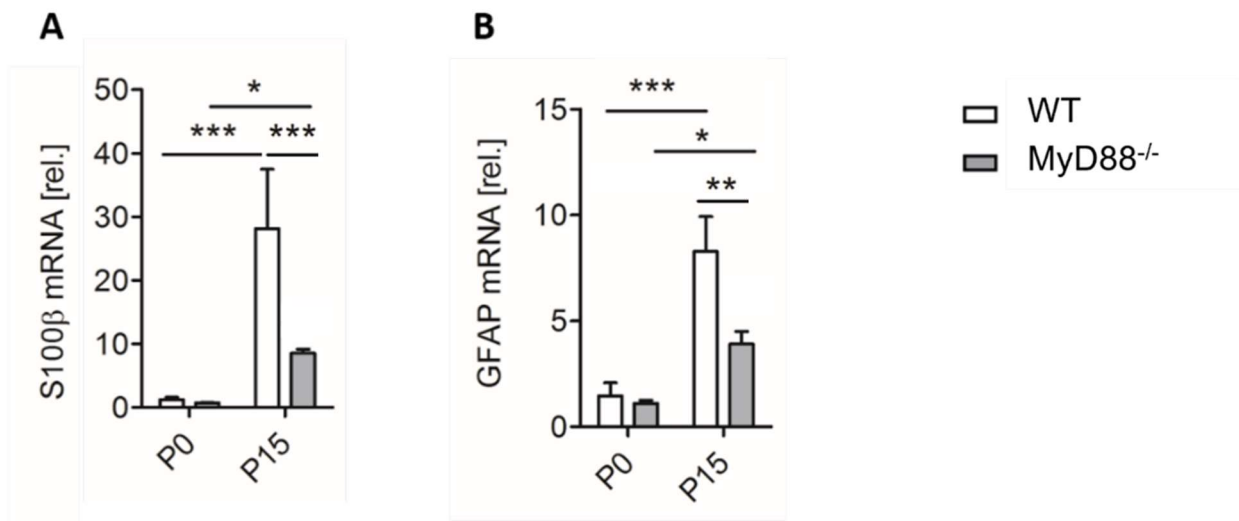
Die Aufregulation der Gliamarker zwischen P0 und P15 konnte auch in MyD88^{-/-}-Mäusen beobachtet werden: Hier kam es ebenfalls zu einer Steigerung der Gliamarkerexpression um ein Vielfaches in der MC (**Abb. 13A**: S100 β bei P15: $8,55 \pm 0,6$ fach; **Abb. 13B**: GFAP bei P15: $3,91 \pm 1,7$ fach; jeweils * $p \leq 0,05$). In der MC zeigte sich die zeitabhängige Aufregulation in MyD88^{-/-}-Mäusen schwächer ausgeprägt als in Wildtypmäusen. In der ME waren die Effekte auch für MyD88^{-/-}-Mäuse stark ausgeprägt: Die gesteigerten Expressionen von S100 β auf $1,88 \pm 0,1$ fach (**Abb. 13C**) und von GFAP auf $9,3 \pm 1,0$ fach (**Abb. 13D**) nach 15 Tagen ergaben wie in WT hochsignifikante Unterschiede mit jeweils einem $p \leq 0,001$.

Zum Zeitpunkt P0 konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen gemessen werden (**Abb. 13A-D**), zum Zeitpunkt P15 zeigte sich die relative mRNA-Expression in den MyD88^{-/-}-defizienten Tieren in der MC jeweils signifikant niedriger als in den Wildtypen. Die Signifikanzwerte p lagen hier bei $p \leq 0,001$ für S100 β (**Abb. 13A**),

bzw. $p \leq 0,01$ für GFAP (**Abb. 13B**). In der ME hingegen zeigte der Genotyp zu beiden Zeitpunkten P0 und P15 keinen Einfluss (**Abb. 13C und D**).

Insgesamt wurde eine deutliche Steigerung der Gliamarkerexpression im zeitlichen Verlauf beobachtet. Da sich die mikrobielle Darmbesiedlung in den ersten postnatalen Tagen grundlegend zu formen beginnt, vermuten wir hier eine mikrobiomabhängige postnatale mEGC-Formation. In der MC, nicht jedoch in der ME, scheint dieser Effekt von dem TLR-Adaptormolekül MyD88 abhängig zu sein.

Mucosa



Muscularis externa

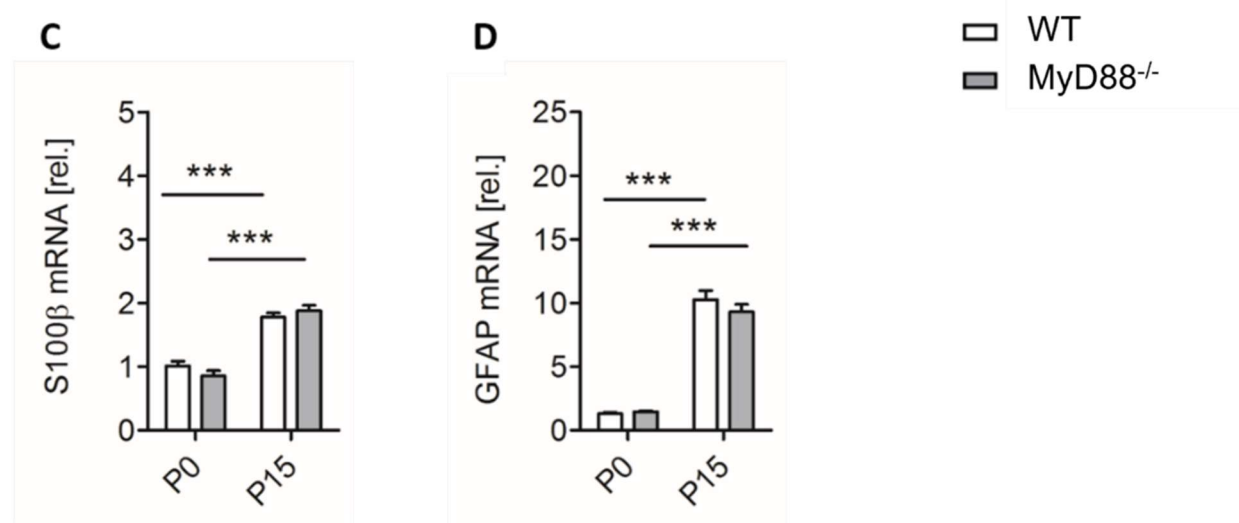


Abb. 13: Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP in der Mucosa (A, B) und der Muscularis externa (C, D) in neonatalen Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 in Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).

Wildtyp- (WT) und MyD88-defiziente Mäuse wurden unmittelbar nach der Geburt (P0) oder am 15. postnatalen Tag (P15) auf die Genexpression der Gliamarker S100 β und GFAP in der Mucosa und der Muscularis externa untersucht. Gemessen wurde die relative mRNA-Expression der jeweiligen Gene im Vergleich zum *Housekeeper*-Gen GAPDH mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR).

(A, B, C, D) In WT kam es für beide Gliamarker zur gesteigerten Expression innerhalb der 15 Tage sowohl in der MC, als auch in der ME.

(A, B) In der MC zeigte sich dieser Effekt MyD88-abhängig.

(C, D) In der ME zeigte der Genotyp keinen Einfluss.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt und statistische Signifikanzen sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer 2-way ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey's-*post-hoc*-Test.

(P0 WT: n= 5, P0 MyD88^{-/-} : n= 7, P15 WT: n= 4, P15 MyD88^{-/-}: n= 11. Technische Replikate jeweils = 3)

3.4.2 Postnatale Entwicklung der mucosalen TLR- und IL-1R1-Expression

Die postnatale EGC-Entwicklung in der MC wurde zuvor als MyD88-abhängig identifiziert. Eine Mikrobiomabhängigkeit wurde an dieser Stelle ebenfalls angenommen. Wir vermuteten eine TLR-vermittelte Interaktion zwischen Mikrobiom und postnataler mEGC-Entwicklung, da TLR mikrobielle Bestandteile detektieren können und MyD88 Bestandteil der Signalkaskade der meisten TLR ist (Frosali et al., 2015; Geng et al., 2022; Medzhitov et al., 1998). Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurde im Folgenden die mRNA-Expression der TLR2, -4 und -5 in Abhängigkeit des Genotyps und der Zeit in der postnatalen Entwicklung in der MC untersucht. Da MyD88 ebenfalls als Adaptermolekül des IL-1R1-Signalwegs vorkommt, wurde die entsprechende mRNA-Expression an dieser Stelle ebenfalls untersucht (Medzhitov et al., 1998).

Zum Zeitpunkt P0 konnten hier bei keinem Rezeptor relevanten Unterschiede zwischen WT und Myd88^{-/-}-Mäusen detektiert werden (**Abb. 14A-D**).

Die TLR2- und -4-Expressionen zeigten in WT während der postnatalen Entwicklung keine Veränderungen (**Abb. 14A und B**). Interessanterweise war dies hingegen in MyD88^{-/-}-Mäusen der Fall: Hier kam es innerhalb der ersten 15 Lebenstage jeweils zu einer signifikant gesteigerten Expression (**Abb. 14A und B**; jeweils ** $p \leq 0,01$).

Die TLR5- und IL-1R1-Expressionen zeigten untereinander sehr ähnliche Entwicklungen. Im Gegensatz zu TLR2 und -4 zeigten sich bei diesen auch in WT zeitabhängige Verän-

derungen: Innerhalb der 15 Tage stieg die relative mRNA-Expression jeweils an (**Abb. 14C**: TLR5 bei P15: $2,78 \pm 0,2$ fach; **Abb. 14D**: IL-1R1 bei P15: $2,10 \pm 0,5$ fach; jeweils $** p \leq 0,01$). In MyD88^{-/-}-Tieren hingegen kam es sowohl für TLR5 als auch für IL-1R1 sogar zu einer Reduktion der relativen mRNA-Expression innerhalb der 15 Tage (**Abb. 14C**: TLR5 bei P15: $0,39 \pm 0,1$ fach; $*** p \leq 0,001$; **Abb. 14D**: IL-1R1 bei P15: $0,57 \pm 0,1$ fach; $** p \leq 0,01$). Entsprechend zeigte sich an P15 jeweils eine deutlich geringere Expression von TLR5 und IL1-R1 in den MyD88^{-/-}- im Vergleich zu den Wildtypmäusen (**Abb. 14C und 14D**, jeweils $*** p \leq 0,001$).

