

Aus dem Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Leiter: O.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Mathias Müller)

Zentrum für Biologische Wissenschaften

Funktionelle Charakterisierung equiner Enteroide in Hinblick auf die cAMP-abhängige Chloridsekretion

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Johanna Wienholz

Wien, im November 2024

Betreuerin: Ass.-Prof. Dr. med. vet. Franziska Dengler
Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie
Zentrum für Biologische Wissenschaften
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin: Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Barbara Pratscher
Department für Kleintiere und Pferde
Zentrum für Interne Medizin Kleintiere
Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Johanna Wienholz, erkläre hiermit, dass keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen wurden, die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt wurden, die zur Beurteilung vorgelegte Diplomarbeit eigenständig verfasst wurde, sowie die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht wurde.

Abstract

Der Gastrointestinaltrakt des Pferdes ist ein komplexes Organsystem mit vielen Funktionen. Sein Epithel zeichnet sich dabei als wichtiges Organ für Transport und Barriere aus, das anfällig für unterschiedlichste Erkrankungen und Dysfunktionen ist. Um bei der Erforschung jener Erkrankungen und der physiologischen Funktionen des equinen Darmes zukünftig auf (lebende) Tiere verzichten zu können, werden Enteroide, die das Darmepithel *in vitro* simulieren, benötigt. Für diese Arbeit wurden Darmschleimhautproben von Jejunum und Colon gesunder Pferde extrahiert und mit dessen intestinalen Stammzellen equine Jejunum- und Colonerterioide (eqJE und eqCE) kultiviert. Um die Funktionen des Pferdedarmes *in vitro* darstellen zu können wurden die Enteroide mit dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) - Agonisten Forskolin behandelt. Das Forskolin bewirkt eine Stimulation des Chloridkanals *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) und führt daher zu einer vermehrten Chloridsekretion in das Lumen der Enteroide. Anhand der Umfangszunahme der einzelnen Enteroide konnte auf ein vermehrtes Wachstum, das im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei eqJE signifikant war, geschlossen werden. Auch eqCE ist in der Lage zu sezernieren, jedoch nicht im selben Ausmaß wie eqJE. Dabei sind die sehr guten Anzucht- und Wachstumsbedingungen der Organoide zu berücksichtigen, die eine Größenzunahme aufgrund der Sekretion verschleiern könnte. Der Versuch hat gezeigt, dass sich Enteroide zur Erforschung des Intestinaltraktes des Pferdes eignen und künftig vermehrt für die Forschung am physiologischen Darm sowie an Erkrankungen eingesetzt werden sollten.

Abstract

The gastrointestinal tract of the horse is a complex organ system with many functions. Its epithelium serves as an important organ for transport and barrier functions and is susceptible to various diseases and dysfunctions. To avoid the use of (live) animals in future research on these diseases and the physiological functions of the equine intestine, enteroids that simulate the intestinal epithelium *in vitro* are needed. For this study, intestinal mucosa samples were extracted from the jejunum and colon of healthy horses and cultured with their intestinal stem cells to create equine jejunum and colon enteroids (eqJE and eqCE). To demonstrate the functions of the horse's intestine *in vitro*, the enteroids were treated with the cyclic adenosinmonophosphate (cAMP) agonist Forskolin. Forskolin stimulates the chloride channel *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), leading to increased chloride secretion into the lumen of the enteroids. The increase in size of the individual enteroids indicates enhanced growth, which was significant for eqJE compared to the control group. Although eqCE is also capable of secretion, it does so to a lesser extent than eqJE. It is important to consider the very good growth conditions of the organoids, which may obscure size increases due to secretion. The experiment demonstrated that enteroids are suitable for studying the intestinal tract of horses and should be increasingly used in research on physiological gut functions and diseases in the future.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
CIC	Chloride Channel
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
eqCE	equine Colonenteroide
eqJE	equine Jejunumenteroide
Forsk	Forskolin
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hHGF	Human Hepatocyte Growth Factor
K ⁺	Kalium
mEGF	Mouse Epidermal Growth Factor
Na ⁺	Natrium
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
PAC	Proton Activated Chloride Channel
PBS	Phosphate Buffered Saline
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

Inhalt

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1 Aufbau des equinen Darmes	2
2.2 Die Sekretionsmechanismen des Darmes	4
2.3 Pathomechanismen der Diarrhö	6
2.4 Enteroide als <i>in vitro</i> Modell	7
3. Material und Methode	9
3.1 Isolierung und Kultivierung equiner intestinaler Enteroide.....	9
3.2 Stimulation der cAMP-abhängigen Chloridsekretion.....	10
3.3 Quantifizierung der cAMP-abhängigen Chloridsekretion	11
3.4 Statistische Auswertung	12
4. Ergebnisse	13
4.1 eqJE	13
4.2 eqCE.....	15
5. Diskussion.....	18
Literatur.....	20

1. Einleitung

Das Darmepithel ist ein sehr komplexes Konstrukt mit vielen Funktionen und großem Nutzen, es ist nicht nur eine wichtige mechanische Barriere, sondern mit seinen zahlreichen Immunzellen und Lymphfollikeln auch unabdingbar für das Immungeschehen. Der Großteil aller Immunreaktionen des Körpers laufen im Darm ab (1). Außerdem ist die Resorption lebenswichtiger Nährstoffe aus der Nahrung, sowie der Transport des Nahrungsbreies selbst zu nennen. Für letzteren ist die Fähigkeit des Epithels, Elektrolyte und Flüssigkeit in das Darmlumen zu sezernieren unabdingbar, wodurch letztlich auch der Wasser- und Elektrolythaushalt des gesamten Körpers beeinflusst wird (2). Wenn der Darm pathologische Veränderungen durchläuft, verändert sich auch die Funktionsfähigkeit der einzelnen Abschnitte, was zu verschiedenen Erkrankungen wie Koliken oder Durchfall, jedoch auch den restlichen Organismus betreffenden Problemen wie Elektrolytverschiebungen, Nährstoffdefiziten, und Immunsuppression führen kann.

Insbesondere bei Pferden ist der Gastrointestinaltrakt ein häufiger Ausgangspunkt von schwerwiegenden Erkrankungen. Forschung zur Darmgesundheit dieser Spezies ist daher von Nöten und beschäftigt die Tiermedizin schon seit langem. Sie ist jedoch aufwändig und benötigt nach wie vor Forschung am lebenden Tier, um die physiologischen und pathologischen Vorgänge im Darm zu observieren, zu verstehen und zu behandeln. Um dauerhaft auf den Einsatz von (lebenden) Tieren in der Forschung verzichten zu können werden Alternativen benötigt. Eine derartige Alternative könnten Enteroide sein, die aus intestinalen Stammzellen gewonnen werden und *in vitro* zu Modellen des Darmepithels heranwachsen. Um einen vollwertigen Ersatz für Tierversuche zu bieten, muss jedoch sichergestellt werden, dass die kultivierten Enteroide auch dieselben Charakteristika aufweisen wie das equine Darmepithel *in vivo*.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den cAMP-abhängigen Sekretionsmechanismen im Pferdedarm und widmet sich der Frage, ob sich equine Enteroide von Jejunum und Colon *in vitro* als geeignetes Modell für eben jene erweisen um Darmerkrankungen bei Pferden intensiv erforschen zu können.

2. Literaturübersicht

2.1 Aufbau des equinen Darmes

Der Darmtrakt des Pferdes ist ein großes und äußerst wichtiges Organ. Er lässt sich in Dick- und Dünndarm unterteilen (Abb. 1). Der Dünndarm besteht aus dem Duodenum, dem Jejunum und dem Ileum und ist neben seiner Transport- und Abwehrfunktion zum größten Teil an der Resorption von Nährstoffen beteiligt (1). Der Dickdarm besteht aus dem Caecum, der Gärkammer des Pferdes, die es als Dickdarmfermentierer dringend benötigt, dem Colon und dem Rektum (3). Die letzteren beiden Abschnitte sind vor allem an der Flüssigkeits- und Elektrolytresorption aus dem Nahrungsbrei beteiligt und nehmen somit eine wichtige Rolle bei dessen Transport, aber auch der Regulierung des Wasserhaushaltes des Körpers ein (4).