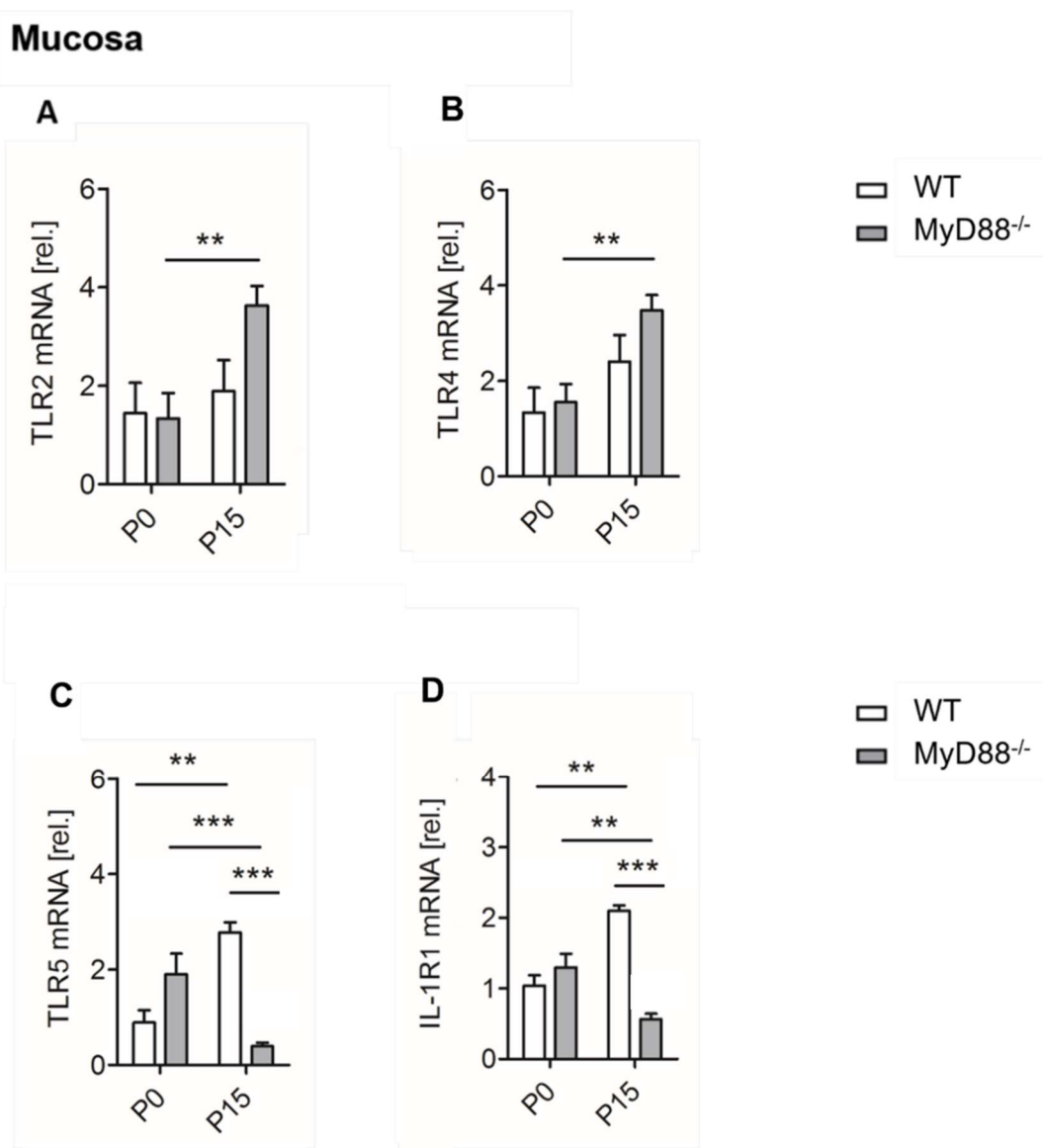


Abb. 14: Expression von TLR2 (A), TLR4 (B), TLR5 (C) und IL-1R1 (D) in der Mucosa in neonatalen Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 in Wildtyp- (WT) und MyD88^{-/-}-Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).

Wildtyp- (WT) und MyD88-defiziente Mäuse wurden unmittelbar nach der Geburt (P0) oder am 15. postnatalen Tag (P15) auf die Expression genannter Gene in der Mucosa untersucht. Gemessen wurde die relative mRNA-Expression der jeweiligen Gene im Vergleich zum *Housekeeper*-Gen GAPDH mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR). (A, B, C, D) Zum Zeitpunkt P0 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

(A, B) Im Vergleich zu P0 kam es zum Zeitpunkt P15 zu einer deutlich stärkeren Expression von TLR2 und -4 in MyD88^{-/-}-Mäusen, während in Wildtypen für TLR2 und -4 keine zeitliche Dynamik festgestellt werden konnte.

(C, D) Im Vergleich zu P0 kam es zum Zeitpunkt P15 zu einer deutlich stärkeren Expression von TLR5 und IL-1R1 in Wildtypen. Zum Zeitpunkt P15 fiel die Expression selbiger in MyD88-defizienten Mäusen deutlich geringer aus als in Wildtypen.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer 2-way ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey's-*post-hoc*-Test.

(P0 WT: n= 5, P0 MyD88^{-/-} : n= 7, P15 WT: n= 4, P15 MyD88^{-/-}: n= 11. Technische Replikate jeweils = 3)

Insgesamt zeigten TLR5 und IL-1R1 in diesen Messungen ähnliche Dynamiken in Abhängigkeit der Zeit und des Genotyps wie zuvor S100 β und GFAP. Bei beiden scheint sich die Expression im Rahmen der postnatalen Entwicklung in der MC ebenfalls MyD88-abhängig zu steigern. TLR2 und 4 zeigten diese Dynamiken nicht.

3.4.3 Postnatale Entwicklung der mucosalen GDNF-, IL-1 α - und IL-1 β -Expression

Nachdem wir verschiedene Rezeptoren im Zusammenhang mit der postnatalen mEGC-Entwicklung betrachtet haben, sollten potenziell im Zusammenhang stehende Mediatoren untersucht werden. Hierfür wurden in denselben Versuchsgruppen die mRNA-Expression des neurotrophen Faktors GDNF, sowie der IL-1R1-Liganden IL-1 α und IL-1 β untersucht. Bekannterweise fördert GDNF als Chemoattraktant die Proliferation und Migration der EGC-Vorläuferzellen und kann auch von EGC freigesetzt werden (Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020; von Boyen et al., 2004; von Boyen et al., 2006). EGC besitzen den IL-1R1 und können über diesen auf IL-1 α und IL-1 β reagieren (Schneider et al., 2022; Stoffels et al., 2014).

Es sollten die Einflüsse der beiden Variablen (Genotyp, Alter) auf jeweilige Expressionsmuster geprüft werden. Hauptaugenmerk wurde weiterhin auf die Entwicklung in der MC gelegt.

Den gleichen Trends wie der mucosalen Gliamarkerexpression (siehe **Abb. 13A und B**) folgend, wurde jeweils eine deutliche Steigerung der GDNF-, und IL-1 β -mRNA in WT zwischen P0 und P15 detektiert (**Abb. 15A und C**). Für GDNF war diese auf $2,37 \pm 0,1$ fach gesteigert (**Abb. 15A**; ** $p \leq 0,01$), bei IL-1 β auf $9,86 \pm 2,3$ fach (**Abb. 15C**; *** $p \leq 0,001$). IL-1 α zeigte in WT keine zeitliche Dynamik (**Abb. 15B**).

In MyD88^{-/-}-Mäusen zeigte GDNF keine zeitliche Dynamik (**Abb. 15A**). IL-1 α zeigte sich in MyD88^{-/-}-Mäusen nach 15 Tagen deutlich reduziert (**Abb. 15B**: $0,09 \pm 0,0$ fach; *** $p \leq 0,001$). Die IL-1 β -Expression hingegen steigerte sich in MyD88^{-/-}-Tieren im zeitlichen Verlauf (**Abb. 15C**: $4,18 \pm 1,0$ fach; ** $p \leq 0,01$). Dieser Anstieg war jedoch schwächer als in WT (**Abb. 15C**).

Ebenso wie für S100 β und GFAP (siehe **Abb. 13A und B**) zeigten GDNF, IL-1 α und IL-1 β eine MyD88-Abhängigkeit: An Tag P15 sind die jeweiligen mRNA-Mengen in MyD88^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen deutlich reduziert (**Abb. 15A-C**). Die Signifikanzwerte p lagen hier für GDNF und IL-1 β jeweils bei $\leq 0,001$ und für IL-1 α bei $\leq 0,05$.

An Tag P0 hatte der MyD88-Genotyp keinen Einfluss auf die jeweilige Expression (**Abb. 15A-C**).

Mucosa

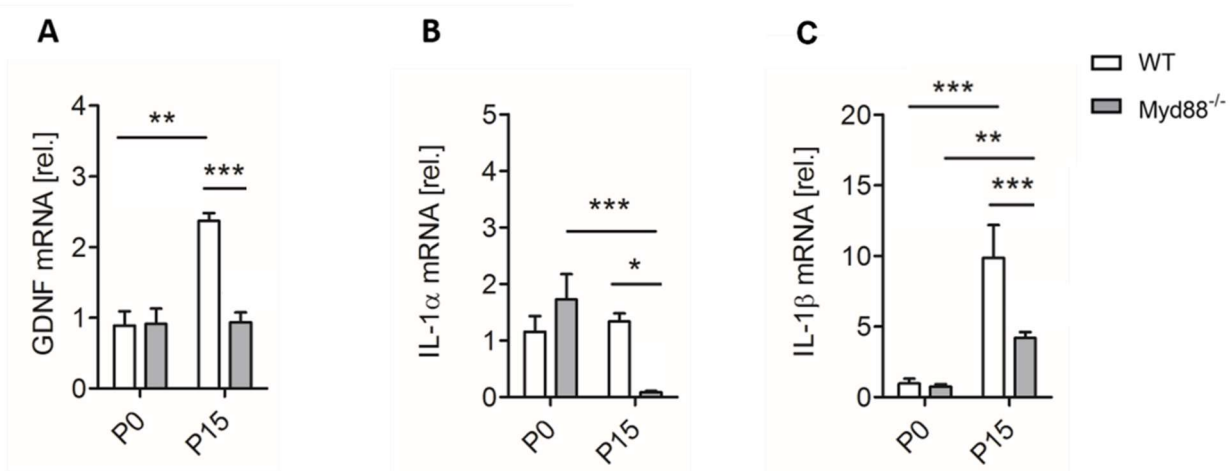


Abb. 15: Expression von GDNF (A), IL-1 α (B) und IL-1 β (C) in der Mucosa in neonatalen Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 in Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).

Wildtyp- (WT) und MyD88-defiziente Mäuse wurden unmittelbar nach der Geburt (P0) oder am 15. postnatalen Tag (P15) auf die Expression genannter Gene in der Mucosa untersucht. Gemessen wurde die relative mRNA-Expression der jeweiligen Gene im Vergleich zum *Housekeeper*-Gen GAPDH mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR). (A, B, C) Zum Zeitpunkt P0 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

(A, C) Im Vergleich zu P0 kam es zum Zeitpunkt P15 zu einer deutlich gesteigerten Expression von GDNF und IL-1 β in Wildtypen.

(A, B, C) Zum Zeitpunkt P15 fällt die Expression aller drei Gene in MyD88-defizienten Mäusen deutlich geringer aus als in Wildtypen.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt und statistische Signifikanzen durch Sterne gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer 2-way ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey's-*post-hoc*-Test.

(P0 WT: n= 5, P0 MyD88^{-/-} : n= 7, P15 WT: n= 4, P15 MyD88^{-/-}: n= 11. Technische Replikate jeweils = 3)

Wir vermuten aufgrund dieser Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen den Chemokinen IL-1 α , IL-1 β sowie des neurotrophen Faktor GDNF mit der postnatalen EGC-Entwicklung in der MC. Diese zeigten sich wie zuvor die Gliamarker sowohl zeit- als auch MyD88-abhängig.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Die Antibiosebehandlung führte erfolgreich zur Eradikation, die Konventionalisierung zur mikrobiellen Darmbesiedlung. Nach der Mikrobiomeradikation konnten in der IHC und in der Genexpressionsanalyse keine Depletion von S100 β ⁺ oder GFAP⁺ EGC in der Mucosa oder Muscularis externa gemessen werden. Ein Einfluss der Mikrobiomeradikation auf ein bereits bestehendes EGC-Netzwerk konnte somit nicht beobachtet werden.

Die Untersuchung gnotobiotischer bzw. konventionalisierter Tiere zeigte eine vermehrte Gliamarkerexpression durch eine nachträgliche mikrobielle Darmbesiedlung in adulten Wildtypmäusen. Dies gilt für Mucosa und Muscularis externa. Dieser Effekt scheint von MyD88 abhängig zu sein. Passend hierzu zeigte sich die mucosale Expression von S100 β und GFAP in konventionalisierten MyD88^{-/-}-Mäusen deutlich geringer als in konven-

tionalisierten Wildtypen. Immunhistochemisch konnte der Effekt nicht nachvollzogen werden.

In neonatalen Mäusen kann der Aufbau des EGC-Netzwerkes in der Genexpressionsanalyse von Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen in Mucosa und Muscularis externa nachvollzogen werden. Dieser scheint zumindest in der Mucosa von MyD88-abhängig zu sein. Somit fällt die Expression glialer Marker bei P15 in MyD88^{-/-}-Mäusen in der Mucosa, nicht aber in der Muscularis externa, deutlich geringer aus als in Wildtypen. Sehr ähnliche Effekte konnten für die Rezeptoren IL-1R1 und TLR5 sowie für GDNF-, IL-1 α und IL-1 β gemessen werden.

4. Diskussion

4.1 Mikrobieller Einfluss auf die mEGC-Regeneration in adulten Mäusen

Multipotente Progenitorzellen, die sich zu Neuronen und EGC differenzieren können, persistieren lebenslang im Plexus submucosus und myentericus (Kruger et al., 2002; Metzger et al., 2009; Natarajan et al., 1999). Gliogenese findet ständig statt (Joseph et al., 2011). Kabouridis et al. (2015a) haben immunhistochemisch die Mikrobiom-abhängigkeit der lebenslang stattfindenden Einwanderung neuer mEGC, sowie dessen Störung durch AB-Applikation nachgewiesen. AB führte nach 3 Wochen zu einer Reduktion der S100 β -Reaktivität in den Villi und Krypten der Mucosa. AB führte in einem aufwändigen *lineage tracing*-Versuch nachgewiesen zu einer Reduktion radiär in die Mucosa einwandernder SOX-10⁺ mEGC (Kabouridis et al., 2015a). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde dieser Versuch modifiziert nachgestellt.

Die Bereitstellung der Antibiose ad libitum in der Art wie Kabouridis et al. (2015a) sie vornahmen, führt laut Reikvam et al. (2011) zu einem vermeidenden Trinkverhalten mit konsekutivem Gewichtsverlust der Mäuse. Um eine gesundheitliche Gefährdung zu vermeiden, wurde die AB hier nicht ad libitum bereitgestellt, sondern gavagiert. Die Effektivität des hier verwendeten AB-Regimes wurde bereits mittels 16S-rRNA-, bzw. 16S-rDNA-Gensequenzierung nachgewiesen (De Vadder et al., 2018; Reikvam et al., 2011). Hier wurde ebenfalls eine deutliche Mikrobiomeradikation in den überprüften Stuhlproben beobachtet, auch wenn eine vollkommene Sterilität durch das Ausstreichen der Stuhlproben auf Agarplatten nicht bewiesen werden kann.

Analytisch führten wir ähnlich wie Kabouridis et al. (2015a) eine IHC-Analyse durch. Es wurden hier immunhistochemisch die S100 β ⁺-EGC enthaltenden VKEs nach 3 Wochen AB ausgezählt. Überraschend konnten wir, den Ergebnissen von Kabouridis et al. (2015a) widersprechend, in der IHC einen Anstieg der EGC enthaltenden VKEs in Folge der Antibiosegavage beobachten. Es sind bei diesem Vergleich technische Unterschiede zu berücksichtigen. Kabouridis et al. (2015a) nutzten ein konfokales Mikroskop, welches die Betrachtung verschiedener optischer Schnittebenen in der Tiefe ermöglicht (Gmitro und Aziz, 1993). Wir hingegen nutzten ein Fluoreszenzmikroskop mit herkömmlicher Epifluoreszenz, womit nur wenige Mikrometer-dicke Schnitte untersucht werden können. Potenziell gelangen Kabouridis et al. (2015a) dadurch eine genauere Analyse der VKEs.

Nach Graham et al. (2020) variiert die Dichte des ENS innerhalb weniger Millimeter sehr stark, sodass die Analyse weniger Mikrometer-dicker Schnitte in 2D zu ungenauen Analysen führt.

Auch De Vadder et al. (2018) und Vicentini et al. (2021) führten vergleichbare Versuche mit IHC-Auswertungen durch. De Vadder et al. (2018) untersuchten EGC in der Muscularis bzw. im myenterischen Plexus des Colons und verzeichneten eine reduzierte S100 β ⁺ Fläche in der IHC nach AB-Behandlung. Vicentini et al. (2021) bestätigten die Reduktion S100 β ⁺ EGC nach AB im myenterischen Plexus des Ileums und zeigten eine Reversibilität der Veränderungen nach AB. Im submukösen Plexus des Ileums, sowie im Colon verzeichneten sie keine Unterschiede nach AB (Vicentini et al., 2021).

Erstmalig untersuchten wir die mRNA-Expression glialer Marker in diesem Zusammenhang. Unsere Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wichen ebenfalls von den IHC-Analysen von Kabouridis et al. (2015a) und de Vadder et al. (2018) ab: Nach der AB-Therapie kam es zu keiner veränderten Gliamarker-mRNA-Menge in MC oder ME. Die Vergleichbarkeit der mRNA- und IHC-Analyse wird im Folgenden diskutiert. Während die IHC den glialen Phänotypen auf Proteinebene darstellt, bildet die mRNA-Expression als Zwischenprodukt der Proteinbiosynthese nicht den wahren Phänotyp ab. Tatsächlich besteht eine schwache Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge (Maier et al., 2009). Faktoren wie die Komplementarität der Shine-Dalgarno-Sequenz der mRNA zur rRNA, Temperatur, Translationsleistung, mRNA-Länge und Halbwertszeit der Proteine verhindern den Schluss von der mRNA- auf die entstehende Proteinmenge (Maier et al., 2009; Wang et al., 2013). Die Verwendung von sogenannten RiboTag-Mäusen könnte an dieser Stelle genauere Ergebnisse ermöglichen. Bei diesen wird nur in spezifischen Zelltypen die tatsächlich an Ribosomen-gebundene und damit translatierte mRNA gemessen, wobei eine stärkere Korrelation zwischen gemessener mRNA- und Proteinmenge besteht (Sanz et al., 2009; Wang et al., 2013). Die qPCR-Analyse der gliaspezifischen RiboTag-Proben sollte demnach besser mit dem tatsächlichen Phänotypen korrelieren.

Die Methode wurde im Nachgang zu dieser Promotionsarbeit auch von unserer Arbeitsgruppe erfolgreich zur Beschreibung eines EGC-spezifischen Genexpressionsprofils genutzt (Leven et al., 2022). Anhand dessen konnten wir bereits das gliaspezifische Expressionsmuster in EGC im Rahmen einer reaktiven Gliose in einer frühen Phase des postoperativen Ileus beschreiben (Schneider et al., 2022). Ebenso

konnten Stakenborg et al. (2022) anhand von RiboTag-Mäusen in EGC die Expression von Chemoattraktantien zum Anlocken antiinflammatorisch wirkender Makrophagen nachweisen.

Eine weitere Untersuchung der Proteine und somit genauere Aussage über den tatsächlichen Phänotyp sollte die Westernblot-Analyse ermöglichen. Vermutlich verhinderte eine zu geringe Proteinmenge die Messung von S100 β bzw. SOX-10 in der MC, weshalb diese Analyse keine Aussagen über die mEGC zulässt. In der ME hingegen zeigte die Untersuchung von SOX-10 eine tatsächlich verminderte Menge des Gliamarkers nach AB auf Proteinebene, hinweisend auf eine verminderte EGC-Zahl durch Mikrobiomeradikation. Ebenso ist jedoch auch eine verminderte SOX-10-Expression bei gleicher EGC-Zahl denkbar. Die S100 β -Westernblot-Analyse in der ME wies auf keine Veränderungen durch die AB hin, jedoch sind die Ergebnisse als unpräzise zu werten.