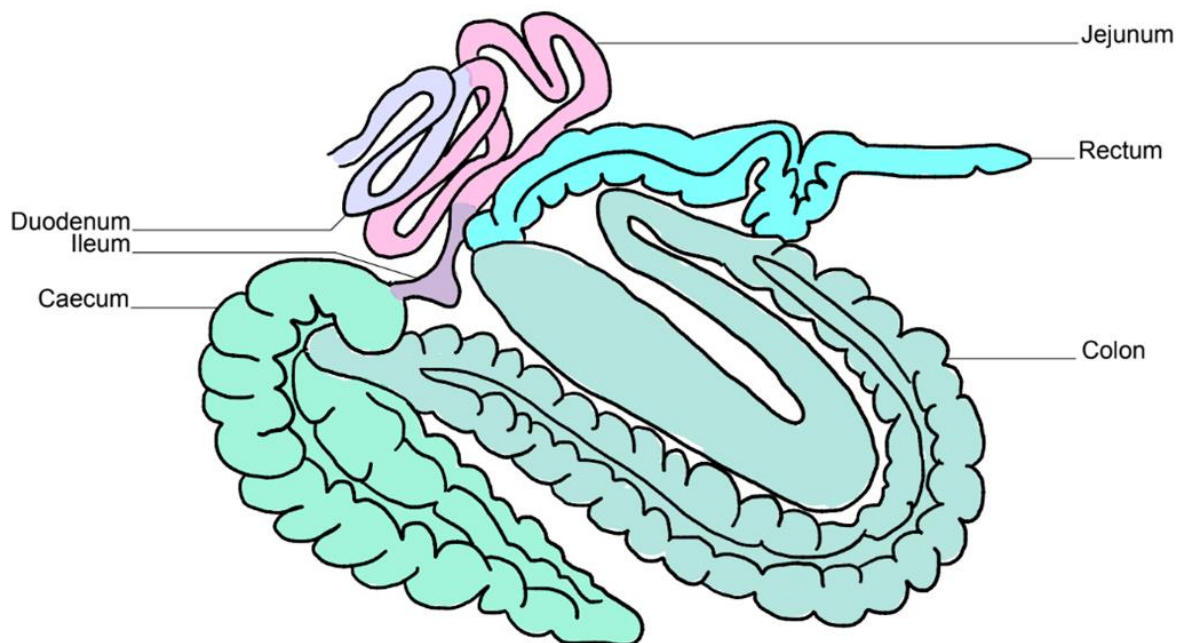


Abb. 1 Schematische Darstellung des Pferdedarms (modifiziert nach Valeria Wenk, natural-horse-care.com)

Der histologische Aufbau der jeweiligen Darmabschnitte ist an ihre Funktion angepasst und somit leicht verschieden (Abb. 2). Grundsätzlich besitzt die Wand des Darmes jedoch vier Schichten: lumenseitig befindet sich die *Tunica mucosa*, wobei sich hier besonders die *Lamina epithelialis* je nach Darmabschnitt unterschiedlich darstellt (5). Die *Lamina propria* besteht aus lockerem Bindegewebe und dient mit ihren vielen kleinen Gefäßen und lymphatischem Gewebe der Immunabwehr. Unter ihr gelegen ist die *Lamina muscularis*, die der Mukosa eine Eigenbeweglichkeit ermöglicht. Unter der ersten, inneren Schicht befindet sich die *Tela submucosa* (5). Sie beherbergt neben zahlreichen großen Gefäßen den *Plexus submucosus*, der über das enterische Nervensystem den Ionentransport und somit die Sekretions- und Absorptionsmechanismen reguliert (1). Mit ihrem hohen Bindegewebsanteil trennt sie die Mukosa von der *Tunica muscularis*. Jene besteht aus einer Ring- und einer

Längsmuskelschicht und ist für die Motilität des Darmrohres zuständig. Viszeral wird der Darm von der *Tunica serosa* begrenzt (5).

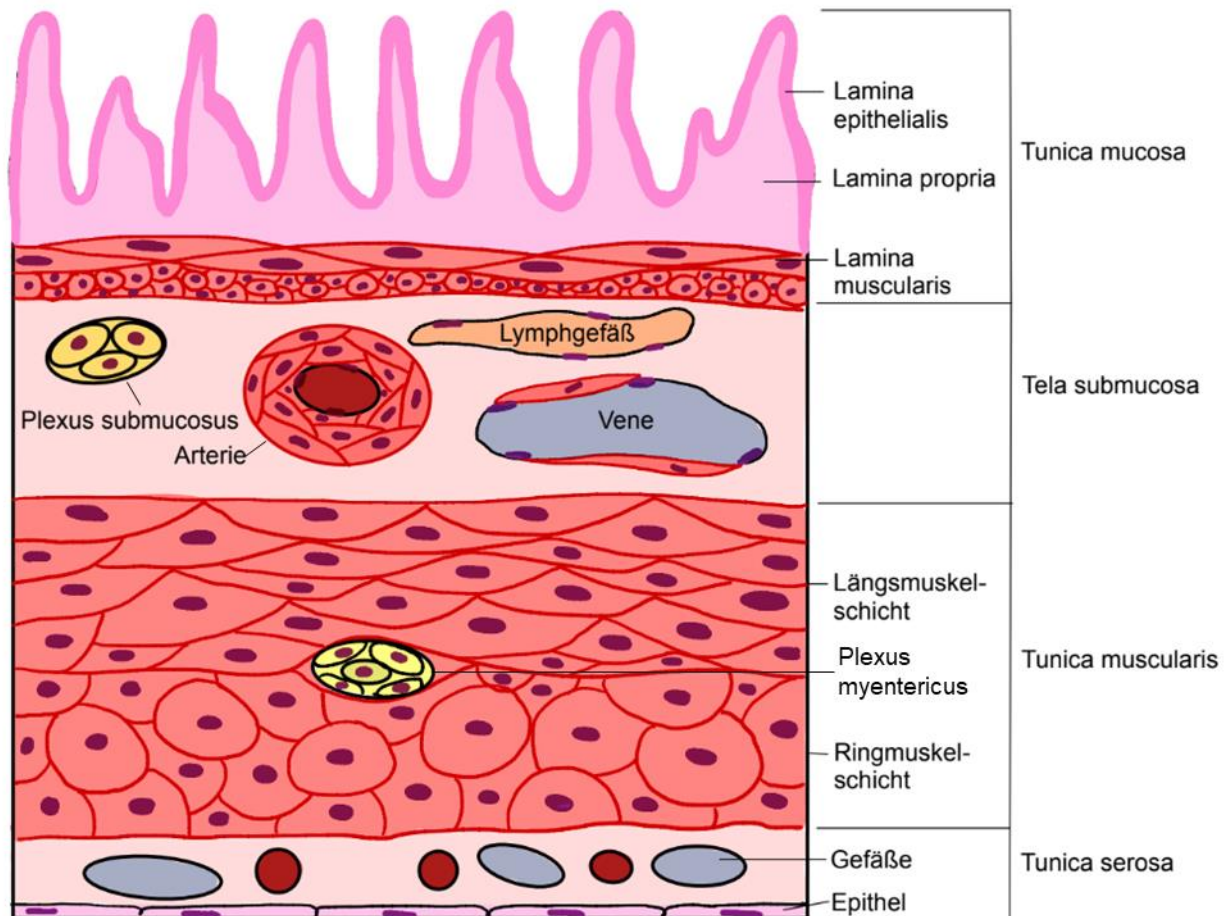


Abb. 2 Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Darmwand am Beispiel des Jejunums. Erläuterungen s. Text.

Der Dünndarm ist gekennzeichnet von hohen, in das Lumen hineinragenden Dünndarmzotten, *Villi intestinales*, und Krypten, die von der *Lamina propria mucosae* gebildet werden und Einfaltungen der Epithelzellmembranen, sog. Mikrovilli. Zusätzlich sind *Mucosa* und *Submucosa* in Falten, *Plicae circulares*, gelegt. Dadurch wird für eine starke Oberflächenvergrößerung gesorgt (6) (Abb. 3). Die Zotten und Falten sind im gesamten Dickdarm abwesend, dessen Oberflächenvergrößerung ausschließlich von den Krypten übernommen wird (6). Sowohl Dick- als auch Dünndarm enthalten die gleichen Zellarten in unterschiedlichem Verhältnis. So wird das Epithel vor allem durch hochprismatische Enterozyten und in geringerem Umfang Becherzellen gebildet, wobei letztere in distalen Darmabschnitten stärker zunehmen, um den weiteren Transport der allmählich eingedickten Faeces zu gewährleisten (7). In den Krypten finden sich enteroendokrine Zellen und Panethzellen, welche das antibakteriell wirksame Lysozym sezernieren, wie auch intestinale Stammzellen, welche regelmäßig das Epithel erneuern (6) (Abb. 3). Das Epithel ist das zentrale Organ für Transport und Barriere (4).