In Zusammenschau der hier erhobenen Ergebnisse aus Histologie, Gen- und Proteinexpressionsanalyse lassen sich die von Kabouridis et al. (2015a) beobachtete Depletion S100 β ⁺ und SOX-10⁺ EGC in den Villi durch Mikrobiomeradikation in verschiedenen Analysen nicht bestätigen. Die hier erhobenen Befunde sprechen eher gegen einen mikrobiellen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des adulten EGC-Netzwerkes, bzw. auf die Einwanderung neuer EGC in die Mucosa. Die Gründe der Diskrepanzen sind trotz oben genannter technischer Unterschiede unklar. Unter der von Kabouridis et al. (2015a) verwendeten AB-Therapie ist ein Gewichtsverlust der Tiere beschrieben worden (Reikvam et al., 2011). Unter modifiziertem Vorgehen konnten wir dies vermeiden. Möglicherweise war diese Malnutrition, einhergehend mit einer Reduzierung des Allgemeinzustandes, ausschlaggebend für die von Kabouridis et al. (2015a) beschriebenen mEGC-Veränderungen. Passend hierzu wurde bereits ein Einfluss der Ernährung auf die S100 β - und GFAP-Expression in Mäusen bereits beschrieben (Liu et al., 2020).

4.2 Mikrobieller Einfluss auf die primäre mEGC-Formation in adulten Mäusen

Zuvor wurde die Mikrobiomabhängigkeit der kontinuierlichen EGC-Regeneration bei bereits bestehendem EGC-Netzwerk betrachtet. Im Folgenden soll die Mikrobiomabhängigkeit der primären mEGC-Formation in adulten Mäusen diskutiert werden. Hierfür wurden keimfreie und konventionalisierte adulte Mäuse untersucht. Konventionalisierung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass keimfrei aufgewachsene Mäuse im adulten

Alter erstmalig einem Mikrobiom ausgesetzt wurden, um eine nachträgliche mikrobielle (Darm-)Besiedlung zu erreichen.

Kabouridis et al. (2015a) beschrieben zuvor in der IHC deutlich verminderte S100 β -Signale in der MC keimfreier Tiere verglichen mit konventionalisierten und unter konventionellen Bedingungen aufgewachsenen Tieren. De Vadder et al. (2018) konnten unter ähnlichen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen keimfreien und konventionalisierten Tieren bei der IHC-Untersuchung des glialen Phänotyps in der Muscularis feststellen.

In unserer IHC-Analyse konnten wir in WT-Mäusen ebenfalls keine Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen beobachten.

Hier erhobene mRNA-Expressionsmuster glialer Marker divergierten von unseren IHC-Ergebnissen. Es zeigte sich jedoch eine gewisse Übereinstimmung mit diesen von Kabouridis et al. (2015a): Die relative mRNA-Expression von S100 β in der MC zeigte sich in den konventionalisierten Tieren im Vergleich zu den gnotobiotischen Tieren deutlich erhöht. Zusätzlich zu den Beobachtungen von Kabouridis et al. (2015a) konnten wir den gleichen Effekt auch für GFAP in der MC, sowie für S100 β und GFAP in der ME feststellen. Wie oben genannt, repräsentiert die mRNA-Expression nicht den tatsächlichen Phänotyp auf Proteinebene (siehe **Kapitel 4.1**). Vorstellbar wäre, dass eine Veränderung bezüglich des glialen Phänotyps in der qPCR-Analyse früher als in der IHC-Analyse zu beobachten ist. Der immunhistochemisch beobachtbare Phänotyp könnte den Veränderungen in der mRNA-Expression zeitlich „nachhängen“. Möglicherweise würde eine längere Konventionalisierungstherapie ebenfalls zu messbaren Veränderungen in der IHC führen.

Weiterhin ist eine gesteigerte Gliamarker-mRNA nicht unbedingt gleichbedeutend mit einer EGC-Einwanderung bzw. -Proliferation. Die Gliamarker-Expression ist im Allgemeinen sehr dynamisch und kann sowohl räumlichen als auch zeitlichen Faktoren unterliegen. Diesbezüglich unterliegen EGC einer Plastizität, vermutlich auch noch in adulten Organismen. Insbesondere die GFAP-Expression kann sich im Rahmen einer reaktiven Gliose verändern (Boesmans et al., 2015). Eine gesteigerte Gliamarker-Expression als Ausdruck einer Gliazellaktivierung kann in EGC unter unterschiedlichen, insbesondere inflammatorischen Bedingungen beobachtet werden: In kultivierten Biopsien führte die

Stimulation mit LPS und Interferon- γ zur verstärkten S100 β -mRNA- und -Protein-Expression (Cirillo et al., 2009). Durch Stimulation kultivierter EGC mit IL-1 β , TNF- α oder LPS konnte eine Steigerung des Anteils der GFAP⁺ EGC beobachtet werden. Speziell für die Stimulation mit IL-1 β wurde gezeigt, dass dieser Effekt nicht durch eine verstärkte Zellproliferation erreicht wurde. Die Autoren erklärten den Effekt durch eine gesteigerte Proteinbiosynthese innerhalb der Zellen, nicht durch eine gesteigerte EGC-Zahl (von Boyen et al., 2004).

In einer anderen Publikation führte eine Ernährungsumstellung zu einem verstärkten GFAP⁺ EGC-Netzwerk, verbunden mit einer erhöhten S100 β -mRNA-Expression in der Mucosa. Hier wird eine Aktivierung der mucosalen EGC für wahrscheinlicher gehalten als eine Einwanderung neuer EGC (Liu et al., 2020). *In vitro* konnte ebenfalls eine gesteigerte GFAP-Expression durch Stimulation der EGC mit Nikotin oder ATP festgestellt werden (Cheadle et al., 2014; Schneider et al., 2021).

Insgesamt sprechen unsere Beobachtungen für einen mikrobiellen Einfluss auf die mRNA-Expression glialer Marker in adulten, gnotobiotisch aufgewachsenen Mäusen. Nicht geklärt ist an dieser Stelle, ob diese als Resultat einer Art Aktivierung vorhandener EGC oder als Resultat einer tatsächlich vermehrten Einwanderung glialer Zellen zu werten ist. Ergänzend zu Kabouridis et al. (2015a) konnten wir Veränderungen nicht nur in der MC, sondern auch in der ME beobachten.

4.3 MyD88-Abhängigkeit mEGC in adulten Mäusen

MyD88 ist ein Adaptermolekül in den Signaltransduktionswegen vieler TLR und IL-1-Rezeptoren (Frosali et al., 2015; Medzhitov et al., 1998). In MyD88^{-/-}-Mäusen sind diese Rezeptoren funktionslos. Verschiedene Zelltypen im Darm, wie Enterozyten und EGC, exprimieren TLR und können mikrobielle Bestandteile detektieren (Brun et al., 2013; Frosali et al., 2015). Die Rolle von MyD88 bzw. den TLR ist im Zusammenhang mit der EGC-Präsenz bisher noch nicht beschrieben worden. Der in Wildtypen beobachtete Effekt der gesteigerten Gliamarkerexpression durch Mikrobenkontakt (siehe **Kapitel 4.2**) blieb in den MyD88^{-/-}-Mäusen aus: Nach Konventionalisierung blieb die Expression der Gliamarker auf einem ähnlichen Level wie in den keimfreien Tieren. Aufschlussreich ist auch der Vergleich zwischen den beiden Genotypen im konventionalisierten Zustand: Die Expressionslevel der Gliamarker S100 β und GFAP liegen in den MyD88-defizienten Mäusen

sowohl in der ME als auch der MC deutlich niedriger als in den Wildtypen. Dies lässt die Schlussfolgerung einer MyD88- bzw. TLR-vermittelten Gliamarker-Aufregulation während der primären Darmbesiedlung in adulten Tieren zu. Alternativ wäre eine Vermittlung durch IL-1-Rezeptoren statt TLR denkbar, da diese ebenfalls über MyD88 signalisieren (Medzhitov et al., 1998).

Auch wenn die mEGC MyD88-abhängig auf das Darmmikrobiom reagieren, ist an dieser Stelle nicht bewiesen, ob die vermittelnden Rezeptoren (TLR bzw. IL-1-Rezeptoren) gliale Rezeptoren sind. Es wäre ebenso denkbar, dass ein anderer Zelltyp über TLR das Mikrobiom detektiert und den beobachteten Effekt in EGC indirekt vermittelt.

Auch ist hier nicht eindeutig, ob der MyD88-vermittelte Effekt auf einer vermehrten Migration bzw. Proliferation EGC oder einer Aktivierung vorhandener EGC beruht. Ein Zusammenhang zwischen EGC-Migration und MyD88 bzw. TLR wurde bisher nicht untersucht. Eine Mikrobiom- und TLR- bzw. MyD88-vermittelte Aktivierung der EGC wurde hingegen beschrieben: *In vitro* führte die Stimulation EGC mit bakteriellen Überständen zur vermehrten Expression verschiedener Inflammasom-Bestandteile (Yang et al., 2020). *In vitro* führte eine Stimulation EGC mit pathogenen Bakterien auch zu einer erhöhten S100 β -Expression (Turco et al., 2014). An anderer Stelle wurde eine verstärkte GFAP- und S100 β -Protein-Expression in Ratten-EGC durch systemische Applikation des TLR4-Liganden LPS nachgewiesen (da Cunha Franceschi et al., 2017). Des Weiteren sind MyD88-abhängige Verhalten von EGC gezeigt worden. So wurde eine gesteigerte GFAP- und S100 β -Expression nach Ernährungsumstellung als MyD88-abhängig deklariert (Liu et al., 2020). Auch Liganden der GDNF-Familie werden aus EGC MyD88-abhängig freigesetzt (Ibiza et al., 2016). Es wurde zudem eine MyD88-abhängige Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus EGC beobachtet (Turco et al., 2014).