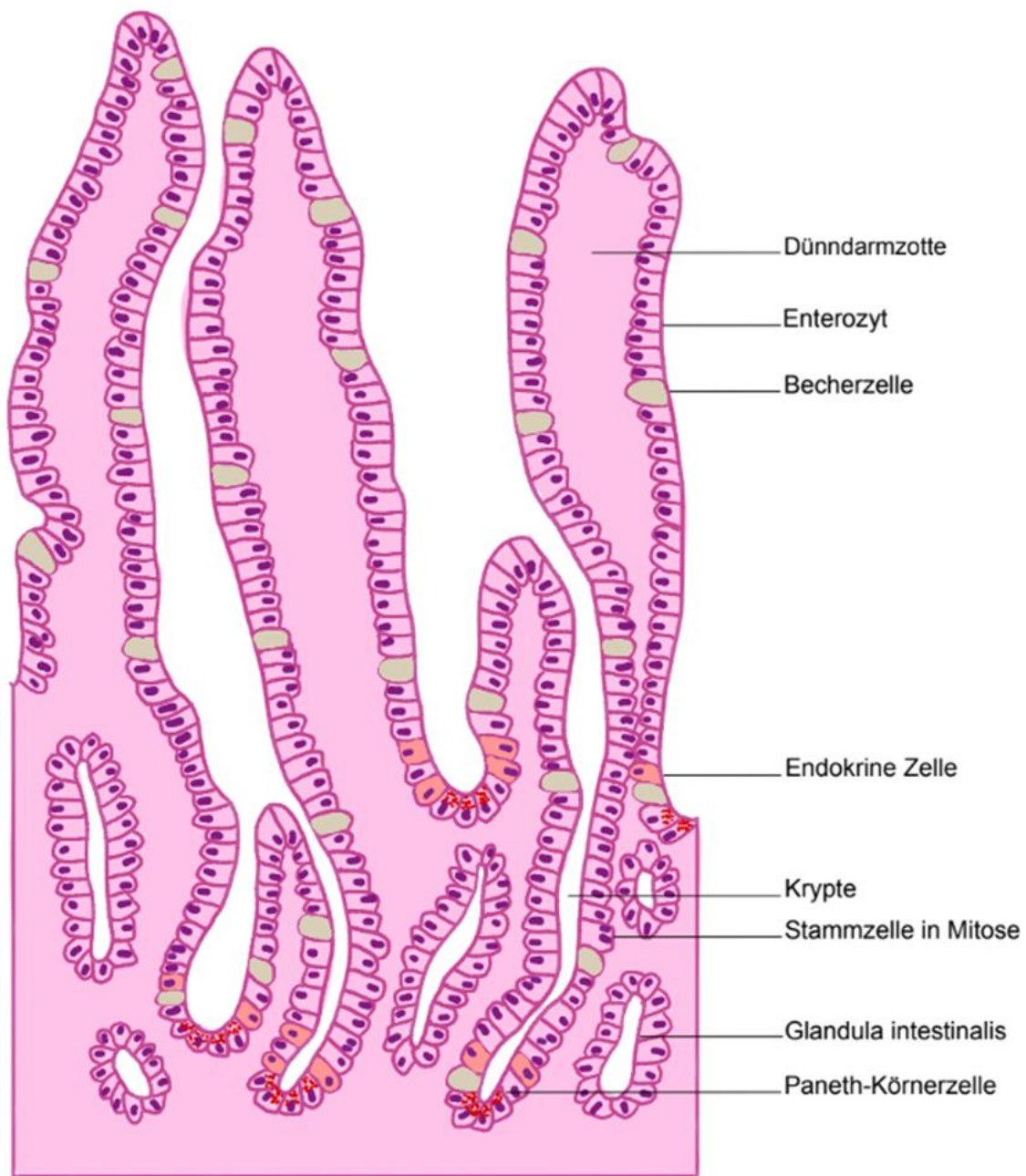


Abb. 3 Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus des Jejunums

2.2 Die Sekretionsmechanismen des Darmes

Die Funktion des Darmes ist vielseitig und komplex. Ein wichtiges Charakteristikum ist die Sekretion von Elektrolyten und Wasser. Dafür gibt es mehrere Mechanismen. Ohne sie kann weder die Barriere- noch die Transportfunktion des Darmrohres aufrechterhalten werden (1).

Der Dünndarm sezerniert über die Brunnerschen Drüsen und Becherzellen exozytotisch Schleim und über einen Cl/HCO_3^- -Austauscher Bicarbonat. Einerseits wird somit der im

Duodenum ankommende saure Mageninhalt neutralisiert, andererseits bildet die ca. 0,5mm dicke Schleimschicht, die das komplette Dünndarmepithel bedeckt, auch eine mechanische Barriere und schützt vor Noxen wie Bakterien, Viren und Parasiten (1). Die Krypten, auch *Glandulae intestinales* genannt, sezernieren am Grund der Darmzotten hauptsächlich über den Chloridkanal *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) Chlorid (8). Weitere Kanäle, die im Darmepithel eine eher untergeordnete Rolle spielen, sind calciumabhängige *Outwardly Rectifying Chloride Channel* (ORCC), spannungsabhängige Chloridkanäle (CIC) und protonenabhängige Chloridkanäle (PAC) (9–11).

Unter ATP-Verbrauch gelangt hierbei Cl^- entgegen dem elektrischen Potenzial über einen $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -Cotransporter in der basolateralen Membran in die Zelle, um im Anschluss entlang des elektrischen Gradienten über CFTR-Kanäle in das Lumen der Krypten zu strömen (12). Na^+ und K^+ folgen hierbei nicht, sondern rezirkulieren aktiv über die Na^+/K^+ -ATPase (Na^+) beziehungsweise durch Kaliumkanäle (K^+) zurück ins Interstitium, um das elektrochemische Potenzial aufrecht zu erhalten (13). Dem Chlorid folgt transzellulär aus osmotischen Gründen Wasser. Auf diese Weise wird der Nahrungsbrei verflüssigt und kann besser resorbiert werden (1).

Die mit der Nahrung aufgenommene und zusätzlich von der vorangegangenen Darmpassage sezernierte Flüssigkeit muss vom Dickdarmepithel wieder resorbiert werden. In den Krypten des Colons werden wie im Dünndarm sowohl Chlorid als auch Bicarbonat, allerdings auch zusätzlich aktiv Kalium sezerniert. Der Nahrungsbrei wird durch diese Funktionen ebenfalls weitergespült (1).

Durch verschiedene prosekretorische Botenstoffe kann die Chloridsekretion stimuliert werden. Bei Nahrungsaufnahme und somit Dehnung des Darmrohres und Aktivierung des vagovagalen Reflexes geben die Neurone des *Plexus submucosus* die Transmitter Acetylcholin und vasoaktives intestinales Peptid (VIP) ab und stimulieren somit die Freisetzung von second messengers. Neben diesen physiologischen Prozessen können Bakterien, ihre Toxine, Protozoen und auch Medikamente zu einer übermäßigen Stimulation der second messenger und in Folge dessen zu Diarrhö führen (1).

Die so initiierten second messenger-Kaskaden wirken intrazellulär über zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Ca^{2+} positiv auf die Chloridsekretion, wobei sie sich in ihren Angriffspunkten in der Signalkaskade unterscheiden (14). Ca^{2+} bewirkt eine Öffnung von Kaliumkanälen, wodurch mehr K^+ ausströmen kann und eine Hyperpolarisation der Membran erfolgt. Das Cl^- kann dadurch leichter entlang des elektrischen Gradienten aus der Zelle diffundieren und die Sekretion wird somit indirekt stimuliert (12, 14). cAMP und cGMP wirken hingegen direkt auf die Chloridsekretion, indem sie Proteinkinase-vermittelt CFTR-Kanäle aktivieren (15). Zudem wird der Natriumtransport in die Enterozyten hinein indirekt über die Wirkung auf den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher gehemmt. Somit wirkt sich cAMP stark auf den Fluss des Wassers in die Zelle hinein beziehungsweise heraus aus und hat Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt (1). Die wichtigsten beteiligten Transport- und Regulationsmechanismen sind in Abb. 4 dargestellt.

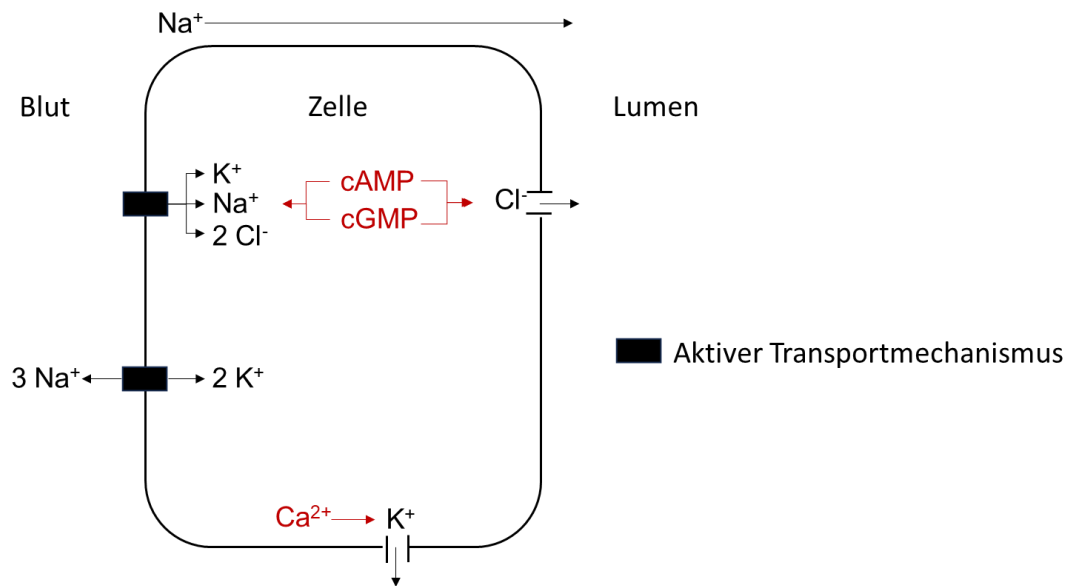


Abb. 4 Sekretionsmechanismen der Enterozyten und der Einfluss der second messenger (rot) auf die Chloridsekretion

2.3 Pathomechanismen der Diarrhö

Eines der häufigsten gesundheitlichen Probleme von Pferden ist die Kolik – sie tritt in allen Altersstufen, bei allen Rassen, Nutzungs- und Haltungsformen auf und ist für sehr viele krankheitsbedingte Todesfälle verantwortlich (16). Ihr liegen vielfältige Noxen zugrunde, die die komplexen Funktionen des Darmepithels beeinträchtigen und es schädigen. Durchfall ist ein Symptom, das Koliken begleiten kann und durch eine übermäßige Wasserausscheidung mit dem Kot gekennzeichnet ist, wobei auch die Menge und die Frequenz des Kotabsatzes erhöht sein kann (17). Diarrhö ist nicht als primäre Krankheit, sondern vielmehr als Reinigungsvorgang des Körpers zu verstehen, um etwaige Noxen aus dem Darmlumen zu entfernen (1). Bei zu hohem Wasserverlust kann es allerdings folglich zu Abweichungen im Wasser- und Elektrolythaushalt kommen, wodurch weitere Erkrankungen resultieren können (2).

Diarrhö kann viele verschiedene Auslöser haben und lässt sich auf unterschiedliche Arten einteilen. Pathophysiologisch unterscheidet man vor allem zwischen der sekretorischen und der osmotischen Diarrhö. Sie basieren auf einem veränderten osmotischen Gradienten zwischen Lumen und Epithel. Bei der osmotischen Diarrhö verbleibt aufgrund der osmotischen Wirkung nicht resorbierter makromolekularer Nährstoffe die Flüssigkeit im Lumen und kann nicht resorbiert werden. Bei der sekretorischen Diarrhö kommt es hingegen zu einer vermehrten Sekretion von Ionen, vor allem von Cl^- , welches Wasser mit sich ins Darmlumen zieht, wobei die sezernierte Menge die Resorptionskapazität des Epithels übersteigt (1). Der Fluss von Cl^- wird vor allem über eine übermäßige Stimulation des cAMP-Weges durch Noxen wie Cholera toxin und hitzestabiles E. coli-Toxin oder einen vermehrten Einbau apikaler Kaliumkanäle als Reaktion auf beispielsweise Clostridien erhöht (18–21).

Die genauen Mechanismen, die zu Diarrhoe führen, sind bis heute noch nicht zur Gänze verstanden. Forschung *in vivo* und an *in vitro*-Modellen bringen stetig neue Erkenntnisse und werden benötigt, um effektive Diagnostik und Therapien zu ermöglichen.

2.4 Enteroide als *in vitro* Modell

Organoide sind kleine, organähnliche Zellverbände, die sich aus Stammzellen kultivieren lassen. Es gibt sie in vielen Variationen, zum Beispiel als Nerven- oder Herzgewebe. Das organoide Gewebe verhält sich unter bestimmten Kultivierungsbedingungen wie das Ursprungsgewebe und kann folglich zur *in vitro*-Simulation genutzt werden (22). Die Organoide, die sich zu Darmepithel differenzieren, werden Enteroide genannt, auch sie sind in der Lage die unterschiedlichen Epithelien der einzelnen Darmabschnitte darzustellen, bspw. als Jejunum- und Colonenteroide (oder auch Colonoide) (22).

Um ein Organoid entstehen zu lassen, werden Stammzellen des jeweiligen Gewebes oder pluripotente Stammzellen benötigt. Für Enteroide werden intestinale Stammzellen aus den Krypten des Darmepithels isoliert und kultiviert (23). Die Stammzellen erneuern das Epithel alle fünf bis sieben Tage und sind somit in der Lage, sich ständig zu neuen funktionalen Darmepithelzellen zu entwickeln (22).

Enteroide haben denselben phänotypischen und funktionellen Aufbau wie das Ursprungsgewebe, aus dem sie kultiviert wurden (24), was auch über den Nachweis derselben genetischen Marker *in vivo* bzw. *in vitro* dargestellt werden konnte (23, 25). Das Epithel entspricht eben jenem des Jejunums beziehungsweise des Colons inklusive aller Zellarten, wie Enterozyten, Paneth-Zellen, Becherzellen etc., wobei sich die apikalen Zellpole um ein abgeschlossenes „Lumen“ herum orientieren und die basolaterale Seite nach außen zeigt (Abb. 5). Mit dem Vorhandensein der spezifischen Zellen haben Enteroide ebenfalls die Funktionen der Lokalisation, an der ihre Stammzellen entnommen wurden, zum Beispiel Transportfunktionen durch Transportproteine (26, 27).

Unter korrekten Kulturbedingungen wachsen und differenzieren sich Enteroide und sollten auch in der Lage sein, nach Aktivierung der second Messenger-Kaskaden cAMP-abhängig Chlorid zu sezernieren. Dies kann durch Forskolin (Forsk) erreicht werden, eine chemische Verbindung, die den cAMP-Weg stimuliert, woraufhin die CFTR-Kanäle geöffnet werden (12). Folglich strömt Chlorid und damit Wasser vermehrt in das Lumen der Enteroide und verursacht ein Anschwellen der Enteroide.

Demnach sollten equine Enteroide kleine funktionelle Abbilder des Darmepithels des Pferdes darstellen, was mit dieser Studie in Bezug auf die Chloridsekretion untersucht und belegt werden soll.

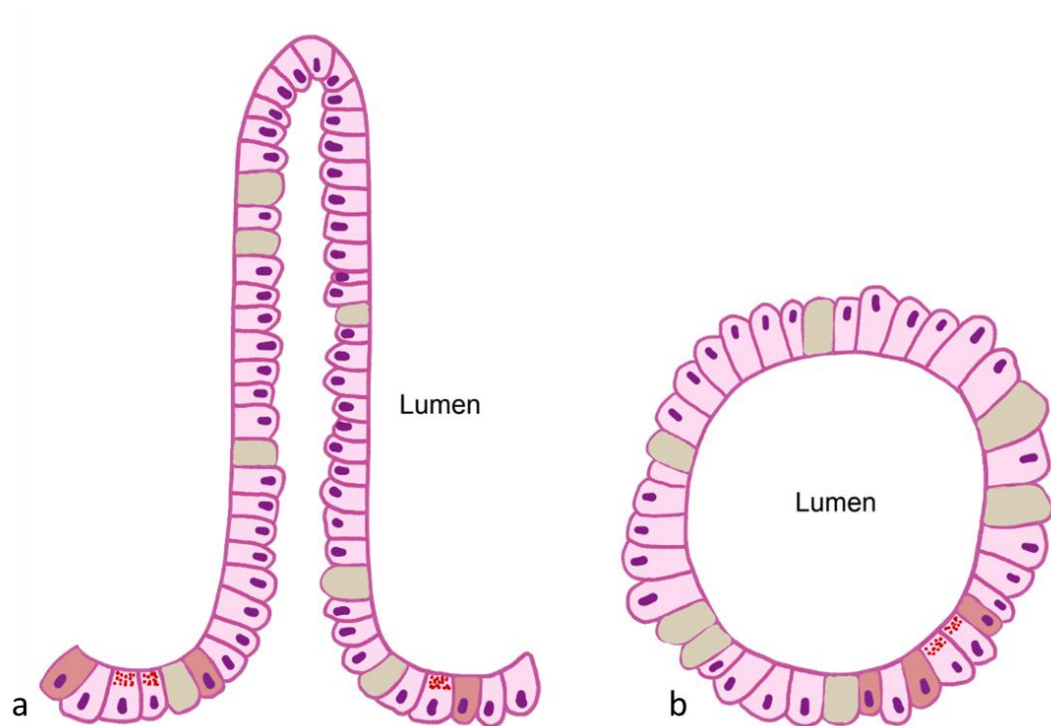


Abb. 5 schematische Darstellung einer Dünndarmzotte inklusive Krypte und aller typischen Zellen des Dünndarmepithels (a, vgl. Abb. 3) mit Kennzeichnung des Bereichs des Lumens. Vergleichend dazu die Darstellung eines Enteroids mit innenliegendem Lumen und denselben Zelltypen wie in vivo (b).

3. Material und Methode

3.1 Isolierung und Kultivierung equiner intestinaler Enteroide

Für die vorliegende Arbeit wurden Enteroide aus dem Jejunum und Colon von je n = 4 Pferden kultiviert. Die beprobten Pferde waren unterschiedlicher Rasse, verschiedenen Alters (3 - 25 Jahre, Median 17,5) und wurden an der Veterinärmedizinischen Universität Wien aus medizinischen Gründen unabhängig von der Studie euthanasiert. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Tod von gesunden Teilen des Darmes entnommen. Für die Jejunumenteroide (im Folgenden als eqJE bezeichnet) wurden ca. 20cm lange Stücke des distalen Jejunums und für die Colonenteroide (im Folgenden eqCE genannt) Proben der *Flexura pelvina* des großen Colons entnommen.

Die entnommenen Darmteile wurden mit 4 °C kalter 0,9 %iger NaCl-Lösung von Nahrungsresten und Verunreinigungen befreit. Anschließend wurde mit einem Skalpell die Mucosa abpräpariert und die entstandenen Schleimhautfetzen für 30 min in 0.5 mg/mL Gentamicin (Merck, Wien, Österreich) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (Merck, Wien, Österreich) auf Eis inkubiert, um eine ausreichende Wirkung der Antibiose zu gewährleisten. Zur Gewinnung der Darmstammzellen wurden die Proben in 5 mM Ethylenediaminetetraessigsäure (EDTA) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mehrfach pipettiert und mit dem Rollmischer vermischt, um die Krypten vom restlichen Epithel zu lösen. Der Vorgang wurde drei- bis fünfmal wiederholt und die Fraktion mit dem reinsten Anteil an Krypten wurde zum Aussäen in einer 3D-Matrix (Geltrex®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf 24-Well-Platten, (Biologix®, Hallbergmoos, Deutschland) gewählt. Die gewonnenen Organoide vermehrten und teilten sich nun in einem Proliferationsmedium, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde (Tabelle 1).