4.4 Postnatale mEGC-Formation unter MyD88-Abhängigkeit

Kabouridis et al. (2015a) beschrieben die postnatale radiäre mEGC-Migration in die Mucosa immunhistochemisch. Uns ist es gelungen, diese in der Genexpressionsanalyse nachzuvollziehen: Innerhalb der ersten 15 postnatalen Tage kam es für S100 β und GFAP sowohl in der MC als auch in der ME zu einer deutlichen Steigerung der relativen mRNA-Expression. Auch wenn dies nicht beweisend für eine gesteigerte Präsenz der EGC ist, kann dies in Zusammenschau mit den histologischen Beobachtungen in der Mucosa von

Kabouridis et al. (2015a) vermutet werden. Cossais et al. (2016) beschrieben ebenfalls den Anstieg der GFAP- und S100 β -mRNA während der postnatalen Entwicklung. Sie unterschieden jedoch nicht zwischen MC und ME, sondern untersuchten die Darmwand im Ganzen. Sie nahmen als Ursache hierfür eine Proliferation der EGC und Progenitorzellen während der postnatalen Periode an (Cossais et al., 2016).

Auch wenn es an dieser Stelle nicht bewiesen ist: Wir vermuten, dass diese postnatale mEGC-Entwicklung mikrobiomabhängig ist, da sich die mikrobielle Darmbesiedlung ebenfalls in den ersten postnatalen Tagen grundlegend zu formen beginnt (Pantoja-Feliciano et al., 2013). Zudem haben Kabouridis et al. (2015a) die Mikrobiomabhängigkeit der primären EGC-Migration in die Mucosa bereits bewiesen.

Erstmalig wurde hier die Rolle von MyD88 in diesem Zusammenhang untersucht. Die postnatale EGC-Formation war auch in den MyD88^{-/-}-Mäusen nachzuvollziehen. Im Vergleich mit den Wildtypen fiel die Steigerung der S100 β - bzw. GFAP-Expression von P0 bis P15 in der Mucosa deutlich geringer aus. Vermutlich sind MyD88 bzw. TLR an der postnatalen Entwicklung des EGC-Netzwerkes vor allem in der Mucosa beteiligt, während sie in der Muscularis eine geringere Rolle spielen. Der Einfluss von MyD88 in der Mucosa scheint limitiert: Eine Steigerung der Gliamarker-mRNA konnte auch in MyD88^{-/-}-Mäusen nachvollzogen werden. Interessant wäre es zu beobachten, wie sich die Expression in MyD88^{-/-}-Mäusen nach Tag P15 bis zum Adulten entwickelt.

4.5 Potenzielle Mediatoren der postnatalen mEGC-Formation

Wir konnten während der postnatalen Entwicklung ähnliche Entwicklungen bei der Gliamarker-Expression in der Mucosa und der Expression von TLR5, IL-1R1, GDNF und IL-1 β feststellen. Für alle Gene konnte in WT eine Steigerung nach 15 Tagen gezeigt werden. Diese Steigerung fiel in den MyD88^{-/-}-Mäusen signifikant geringer aus oder es kam sogar zu einer Reduktion bei P15 im Vergleich zu P0. Für IL-1 α konnte bei P15 ebenfalls eine reduzierte Expression in MyD88^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT gezeigt werden. Ein möglicher kausaler Zusammenhang wird folgend diskutiert.

TLR2 kann verschiedene Bestandteile bakterieller Zellwände, wie Lipoproteine und Lipopeptide detektieren, TLR4 LPS und TLR5 Flagellin (Chow et al., 1999; Lien et al., 1999; Miao et al., 2007). Die TLR2- und TLR4-mRNA zeigten in unserer Genexpressionsanalyse eher keinen Zusammenhang mit der Entwicklung der Gliamarker. Anders verhielt

es sich mit der TLR5-mRNA: Sie variierte ähnlich wie die Gliamarker zuvor: Es zeigte sich eine signifikante Aufregulation bei P15 im Vergleich zu P0 in Wildtypen, der Effekt wurde durch die MyD88-Defizienz verhindert.

Regulationsmechanismen der TLR-Expressionen in EGC sind bisher nicht im Detail erforscht. In humanen EGC-Kulturen konnte eine veränderte mRNA-Expression verschiedener TLR durch Mikroben beobachtet werden. Diese Modulation hing von Bakterium, Stimulationsdauer und TLR-Typ ab (Turco et al., 2014). In neonatalen Mäusen wurde die TLR-mRNA-Expression im Darm bereits untersucht: Die Expression von TLR2, -4 und -5 wurde über 6 Monate postpartal gemessen. Zu Beginn stieg die Expression deutlich an. Die TLR5-mRNA-Expression in antibiotisch behandelten Tieren stellte sich niedriger dar (Dimmitt et al., 2010). Vermutlich stieg die TLR-mRNA-Expression in neonatalen Mäusen in Abhängigkeit der mikrobiellen Darmbesiedlung (Dimmitt et al., 2010). Ähnliches konnten wir für TLR5 in der Mucosa nachvollziehen. Fulde et al. (2018) legten vergleichbare Beobachtungen bezüglich TLR5 in den intestinalen Epithelzellen dar. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die TLR- (bzw. MyD88-) Aktivierung durch Mikroben zu einer verstärkten TLR5- und Gliamarkerexpression führt. Ob eine TLR5-Aktivierung kausal für eine vermehrte Gliamarkerexpression verantwortlich ist, ließe sich beispielsweise durch Untersuchungen in TLR5^{-/-}-Mäusen weiter verifizieren. Weitere Untersuchungen sind ebenfalls nötig, um den bzw. die TLR5-exprimierenden Zelltypen zu bestimmen. Hierfür würden sich beispielsweise Untersuchungen der Gliamarker-mRNA in Mäusen eignen, bei denen die TLR5-Expression selektiv in den Enterozyten (z.B. Villin-Cre^{+/-}/TLR5^{fl/fl}-Mäuse) oder EGC (z.B. GFAP-Cre^{+/-}/TLR5^{fl/fl}-Mäuse) verhindert würde.

IL-1 ist ein unspezifisches, proinflammatorisches Zytokin. Es wird bei Gewebsverletzung, Erkennung pathogener Strukturen, Zellalterung oder Nekroptose freigesetzt (Garlanda et al., 2013).

IL-1 α wird im Darm eher von Epithelzellen bei Nekrose freigesetzt. Es gilt eher als ein Marker steriler Entzündungen (Garlanda et al., 2013). Wir beobachteten eine reduzierte IL-1 α -Expression in MyD88^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt P15.

IL-1 β wird vor allem von Zellen des unspezifischen Immunsystems produziert (Garlanda et al., 2013; Lopez-Castejon und Brough, 2011). Ein Anstieg der IL-1 β -Expression ist ein unspezifischer Inflammationsmarker. Hier könnte die sich postnatal aufbauende Darmflora zur IL-1 β -Freisetzung führen. So ließe sich der IL-1 β -Anstieg in WT bei P15 im

Vergleich zu P0 erklären. Unsere Arbeitsgruppe wies bereits nach, dass die intestinale IL-1 β -Expression im Rahmen des postoperativen Ileus mikrobiomabhängig erfolgt (Hupa et al., 2019). Da die IL-1 β -Expression bei MyD88^{-/-}-Mäusen bei P15 geringer ausfiel, scheint dieser mikrobielle Reiz durch MyD88 bzw. TLR vermittelt zu werden.

IL-1 β kann an IL-1R1 binden (Garlanda et al., 2013; Sims et al., 1994). EGC besitzen den IL-1R1 (Stoffels et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe wies im Rahmen des postoperativen Ileus bereits eine reaktive Gliose EGC durch IL-1 β nach (Schneider et al., 2022; Stoffels et al., 2014). Den Großteil an IL-1R1-exprimierenden Zellen bilden im Colon jedoch fibroblastische Retikulumzellen und auch Endothelzellen exprimieren im Colon IL-1R1 (Song et al., 2018).

Auch wurde die GDNF-mRNA-Expression im Rahmen der postnatalen Entwicklung untersucht. Bekanntlich fördert es in der Embryonalentwicklung die Proliferation und das Überleben der ENCC. Als Chemoattraktant fördert es die Migration der ENCC (Nagy und Goldstein, 2017; Pawolski und Schmidt, 2020). Wir konnten eine erhöhte GDNF-mRNA-Expression während der postnatalen Entwicklung beobachten. Im Allgemeinen werden Liganden der GDNF-Familie bei einer Inflammation vermehrt exprimiert (Morel et al., 2020). Im Speziellen fördern proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α , IL-33 sowie die Aktivierung von TLR die Freisetzung von GDNF aus EGC (Ibiza et al., 2016; von Boyen et al., 2006). Für eine TLR- bzw. IL-1R- vermittelte GDNF-Freisetzung spricht auch die von uns beobachtete verminderte GDNF-Expression in MyD88^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt P15.

Neben den Gliazellen können auch andere Zelltypen GDNF sezernieren: Im Darm wird GDNF hauptsächlich von glatten Muskelzellen produziert (Brun et al., 2015). Wir betrachteten in dieser Forschungsarbeit die GDNF-mRNA-Expression in der Mucosa. Auch können in der Mucosa liegende Fibroblasten GDNF sezernieren (Esseghir et al., 2007). Zudem kommen Zellen des Immunsystems für eine GDNF-Expression grundsätzlich in Frage: Mikroglia und Makrophagen können ebenfalls GDNF freisetzen (Cavel et al., 2012; Hashimoto et al., 2005).

Letztlich kann hier nur vermutet werden, dass die GDNF-mRNA in der Mucosa den EGC zuzuordnen ist. Eine genauere Zuordnung der GDNF-Quelle könnte ebenfalls durch die Verwendung von RiboTag-Mäusen erfolgen (Sanz et al., 2009).

Zu klären ist die Bedeutung von GDNF für die postnatale Formation der EGC. GDNF könnte als Stimulus für die Entwicklung des EGC-Netzwerkes wirken und als Chemoattraktant weitere EGC zur Migration in die Mucosa anregen. Zumal GDNF für die Migration der ENS-Vorläuferzellen in der Embryonalentwicklung essenziell ist (Uesaka et al., 2013). EGC ähneln diesen Vorläuferzellen, auch im adulten ENS noch (Joseph et al., 2011). Demnach könnte GDNF nicht nur die postnatale Entwicklung, sondern auch die lebenslange Regeneration des EGC-Netzwerkes stimulieren.

Folgende Hypothese wird vorgeschlagen: Postnatal kommt es zu einer mikrobiellen Besiedlung des Darms. Dies fördert die TLR5-Expression. Das intestinale Mikrobiom aktiviert TLR. Dadurch kommt es zur vermehrten Freisetzung von IL-1 und GDNF. Diese fördern die Gliamarkereexpression, entweder im Rahmen einer verstärkten Proliferation/Migration oder EGC-Aktivierung. Zu beachten ist: Hier wurden ähnliche Muster in der mRNA-Expression entsprechender Gene beobachtet und daher ein mechanistischer Zusammenhang vermutet. Allein auf dieser Grundlage ist jedoch kein kausaler Zusammenhang bewiesen. Weitere Versuche wären notwendig, um diese Hypothese zu untersuchen. Vermutlich ist ein Konstrukt aus verschiedenen Mediatoren für die postnatale mEGC-Formation verantwortlich.