Tabelle 1 Komponenten des Proliferationsmediums

Komponente	Konzentration	Hersteller
DMEM/F12*		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 12634010
HEPES*	10 mM	Merck, Wien, Österreich; # 12352107
GlutaMAX™*	2 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 35050061
Penicillin/Streptomycin*	100 U/mL	Merck, Wien, Österreich; # 12352207
B-27™ supplement	1x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 17504001
N-2	1x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 17502001
Nicotinamid	10 mM	Merck, Wien, Österreich; # 72 340

n-Acetyl-L-Cystein	1 mM	Merck, Wien, Österreich; # A9165
A 83–01	500 nM	Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland; # HY-10432
SB 202190	10 µM	Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland; # HY-10295
hGastrin I	10 nM	Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland; # HY-P1097
hHGF	50 ng/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 100-39H
mEGF	50 ng/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 315–09
hNoggin	100 ng/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; # 120-10C
Wnt3A conditioned medium [#]	43 % v/v	Eigenherstellung
Rspo1 conditioned medium [#]	10 % v/v	Eigenherstellung
Gentamicin	20 µg/mL	Merck, Wien, Österreich; # G1272
Y-27632 dihydrochlorid	10 µM	TargetMol®, Wellesley Hills, MA, USA; # T1725

**Komponenten des Basalmediums.*

[#]Zellen für die Produktion wurden zur Verfügung gestellt von Bio-Techne®, Abingdon, UK (Cultrex® HA-R-Spondin1-Fc 293 T Zellen) und als großzügiges Geschenk von Prof. Dr. Clevers (L-Wnt-3A Zellen)

3.2 Stimulation der cAMP-abhängigen Chloridsekretion

Je n = 4 biologische Replikate equiner Jejunum- und Colonorganoide wurden mit Hilfe des LifeCell-Imaging-Systems „Incucyte“ (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) über einen Zeitraum von 92 h beobachtet. Nach einer zweistündigen Equilibrierungsphase wurde je ein Well desselben biologischen Replikats mit dem cAMP-Agonisten Forsk (10 µM, Merck, Wien, Österreich) inkubiert, während eine gleich große Vergleichsgruppe nur mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt wurde. In den folgenden drei Tagen wurden zu Beginn der Kultivierung (im Folgenden als Stunde -2 bezeichnet), nach Zugabe von Forsk beziehungsweise DMSO (im Folgenden als Stunde 0 bezeichnet) und im Anschluss im Abstand von je sechs Stunden von jedem Well Bilder aufgenommen, die für die folgende Analyse verwendet wurden (Abb. 6).

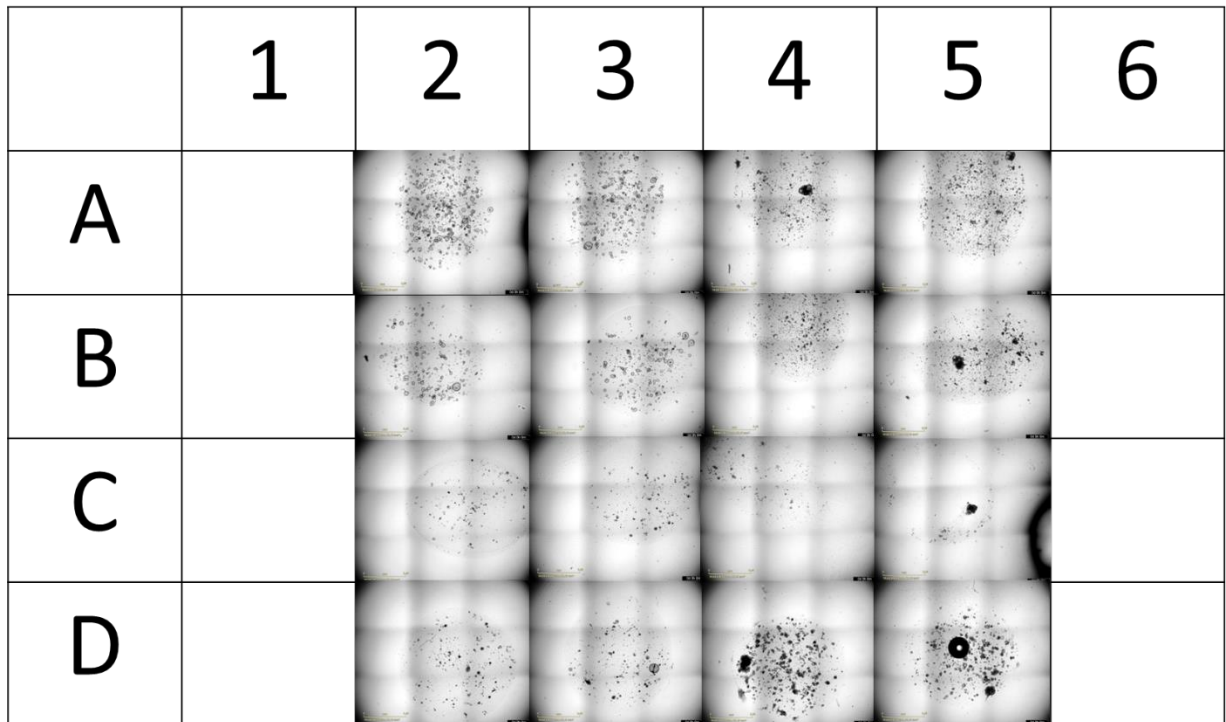


Abb. 6 Versuchsaufbau in Stunde 0. In den Wells 2A-D und 5A-D befand sich jeweils die Kontrollgruppe, in den Wells 3A-D und 4A-D die mit Forskolin behandelten Enteroide. 2A-D und 3A-D: eqJE, 4A-D und 5A-D: eqCE.

3.3 Quantifizierung der cAMP-abhängigen Chloridsekretion

Anhand von alle sechs Stunden aufgenommenen Bildern wurde per Freihandtool mit dem Programm Fiji ImageJ64 (28) der Umfang von je $n = 20$ zufällig ausgewählten Enteroiden pro Bild bei je 2 biologischen Replikaten für eqJE beziehungsweise eqCE gemessen und so Wachstum und Sekretionsleistung anhand der Schwellung der Enteroide ermittelt (Abb. 7). Für die beiden verbleibenden biologischen Replikate wurde die Anzahl der gemessenen Enteroide auf $n = 15$ pro Bild reduziert, um den großen zeitlichen Aufwand zu verringern. Bei einem Well der eqCE-Kontrollgruppe waren ab Stunde 66 nur mehr $n = 14$, ab Stunde 72 $n = 13$ und von Stunde 78 bis 90 $n = 12$ einzeln abgrenzbare Organoide messbar. Für jedes biologische Replikat und jeden Zeitpunkt wurde für die weitere Auswertung der Mittelwert der gemessenen Enteroide berechnet.

Als Kriterien für die Auswahl der einzelnen Organoide wurde auf eine gleichmäßige Verteilung über das Bild, sowie auf eine ähnliche Anzahl optisch kleiner und größer erscheinenden Enteroide, sowie gute Abgrenzbarkeit und somit möglichst genaue Messbarkeit geachtet. Wann immer möglich wurde immer dasselbe Enteroide über die gesamte Inkubationszeit vermessen. Der Maßstab wurde für jedes einzelne Bild angepasst.

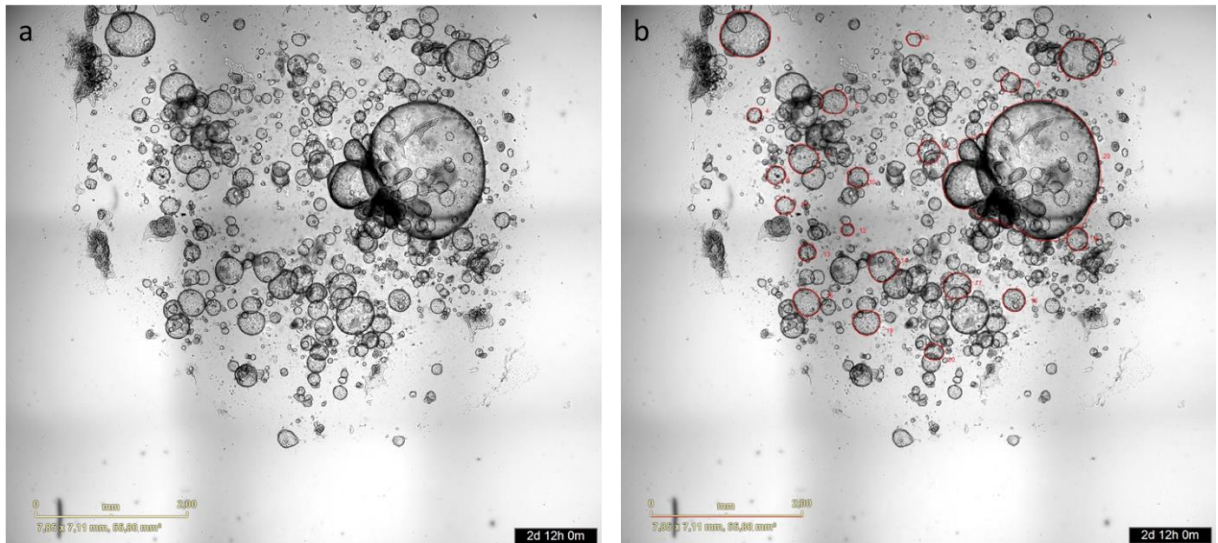


Abb. 7 eqCE nach Forskolinzugabe bei Stunde 60 als Live-Cell-Imaging-Aufnahme (a) und mit eingezeichneten Hilfslinien zur Umfangsmessung mittels ImageJ (b). Die gemessene Strecke wurde rot markiert und durchnummeriert, wodurch jeder erhaltene Umfang optisch nachvollzogen werden kann. Ebenso wurde der Maßstabsbalken gemessen und markiert.

3.4 Statistische Auswertung

Die Messwerte wurden je Bild und biologischem Replikat für jeden Zeitpunkt gemittelt und mithilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two Way Repeated Measurements ANOVA) hinsichtlich der Faktoren Zeit und Behandlung an allen Zeitpunkten verglichen. Über einen post-hoc Holm-Sidak-Test wurde außerdem ein Vergleich mit den unbehandelten Enteroiden zum Zeitpunkt -2h als Kontrollwert für jeden einzelnen Zeitpunkt und jede Behandlung beider Gruppen angestellt. Bei einem p-Wert < 0,05 wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test und Brown-Forsythe-Test auf Normalverteilung und -varianz getestet.

4. Ergebnisse

4.1 eqJE

Das Jejunum wies eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Zeit und Behandlung auf ($p = 0,002$).

Die Betrachtung über den Zeitverlauf (Bezugspunkt Zeitpunkt -2 h) zeigte, dass ein Wachstum aller Organoide zu verzeichnen war, welches ab dem Zeitpunkt 42h zu einem statistisch signifikanten Unterschied in der Größe der Organoide im Vergleich zum Zeitpunkt -2 h führte. Über das physiologische Wachstum hinaus zeigte der Vergleich zwischen den Behandlungen, dass sich ab dem Zeitpunkt 18h die Forskolingruppe von der Kontrollgruppe signifikant unterschied (Abb. 8, 9).

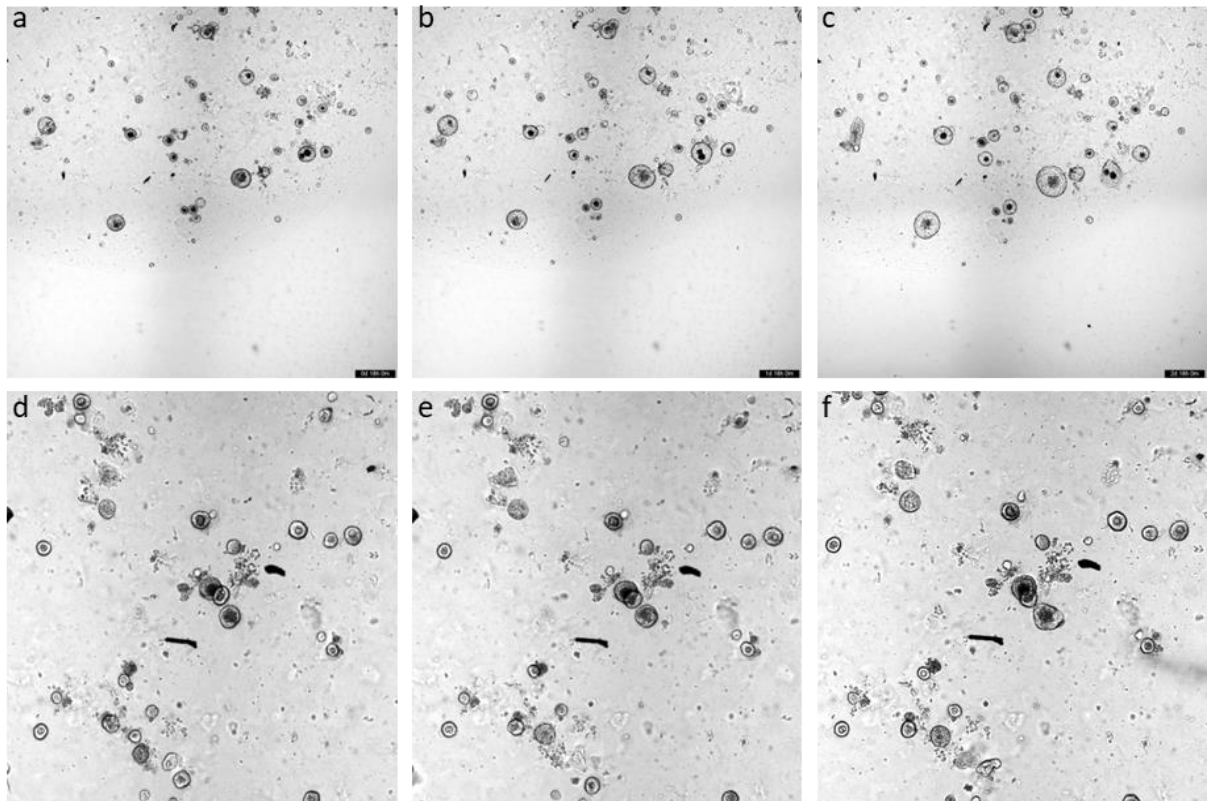


Abb. 8 Repräsentative Aufnahmen, die die Größenzunahme von mit Forsk inkubierten eqJE zu den Zeitpunkten 18 h (a), 42 h (b) und 66 h (c) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu den selben Zeitpunkten 18 h (d), 42 h (e) und 66 h (f) zeigen.

Der signifikante Größenzuwachs blieb auch bestehen, obwohl die gemessenen Enteroide ab dem Zeitpunkt 66h sowohl in der mit Forsk behandelten als auch unbehandelten Gruppe im Wachstum stagnierten bzw. sogar wieder deutlich an Größe verloren, wobei der Größenverlust in der Forskolingruppe deutlicher zu verzeichnen war als in der Kontrollgruppe (Abb. 9, 10, 11).

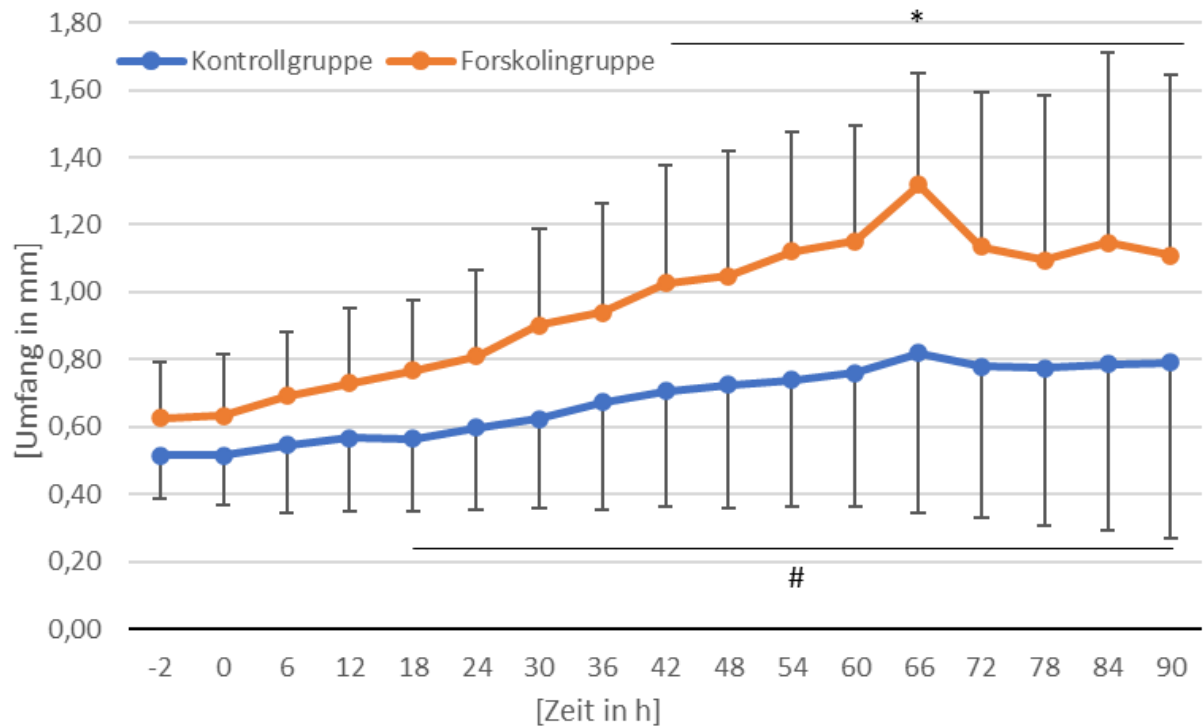


Abb. 9 Das Wachstum der mit Forsk behandelten eqJE führte zu einem statistisch signifikanten Unterschied in der Größe ab Stunde 42 im Vergleich zum Zeitpunkt -2h (*). Ab dem Zeitpunkt 18h unterschied sich die Forskolingrouppe von der Kontrollgruppe signifikant in der Größe (#). Ab Stunde 66 ist ein Abfall der Größenzunahme in der Forskolingrouppe zu verzeichnen, der auf den Zerfall der gemessenen eqJE zurückzuführen ist. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von $n = 4$ biologischen Replikaten. * $p < 0,05$, Two-Way RM ANOVA + post-hoc Holm-Sidak-Test, $n = 4$.