Kritisch anzumerken ist, dass sich die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse fast ausschließlich auf qPCR-Ergebnisse stützen. Um diese zu verifizieren, wäre es notwendig, diese mittels eines geeigneten anderen Untersuchungsverfahrens zu prüfen.

5. Zusammenfassung

Enterische Gliazellen (EGC) sind im Darm an Peristaltik, Neuroprotektion sowie Inflammation beteiligt und tragen somit eine maßgebliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase.

EGC migrieren postnatal aus dem myenterischen und submukösen Plexus in die Mucosa und bilden die Gruppe der mucosalen EGC (mEGC). Lebenslang wird diese Population aus ständig einwandernden neuen Zellen regeneriert. Es wurde eine Abhängigkeit der postnatalen sowie der lebenslang stattfindenden Migration vom luminalen Mikrobiom beschrieben. Der vermittelnde Mechanismus ist bisher unbekannt. Da EGC verschiedene Toll-Like Rezeptoren (TLR) besitzen und diese bekannterweise mikrobielle Bestandteile detektieren, postulierten wir eine TLR-vermittelte Interaktion. Ziel unserer Studie war es, die Rolle des intrazellulären *Downstream*-Adapters MyD88, welcher an der Signaltransduktion fast aller TLR beteiligt ist, auf die Entwicklung der mEGC zu studieren. Wir untersuchten das EGC-Netzwerk in antibiotisch behandelten, gnotobiotischen sowie konventionalisierten adulten Mäuse mittels Immunhistochemie und Genexpressionsanalyse. Konventionalisierung bedeutet hier die nachträgliche mikrobielle Darmbesiedlung gnotobiotisch aufgewachsener Tiere. Zudem untersuchten wir dabei die Rolle von MyD88. Hierbei verglichen wir gnotobiotische und konventionalisierte adulte MyD88^{-/-}-Mäuse. Zusätzlich stellten wir die postnatale EGC-Migration anhand einer Genexpressionsanalyse in neonatalen Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen dar.

Nach dreiwöchiger Antibiosebehandlung adulter Tiere konnten wir in beiden Analysen keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu naiven Tieren nachweisen. Dies spricht gegen eine Mikrobiomabhängigkeit der Einwanderung neuer mEGC im Adulten.

Bei der Untersuchung gnotobiotischer bzw. konventionalisierter Tiere zeigte die IHC keine Unterschiede bezüglich der mEGC. Die Genexpressionsanalyse hingegen ergab verminderte Gliamarker-mRNA in gnotobiotischen Wildtypmäusen und eine Steigerung dieser durch Konventionalisierung. Dieser Anstieg fehlte in MyD88^{-/-}-Mäusen, hinweisend auf eine TLR-Abhängigkeit der initialen mEGC-Formation.

In neonatalen Mäusen gelang uns der Nachweis postnatal ansteigender Gliamarker in der Genexpressionsanalyse. Vermutlich ist dies durch eine vermehrte EGC-Einwanderung in die Mucosa bedingt. Dieser Anstieg war in der Mucosa von MyD88^{-/-}-Mäusen stark

reduziert. Die GDNF-, TLR5- und IL-1R1-mRNA-Expressionen zeigten ähnliche Entwicklungen und lassen vorsichtig vermuten, dass diese die Präsenz und gegebenenfalls Aktivierung mEGC in der frühen postnatalen Phase mitbestimmen.

Zusammenfassend stehen unsere Beobachtungen in konventionalisierten adulten und neonatalen Tieren in Einklang mit einer Mikrobiom- und MyD88-Abhängigkeit der mEGC-Präsenz nach Geburt. Die genauen Mechanismen erfordern weitere Studien.

6. Literaturverzeichnis

Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, Galmiche JP, Vanden Berghe P, Neunlist M, Lardeux B. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* 2010; 24: 1082-1094.

Anitha M, Vijay-Kumar M, Sitaraman SV, Gewirtz AT, Srinivasan S. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology.* 2012; 143: 1006-1016.

Bach-Ngohou K, Mahé MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M, Masson D. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol.* 2010; 588: 2533-2544.

Baghdadi MB, Ayyaz A, Coquenlorge S, Chu B, Kumar S, Streutker C, Wrana JL, Kim TH. Enteric glial cell heterogeneity regulates intestinal stem cell niches. *Cell Stem Cell.* 2022; 29: 86-100.e6.

Barajon I, Serrao G, Arnaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsari A, Rumio C. Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57: 1013-1023.

Bassotti G, Villanacci V, Nascimbeni R, Cadei M, Fisogni S, Antonelli E, Corazzi N, Salerni B. Enteric neuroglial apoptosis in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis.* 2009; 3: 264-270.

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

Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett.* 2006; 396: 67-72.

Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 2001; 15: 66-78.

Brun P, Giron MC, Qesari M, Porzionato A, Caputi V, Zoppellaro C, Banzato S, Grillo AR, Spagnol L, De Caro R, Pizzuti D, Barbieri V, Rosato A, Sturniolo GC, Martines D, Zaninotto G, Palù G, Castagliuolo I. Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 2013; 145: 1323-1333.

Brun P, Gobbo S, Caputi V, Spagnol L, Schirato G, Pasqualin M, Levorato E, Palù G, Giron MC, Castagliuolo I. Toll like receptor-2 regulates production of glial-derived neurotrophic factors in murine intestinal smooth muscle cells. *Mol Cell Neurosci.* 2015; 68: 24-35.

Burns AJ, Le Douarin NM. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development.* 1998; 125: 4335-4347.

Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell.* 1998; 93: 189-201.

Bush TG. Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? *BioEssays.* 2002; 24: 130-140.

Caputi V, Marsilio I, Filpa V, Cerantola S, Orso G, Bistoletti M, Paccagnella N, De Martin S, Montopoli M, Dall'Acqua S, Crema F, Di Gangi IM, Galuppini F, Lante I, Bogialli S, Rugge M, Debetto P, Giaroni C, Giron MC. Antibiotic-induced dysbiosis of the microbiota impairs gut neuromuscular function in juvenile mice. *Br J Pharmacol.* 2017; 174: 3623-3639.

Cavel O, Shomron O, Shabtay A, Vital J, Trejo-Leider L, Weizman N, Krelin Y, Fong Y, Wong RJ, Amit M, Gil Z. Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor. *Cancer Res.* 2012; 72: 5733-5743.

Cheadle GA, Costantini TW, Bansal V, Eliceiri BP, Coimbra R. Cholinergic signaling in the gut: a novel mechanism of barrier protection through activation of enteric glia cells. *Surg Infect (Larchmt).* 2014; 15: 387-393.

Chow AK, Grubišić V, Gulbransen BD. Enteric Glia Regulate Lymphocyte Activation via Autophagy-Mediated MHC-II Expression. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021; 12: 1215-1237.

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999; 274: 10689-10692.

Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Grosso M, Petruzzelli R, Izzo P, Calì G, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Iuvone T, Steardo L, Cuomo R. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21: 1209-e112.

Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM, Derkinderen P. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2014; 130: 805-815.

Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest.* 2004; 84: 282-291.

Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2014; 26: 98-107.

Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 13306-13311.

Cossais F, Durand T, Chevalier J, Boudaud M, Kermarrec L, Aubert P, Neveu I, Naveilhan P, Neunlist M. Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016; 310: G941-951.

Da Cunha Franceschi R, Nardin P, Machado CV, Tortorelli LS, Martinez-Pereira MA, Zanotto C, Gonçalves CA, Zancan DM. Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. *Neurosci Res.* 2017;119: 15-23.

De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, Bäckhed F. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115: 6458-6463.

Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Coron E, Bruley des Varannes S, Naveilhan P, Nguyen JM, Neunlist M, Derkinderen P. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2013; 50: 42-48.

Dimmitt RA, Staley EM, Chuang G, Tanner SM, Soltau TD, Lorenz RG. Role of postnatal acquisition of the intestinal microbiome in the early development of immune function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 51: 262-273.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 11971-11975.

Dora D, Ferenczi S, Stavely R, Toth VE, Varga ZV, Kovacs T, Bodi I, Hotta R, Kovacs KJ, Goldstein AM, Nagy N. Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and Its Macrophage-

Dependent Degradation During Murine Colitis: Implications in Enteric Neuroinflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021; 12: 1617-1641.

Drokhlyansky E, Smillie CS, Van Wittenberghe N, Ericsson M, Griffin GK, Eraslan G, Dionne D, Cuoco MS, Goder-Reiser MN, Sharova T, Kuksenko O, Aguirre AJ, Boland GM, Graham D, Rozenblatt-Rosen O, Xavier RJ, Regev A. The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell.* 2020; 182: 1606-1622.e23.

Enderes, J, Neuhaus H, Basic M, Schneiker B, Lysson M, Kalff JC, Wehner S. Microbiota-dependent presence of murine enteric glial cells requires myeloid differentiation primary response protein 88 signaling. *J Biosci.* 2023; 48:3.

Esseghir S, Todd SK, Hunt T, Poulosom R, Plaza-Menacho I, Reis-Filho JS, Isacke CM. A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 11732-11741.

Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.* 2015; 2015: 489821.

Fulde M, Sommer F, Chassaing B, van Vorst K, Dupont A, Hensel M, Basic M, Klopffleisch R, Rosenstiel P, Bleich A, Bäckhed F, Gewirtz AT, Hornef MW. Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition. *Nature.* 2018; 560: 489-493.

Gabella G. Glial cells in the myenteric plexus. *Z Naturforsch B.* 1971; 26: 244-245.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013; 39: 1003-1018.

Ge X, Ding C, Zhao W, Xu L, Tian H, Gong J, Zhu M, Li J, Li N. Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *J Transl Med.* 2017; 15: 13.

Geng ZH, Zhu Y, Li QL, Zhao C, Zhou PH. Enteric Nervous System: The Bridge Between the Gut Microbiota and Neurological Disorders. *Front Aging Neurosci.* 2022; 14: 810483.

Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Campieri M. Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15: 489-493.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001; 25: 386-401.