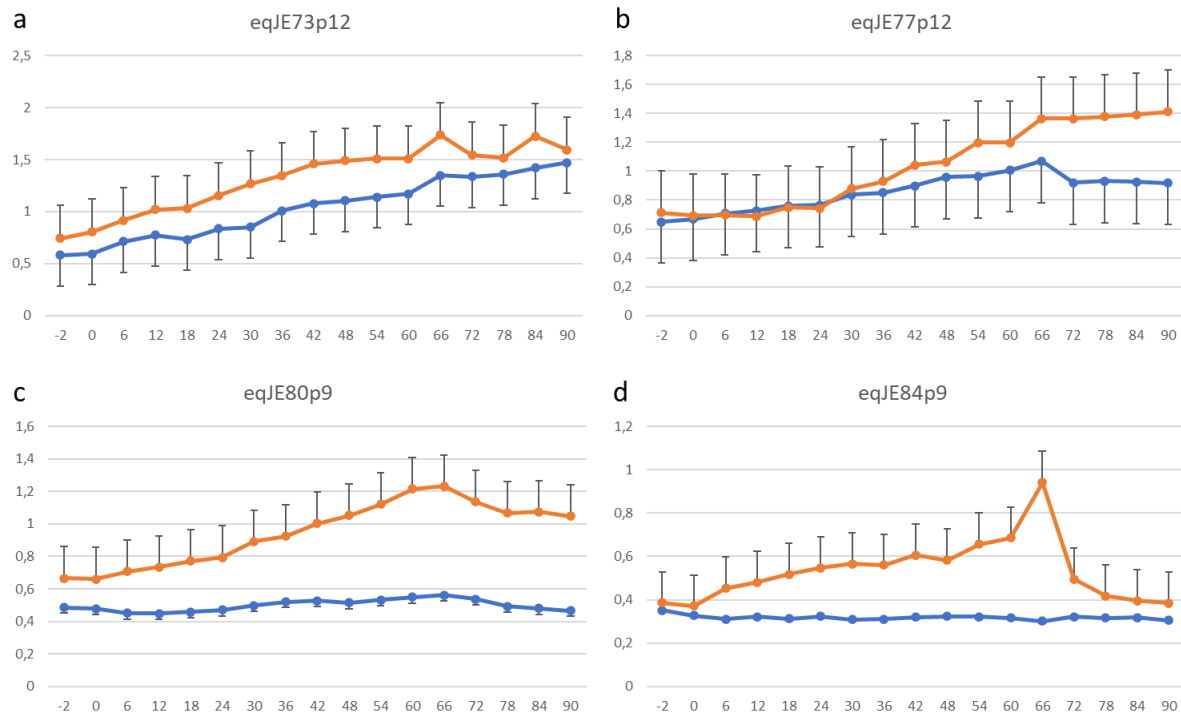


Abb. 10 Darstellung des Größenverlaufs für die einzelnen biologischen Replikate, die in Abb. 9 gemittelt dargestellt sind. Jeder Messpunkt bildet den Mittelwert aus $n = 15-20$ gemessenen eqJE.

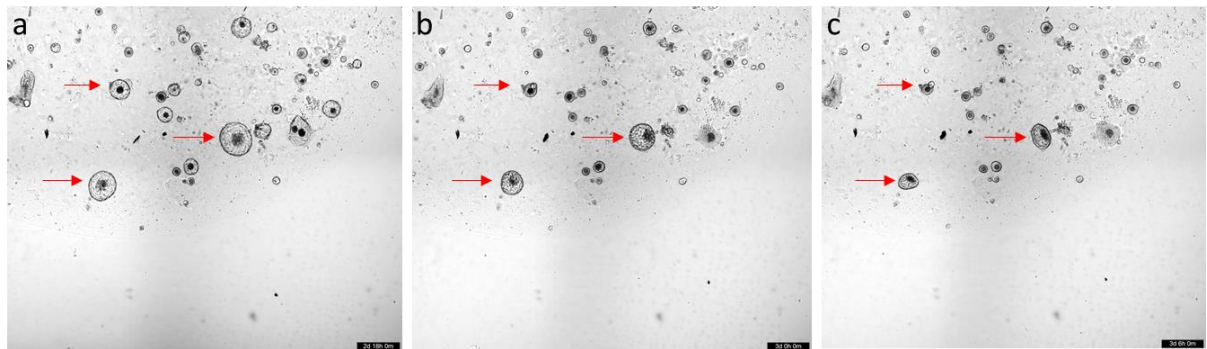


Abb. 11 Repräsentative Darstellung dreier eqJE zum Zeitpunkt 66 h (a), 72 h (b) und 78 h (c), die deutlich zeigt, dass zu späteren Inkubationszeitpunkten ein Zerfall der Enterotide zu beobachten war, der ein Absinken der Wachstumskurve v.a. bei den mit Forsk inkubierten Enteroiden verursachte.

4.2 eqCE

Auch in den eqCE wurden Interaktionen zwischen den Faktoren Zeit und Behandlung nachgewiesen ($p < 0,001$) und es konnte ein Wachstum abhängig von der Zeit nachgewiesen werden (Abb. 12).

Die Behandlung mit Forskolin bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch keinen signifikanten Unterschied. Allerdings war in den mit Forskolin behandelten eqCE bereits nach 18h eine signifikante Vergrößerung des Umfangs im Vergleich zum Zeitpunkt -2h nachzuweisen, während die Kontrollgruppe erst ab 54h einen signifikanten Unterschied erreichte ($p < 0,05$) (Abb. 13, 14).

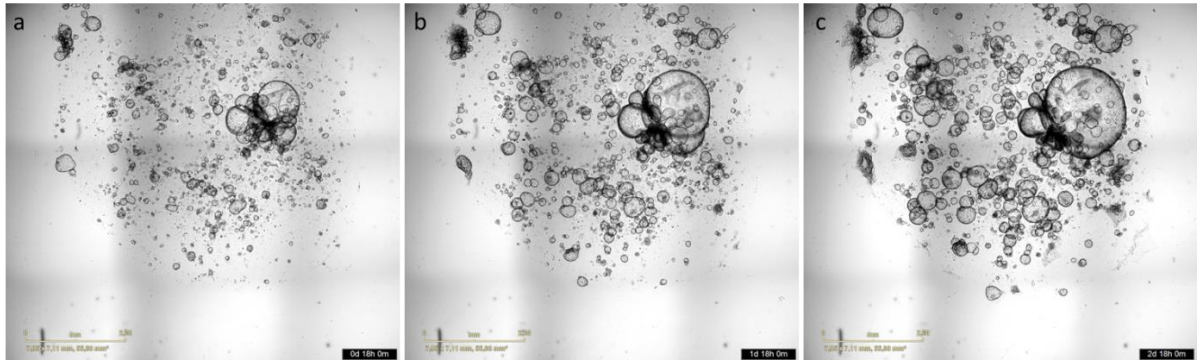


Abb. 12 Repräsentative Aufnahmen, die die signifikante Größenzunahme von mit Forskolin inkubierten eqCE zu den Zeitpunkten 18h (a), 42h (b) und 66h (c) zeigen.

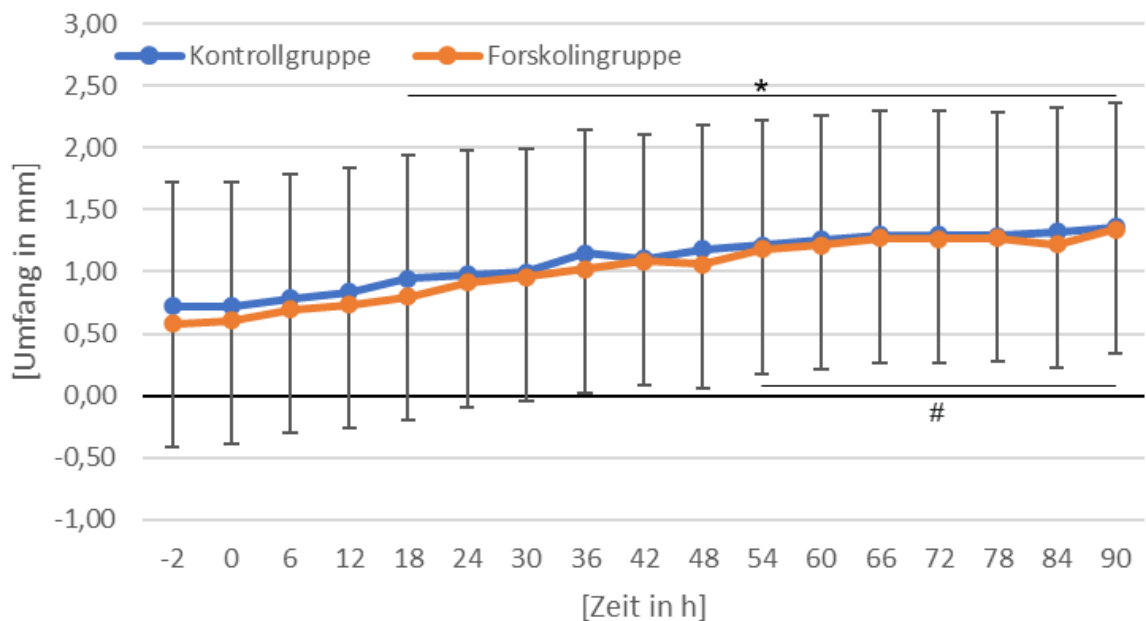


Abb. 13 Die Forskolingroup der eqCE zeigte ab Stunde 18 eine signifikant höhere Größenzunahme (*) im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der erst ab Stunde 54 eine Signifikanz zu erkennen war (#).