Gmitro AF, Aziz D. Confocal microscopy through a fiber-optic imaging bundle. *Opt Lett.* 1993; 18: 565.

Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy.* 2013; 43: 198-211.

Graham KD, López SH, Sengupta R, Shenoy A, Schneider S, Wright CM, Feldman M, Furth E, Valdivieso F, Lemke A, Wilkins BJ, Naji A, Doolin EJ, Howard MJ, Heuckeroth RO. Robust, 3-Dimensional Visualization of Human Colon Enteric Nervous System Without Tissue Sectioning. *Gastroenterology.* 2020;158: 2221-2235.e5.

Grubišić V, Gulbransen BD. Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol.* 2017; 595: 557-570.

Grubišić V, Gulbransen BD. Astrocyte Cell Surface Antigen 2 and Other Potential Cell Surface Markers of Enteric glia in the Mouse Colon. *ASN Neuro.* 2022; 14: 17590914221083203.

Grubišić V, McClain JL, Fried DE, Grants I, Rajasekhar P, Csizmadia E, Ajjola OA, Watson RE, Poole DP, Robson SC, Christofi FL, Gulbransen BD. Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. *Cell Rep.* 2020;32: 108100.

Grundmann D, Loris E, Maas-Omlor S, Huang W, Scheller A, Kirchhoff F, Schäfer KH. Enteric Glia: S100, GFAP, and Beyond. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019; 302: 1333-1344.

Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*. 2007; 92: 64-66.

Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9: 625-632.

Gulbransen, BD. Enteric Glia. *Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine: from Physiology to Disease* 2014; 1: 1–70.

Guyer RA, Stavely RS, Robertson K, Bhave S, Hotta R, Kaltschmidt JA, Goldstein AM, Single-Cell Multiome Sequencing Clarifies Enteric Glial Cell Diversity and Identifies an Intraganglionic Population Poised for Neurogenesis. *bioRxiv* 2021.

Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S. Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J Neurosci Res*. 2005; 79: 476-487.

Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2014; 49: 681-689.

Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K, Rühl A. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol*. 2008; 509: 356-371.

Hugenholtz F, de Vos WM. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75: 149-160.

Hung LY, Boonma P, Unterweger P, Parathan P, Haag A, Luna RA, Bornstein JC, Savidge TC, Foong JPP. Neonatal Antibiotics Disrupt Motility and Enteric Neural Circuits in Mouse Colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019; 8: 298-300.e6.

Hung LY, Parathan P, Boonma P, Wu Q, Wang Y, Haag A, Luna RA, Bornstein JC, Savidge TC, Foong JPP. Antibiotic exposure postweaning disrupts the neurochemistry and function of enteric neurons mediating colonic motor activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020; 318: G1042-G1053.

Hupa KJ, Stein K, Schneider R, Lysson M, Schneiker B, Hornung V, Latz E, Iwakura Y, Kalff JC, Wehner S. AIM2 inflammasome-derived IL-1 β induces postoperative ileus in mice. *Sci Rep.* 2019; 9: 10602.

Ibiza S, García-Cassani B, Ribeiro H, Carvalho T, Almeida L, Marques R, Misic AM, Bartow-McKenney C, Larson DM, Pavan WJ, Eberl G, Grice EA, Veiga-Fernandes H. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature.* 2016; 535: 440-443.

Jacobson A, Yang D, Vella M, Chiu IM. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol.* 2021; 14: 555-565.

Joseph NM, He S, Quintana E, Kim YG, Núñez G, Morrison SJ. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin Invest.* 2011; 121: 3398-3411.

Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert HJ, Clevers H, Pettersson S, Pachnis V. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron.* 2015a; 85: 289-295.

Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert HJ, Clevers H, Pettersson S, Pachnis V. The gut microbiota keeps enteric glial cells on the move; prospective roles of the gut epithelium and immune system. *Gut Microbes.* 2015b; 6: 398-403.

Klein J, Schneider R, Wehner S, Schäfer N, Kalff J, von Websky M. The Role of Enteric Glia Cells in Intestinal Regeneration After Mesenteric Ischemia and Reperfusion. *Transplantation.* 2017; 101: 26-27.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 4578-4585.

Kovler ML, Gonzalez Salazar AJ, Fulton WB, Lu P, Yamaguchi Y, Zhou Q, Sampah M, Ishiyama A, Prindle T Jr, Wang S, Jia H, Wipf P, Sodhi CP, Hackam DJ. Toll-like receptor 4-mediated enteric glia loss is critical for the development of necrotizing enterocolitis. *Sci Transl Med.* 2021;13: eabg3459.

Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002; 35: 657-669.

Kulkarni S, Micci MA, Leser J, Shin C, Tang SC, Fu YY, Liu L, Li Q, Saha M, Li C, Enikolopov G, Becker L, Rakhilin N, Anderson M, Shen X, Dong X, Butte MJ, Song H, Southard-Smith EM, Kapur RP, Bogunovic M, Pasricha PJ. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114: E3709-E3718.

Lake JI, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013; 305: G1-24.

Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N, Richardson W, Potocnik A, Vanden Berghe P, Pachnis V. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest*. 2011; 121: 3412-3424.

Le Berre-Scoul C, Chevalier J, Oleynikova E, Cossais F, Talon S, Neunlist M, Boudin H. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol*. 2017; 595: 583-598.

Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1973; 30: 31-48.

Leven P, Schneider R, Siemens KD, Jackson WS, Wehner S. Application of a RiboTag-based approach to generate and analyze mRNA from enteric neural cells. *Neurogastroenterol. Motil*. 2022; 34: e14309.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem*. 1999; 274: 33419-33425.

Liu Z, Sun H, Liang M, Gao J, Meng L, Zheng X, Wei Y, Kou Y, Wang Y. Enteric glial cells respond to a dietary change in the lamina propria in a MyD88-dependent manner. *bioRxiv* 2020; 1-29.

Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22: 189-195.

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012; 489: 220-230.

MacEachern SJ, Patel BA, Keenan CM, Dicay M, Chapman K, McCafferty DM, Savidge TC, Beck PL, MacNaughton WK, Sharkey KA. Inhibiting Inducible Nitric Oxide Synthase in Enteric Glia Restores Electrogenic Ion Transport in Mice With Colitis. *Gastroenterology*. 2015;149: 445-55.e3.

Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009; 583: 3966-3973.

Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B*. 2010; 180: 591-598.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998; 2: 253-258.

Meir M, Kannapin F, Diefenbacher M, Ghoreishi Y, Kollmann C, Flemming S, Germer CT, Waschke J, Leven P, Schneider R, Wehner S, Burkard N, Schlegel N. Intestinal Epithelial Barrier Maturation by Enteric Glial Cells Is GDNF-Dependent. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 1887.

Metzger M, Bareiss PM, Danker T, Wagner S, Hennenlotter J, Guenther E, Obermayr F, Stenzl A, Koenigsrainer A, Skutella T, Just L. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology*. 2009; 137: 2063-2073.e4.

Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*. 2007; 29: 275-288.

Morel L, Domingues O, Zimmer J, Michel T. Revisiting the Role of Neurotrophic Factors in Inflammation. *Cells*. 2020; 9: 865.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 51: 263-273.

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

Nasser Y, Fernandez E, Keenan CM, Ho W, Oland LD, Tibbles LA, Schemann M, MacNaughton WK, Rühl A, Sharkey KA. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: G912-927.

Natarajan D, Grigoriou M, Marcos-Gutierrez CV, Atkins C, Pachnis V. Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture. *Development.* 1999; 126: 157-168.

Neu J, Walker WA. Necrotizing Enterocolitis. *N Engl J Med.* 2011; 364: 255-264.

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Rühl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292: G231-241.

Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, De Giorgio R. Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology.* 2014; 147: 1230-1237.

Obata Y, Castaño Á, Boeing S, Bon-Frauches AC, Fung C, Fallesen T, de Agüero MG, Yilmaz B, Lopes R, Huseynova A, Horswell S, Maradana MR, Boesmans W, Vanden Berghe P, Murray AJ, Stockinger B, Macpherson AJ, Pachnis V. Neuronal programming by microbiota regulates intestinal physiology. *Nature.* 2020; 578: 284-289.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007; 5: e177.

Pantoja-Feliciano IG, Clemente JC, Costello EK, Perez ME, Blaser MJ, Knight R, Dominguez-Bello MG. Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *ISME J.* 2013; 7: 1112-1115.

Parathan P, Wang Y, Leembruggen AJ, Bornstein JC, Foong JP. The enteric nervous system undergoes significant chemical and synaptic maturation during adolescence in mice. *Dev Biol.* 2020; 458: 75-87.

Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development*. 2001;128: 3949-3961.

Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, Lin PW. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol*. 2012; 180: 626-635.

Pawolski V, Schmidt MHH. Neuron-Glia Interaction in the Developing and Adult Enteric Nervous System. *Cells*. 2020; 10: 47.

Pochard C, Coquenlorge S, Freyssinet M, Naveilhan P, Bourreille A, Neunlist M, Rollinkinderen M. The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018; 315: G1-G11.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118: 229-241.

Rao M, Nelms BD, Dong L, Salinas-Rios V, Rutlin M, Gershon MD, Corfas G. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*. 2015; 63: 2040-2057.

Rao M, Rastelli D, Dong L, Chiu S, Setlik W, Gershon MD, Corfas G. Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology*. 2017; 153: 1068-1081.e7.

Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, McCoy KD, Macpherson AJ, Meza-Zepeda LA, Johansen FE. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One*. 2011; 6: e17996.

Rosenberg HJ, Rao M. Enteric glia in homeostasis and disease: From fundamental biology to human pathology. *iScience*. 2021; 24: 102863.

Rothman TP, Tennyson VM, Gershon MD. Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice. *J Comp Neurol*. 1986; 252: 493-506.

Sanz E, Yang L, Su T, Morris DR, McKnight GS, Amieux PS. Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 13939-13944.

Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1344-1358.

Schneider R, Leven P, Glowka T, Kuzmanov I, Lysson M, Schneiker B, Miesen A, Baqi Y, Spanier C, Grants I, Mazzotta E, Villalobos-Hernandez E, Kalff JC, Müller CE, Christofi FL, Wehner S. A novel P2X2-dependent purinergic mechanism of enteric gliosis in intestinal inflammation. *EMBO Mol Med*. 2021;13: e12724.

Schneider R, Leven P, Mallesh S, Breßer M, Schneider L, Mazzotta E, Fadda P, Glowka T, Vilz TO, Lingohr P, Kalff JC, Christofi FL, Wehner S. IL-1-dependent enteric gliosis guides intestinal inflammation and dysmotility and modulates macrophage function. *Commun Biol*. 2022; 5: 811.

Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994; 72: 9-14.

Song A, Zhu L, Gorantla G, Berdysz O, Amici SA, Guerau-de-Arellano M, Madalena KM, Lerch JK, Liu X, Quan N. Salient type 1 interleukin 1 receptor expression in peripheral non-immune cells. *Sci Rep*. 2018; 8: 723.

Spear ET, Holt EA, Joyce EJ, Haag MM, Mawe SM, Hennig GW, Lavoie B, Applebee AM, Teuscher C, Mawe GM. Altered gastrointestinal motility involving autoantibodies in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neurogastroenterol Motil*. 2018; 30: e13349.

Stakenborg M, Abdurahiman S, De Simone V, Goverse G, Stakenborg N, van Baarle L, Wu Q, Pirottin D, Kim JS, Chappell-Maor L, Pintelon I, Thys S, Pollenus E, Boon L, Van den Steen P, Hao M, Van Ginderachter JA, Boeckxstaens GE, Timmermans JP, Jung S, Marichal T, Ibiza S, Matteoli G. Enteric glial cells favor accumulation of anti-inflammatory macrophages during the resolution of muscularis inflammation. *Mucosal Immunol*. 2022; 15: 1296-1308.

Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G, Reinshagen M. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003; 124: 1748-1757.

Steinkamp M, Gundel H, Schulte N, Spaniol U, Pflueger C, Zizer E, von Boyen GB. GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12: 1-8.

Stoffels B, Hupa KJ, Snoek SA, van Bree S, Stein K, Schwandt T, Vilz TO, Lysson M, Veer CV, Kummer MP, Hornung V, Kalff JC, de Jonge WJ, Wehner S. Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology*. 2014; 146: 176-187.e1.

Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, Roehl KA, Nelson DM, Macones GA, Mysorekar IU. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 208: 226.e1-7.

Târtea EA, Florescu C, Donoiu I, Pirici D, Mihailovici AR, Albu VC, Bălşeanu TA, Iancău M, Badea CD, Vere CC, Sfredel V. Implications of inflammation and remodeling of the enteric glial cells in colorectal adenocarcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2017; 58: 473-480.

Touvron M, Wieland AB, Chloe LM, Hattenhauer RA, Van Landeghem L. Enteric glial cells of the two plexi of the enteric nervous system exhibit phenotypic and functional inter- and intra-heterogeneity. *bioRxiv* 2022; 1-33.

Turco F, Sarnelli G, Cirillo C, Palumbo I, De Giorgi F, D'Alessandro A, Cammarota M, Giuliano M, Cuomo R. Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut*. 2014; 63: 105-115.

Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J Neurosci*. 2013; 33: 16372-16382.

Valès S, Bacola G, Biraud M, Touvron M, Bessard A, Geraldo F, Dougherty KA, Lashani S, Bossard C, Flamant M, Duchalais E, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Oliver L, Neunlist

M, Vallette FM, Van Landeghem L. Tumor cells hijack enteric glia to activate colon cancer stem cells and stimulate tumorigenesis. *EBioMedicine*. 2019; 49:172-188.

Valès S, Touvron M, Van Landeghem L. Enteric glia: Diversity or plasticity? *Brain Res*. 2018; 1693: 140-145.

Van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, Savidge T, Neunlist M. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300: G976-987.

Van Landeghem L, Mahé MM, Teusan R, Léger J, Guisle I, Houlgatte R, Neunlist M. Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics*. 2009; 10: 507.

Vicentini FA, Keenan CM, Wallace LE, Woods C, Cavin JB, Flockton AR, Macklin WB, Belkind-Gerson J, Hirota SA, Sharkey KA. Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. *Microbiome*. 2021; 9: 210.

Von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut*. 2004; 53: 222-228.

Von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12: 346-354.

Wang T, Cui Y, Jin J, Guo J, Wang G, Yin X, He QY, Zhang G. Translating mRNAs strongly correlate to proteins in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: 4743-4754.

Wostmann B, Bruckner-Kardoss E. Development of cecal distention in germ-free baby rats. *Am J Physiol*. 1959; 197: 1345-1346.

Wunsch M, Jabari S, Voussen B, Enders M, Srinivasan S, Cossais F, Wedel T, Boettner M, Schwarz A, Weyer L, Göcer O, Schroeter M, Maeurer M, Woenckhaus M, Pollok K, Radbruch H, Klotz L, Scholz CJ, Nickel J, Friebe A, Addicks K, Ergün S, Lehmann PV,

Kuerten S. The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2017;134: 281-295.

Yang PC, Li XJ, Yang YH, Qian W, Li SY, Yan CH, Wang J, Wang Q, Hou XH, Dai CB. The Influence of *Bifidobacterium bifidum* and *Bacteroides fragilis* on Enteric Glial Cell-Derived Neurotrophic Factors and Inflammasome. *Inflammation.* 2020; 43: 2166-2177.

Yarandi SS, Kulkarni S, Saha M, Sylvia KE, Sears CL, Pasricha PJ. Intestinal Bacteria Maintain Adult Enteric Nervous System and Nitroergic Neurons via Toll-like Receptor 2-induced Neurogenesis in Mice. *Gastroenterology.* 2020; 159: 200-213.e8.

Young HM, Bergner AJ, Müller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol.* 2003 Jan; 456: 1-11.

Yuan R, Bhattacharya N, Kenkel JA, Shen J, DiMaio MA, Bagchi S, Prestwood TR, Habtezion A, Engleman EG. Enteric Glia Play a Critical Role in Promoting the Development of Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2020; 10: 595892.

Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, van der Zwan J, Häring M, Braun E, Borm LE, La Manno G, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J, Arenas E, Ernfors P, Marklund U, Linnarsson S. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell.* 2018; 174: 999-1014.e22.

Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui DJ, Xie Q, Huang XL, Gan HT. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol.* 2010; 222: 213-222.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progenitorzellen des Enterischen Nervensystems können sich zu Enterischen Gliazellen und Neuronen differenzieren und verändern dabei die Expression verschiedener Marker.	16
Abbildung 2: Postnatale Entwicklung des murinen Darmmikrobioms in Anlehnung an Pantoja-Feliciano et al. (2013)	25
Abbildung 3: Villus-Krypt-Einheit.	38
Abbildung 4: Eradikation des Mikrobioms durch Antibiosebehandlung.	46
Abbildung 5: Destruktion der Zottenstruktur in antibiotisch behandelten Tieren.	47
Abbildung 6: Der Anteil Glia ⁺ VKE ist in antibiotisch behandelten Tieren erhöht.	47
Abbildung 7: Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP sowie des neurotrophen Faktors GDNF in der Mucosa (A-C) und der Muscularis externa (D-F) nach Vehikel- (CTL) und Antibiosebehandlung (AB).	48
Abbildung 8: Proteinexpression von S100 β (A), SOX-10 (B) und des <i>Housekeeping</i> -Proteins β -Aktin in der Muscularis externa (ME) nach Vehikel- (CTL) und Antibiose-Behandlung (AB).	50
Abbildung 9: Konventionalisierung verändert nicht den mEGC-Phänotyp in Wildtypmäusen.	52
Abbildung 10: Konventionalisierung verändert nicht den mEGC-Phänotyp in MyD88 ^{-/-} -Mäusen.	53
Abbildung 11: Der Anteil Glia ⁺ VKE ist in konventionalisierten MyD88 ^{-/-} -Mäusen erhöht.	54
Abbildung 12: Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP in der Mucosa (A, B) und der Muscularis externa (C,D) in gnotobiotischen (GF) und konventionalisierten (CONV-D) Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).	55
Abbildung 13: Expression der Gliazellmarker S100 β und GFAP in der Mucosa (A, B) und der Muscularis externa (C,D) in neonatalen Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 in Wildtyp- und MyD88 ^{-/-} -Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).	58
Abbildung 14: Expression von TLR2 (A), TLR4 (B), TLR5 (C) und IL-1R1 (D) in der Mucosa in neonatalen Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 in Wildtyp- (WT) und MyD88 ^{-/-} -Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).	60

Abbildung 15: Expression von GDNF (A), IL-1 α (B) und IL-1 β (C) in der Mucosa in neonatalen Mäusen zu den Zeitpunkten P0 und P15 in Wildtyp- und MyD88^{-/-}-Mäusen (modifiziert nach Enderes et al., 2023).62

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gliazellmarker und GDNF im Vergleich.....	20
Tabelle 2: Herkunft, Sequenzen, bzw. ID-Nummern der bei der q-RT-PCR verwendeten Primer bzw. Sonden.....	40

9. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe Wehner für die jahrelange Unterstützung. Mit dieser hat mir das Arbeiten im Labor immer viel Freude bereitet. Ihre wertvollen Ratschläge haben mir die Arbeit oft erleichtert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Wehner für die interessante Aufgabenstellung. Mit enterischen Gliazellen hatte ich mich vor dieser Promotionsarbeit nicht auseinandergesetzt und ihre Bedeutsamkeit unterschätzt. Ich bedanke mich zudem für das Vertrauen, an diesem Projekt teilnehmen und Verantwortung hierfür übernehmen zu dürfen sowie für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Mein Dank gilt auch besonders meiner Betreuerin Dr. med. Jana Enderes für die Unterstützung in diesem Projekt in allen Belangen, von der Einarbeitung im Labor bis hin zur Ergebnisauswertung. Ich schätze sehr die ständige Erreichbarkeit und die Hilfe bei Fragen oder Problemen.

Ich möchte mich auch bei unseren Technischen Assistentinnen und Assistenten Frau Mariola Lysson, Frau Bianca Schneiker und Herrn Patrik Efferz bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre der Arbeitsaufwand für mich kaum zu schaffen gewesen. Danke für die freundliche und herzliche Art.

Danke auch an Herrn Dr. rer. nat. Reiner Schneider und Herrn Patrick Leven für ihre freundliche Unterstützung im Labor. Das Teilen ihrer Erfahrungen hat mir vieles vereinfacht.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik anfertigen zu dürfen.

Zuletzt möchte ich mich sehr bei BONFOR für die wissenschaftliche Lehre und die finanzielle Unterstützung bedanken. Ohne diese wäre mir die Durchführung dieses Projektes in diesem Ausmaß nicht möglich gewesen.