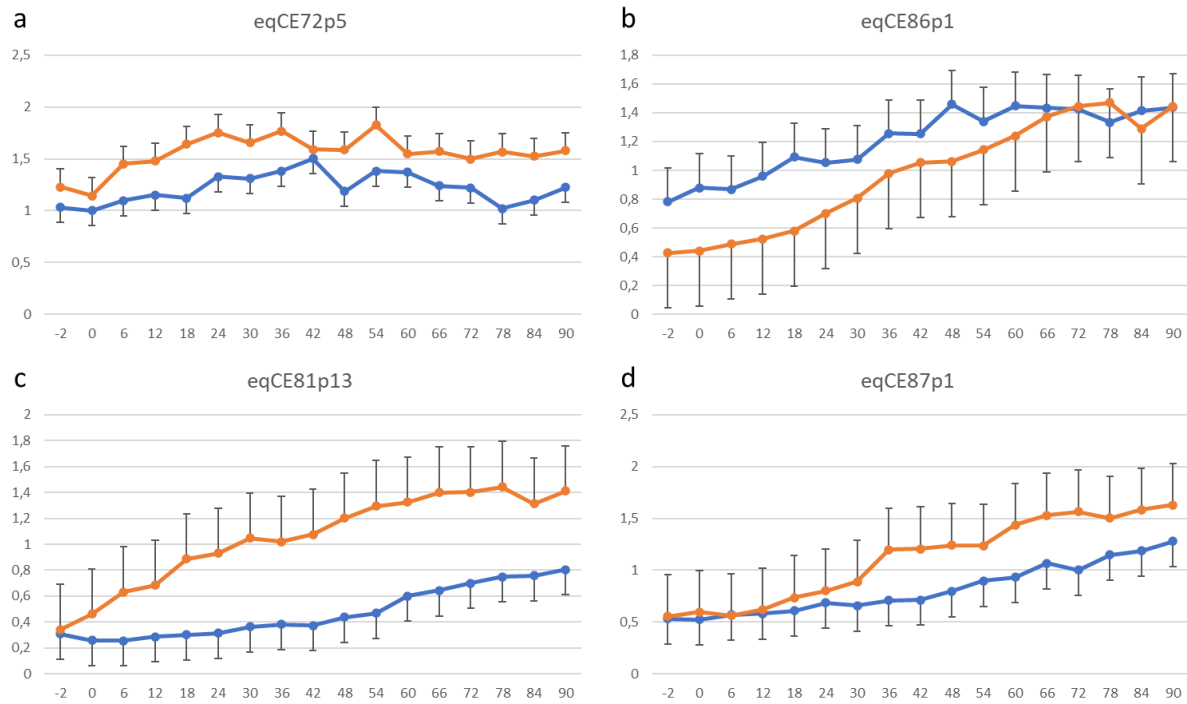


Abb. 14 Die einzelnen eqCE zeigten ein sehr unterschiedliches Verhalten, wobei bei den in Abbildungen b, c und d dargestellten Replikaten ein deutlicher Größenzuwachs dargestellt werden konnte.

5. Diskussion

Mit dieser Studie sollte geklärt werden, ob sich eqJE und eqCE in Hinsicht auf ihre Sekretionseigenschaften *in vitro* ähnlich verhalten wie equines Darmepithel *in vivo*. Dazu wurden sie mit dem cAMP-Agonisten Forsk behandelt und die dadurch verursachte Schwellung mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Sowohl in eqJE als auch in eqCE konnte eine cAMP-abhängige Sekretion bestätigt werden, wobei sich in eqJE ein deutlicherer Unterschied zur Kontrollgruppe verzeichnen ließ als in eqCE.

Enteroide, die alle Zelltypen des Dün- bzw. Dickdarmepithels rekapitulieren, wurden bereits mehrfach erfolgreich aus Stammzellen von Mäusen kultiviert, woraufhin dies ebenfalls erfolgreich bei humanen Enteroiden gelang (24, 27, 29, 30). Die gleiche Methode konnten auf verschiedene Tierarten, wie Schweine, Katzen, Hunde, Hühner, Rinder, Schafe und Pferde übertragen werden, um ebenso erfolgreich Enteroide anzuzüchten (23, 31–35). Staab et al. haben sogar gezeigt, dass eine Kokultur humaner Enteroide mit Immunzellen möglich ist (36). Nachweise, dass dieses vielversprechende *in vitro* Modell dem *in vivo* Darmepithel auch funktionell entspricht, d.h. eine ähnliche Barriere- sowie Transportfunktion etablieren kann, sind bislang jedoch rar. Dies gilt insbesondere für das Pferd, obwohl gerade in dieser Spezies immenser Forschungsbedarf im Bereich des Gastrointestinaltrakts besteht.

Wie eingangs erläutert spielt hierbei auch die Sekretion von Chlorid und damit Wasser eine bedeutende Rolle im Intestinum. In Ratten konnte eine cAMP-abhängige Stimulation von CFTR und somit eine erhöhte Sekretion im Jejunum *in vivo* gezeigt werden (37). In Pferden und Mäusen wurde die sekretionsfördernde Wirkung des cAMP-Agonisten Forsk im Jejunum nachgewiesen (38, 39). Im Colon konnte ebenfalls in Ratten und Menschen eine mit cAMP stimulierbare Sekretionsleistung gezeigt werden (41–43). Auch humane Colon- und Jejunumenteroide können Chlorid sezernieren (12, 44–47). Grundsätzlich sollten equine Jejunum- und Colontenteroide daher ebenfalls in der Lage sein, unter cAMP-Einfluss bei Anwesenheit des CFTR vermehrt Chlorid zu sezernieren. Bislang sind jedoch noch keine Studien zur Sekretionsleistung von eqJE und eqCE vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit Forsk behandelten eqJE ab Stunde 18 eine deutlich stärkere Umfangszunahme aufwiesen als die Kontrollgruppe, was auf eine stimulierte Sekretionsleistung schließen lässt. Daher kann geschlussfolgert werden, dass eine cAMP-abhängige Chloridsekretion der eqJE, die der Funktionalität des Darmepithels *in vivo* gleicht, möglich ist.

Die Colontenteroide zeigten ein weniger eindeutiges Ergebnis als die eqJE. Die mit Forsk behandelten eqCE wuchsen ähnlich der Kontrollgruppe, allerdings war ihre Größe bereits in Stunde 18 signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert, während dies erst in Stunde 54 bei der Kontrollgruppe der Fall war. Die starke Größenzunahme beider Gruppen kann auf sehr gute Kultivierungsbedingungen hinweisen (44), die die Proliferation so stark fördern, dass sie die Sekretionsleistung der mit Forsk behandelten Gruppe verschleiern könnten. So ist anzunehmen, dass bei den mit Forsk behandelten eqCE zwischen Stunde 18 und 54 vor allem durch die vermehrte Sekretion eine stärkere Größenzunahme zu verzeichnen war, welche dann im weiteren Verlauf vom allgemeinen Wachstum überdeckt wurde.

Die große Varianz in den Ergebnissen könnte auf eine zu kleine Stichprobe verweisen, da bei den vier beprobten Pferden eine sehr hohe biologische Varianz vorzuherrschen scheint. Mit einer größeren Anzahl an biologischen Replikaten könnte es zu eindeutigeren Ergebnissen im Mittel kommen.

Außerdem wäre die sehr aufwändige Messtechnik zu überdenken, die nicht nur sehr zeitintensiv ist, aber auch durch die subjektive Wahrnehmung der durchführenden Person zu Messfehlern führen kann. Da sich in den Wells teils recht viele Enteroide befanden, die sich mit zunehmender Größe stark berührten und überlagerten, war das Messen der einzelnen Enteroide stark erschwert. Eine automatisierte Messtechnik könnte beide Probleme beseitigen beziehungsweise verringern. Dazu wäre eine geringere Aussaatdichte notwendig als es in diesem Versuch der Fall war. Dies würde möglicherweise auch die Viabilität der Enteroide positiv beeinflussen.

Bei den mit Forsk behandelten eqJE war ab Stunde 66 ein starker Zerfall der einzelnen Enteroide in Abhängigkeit ihrer Größe zu verzeichnen, der sich zwar auch in der Kontrollgruppe zeigte, jedoch nicht so stark ins Gewicht fiel wie bei der mit Forsk behandelten Gruppe. Der Zerfall der Enteroide könnte auf eine zu starke sekretionsbedingte Schwellung und ein daraus resultierendes zu geringes Platzangebot oder auf ein natürliches Versterben bereits weit ausdifferenzierter Enteroide hinweisen. Auch die eqCE zeigten einen vermehrten Zerfall in Folge ihres starken Wachstums. Hier stellt sich ebenfalls die Frage, ob das Platzangebot in den Wells für die später herrschende Größe der Enteroide nicht ausreichend war. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass viele Faktoren bei der Erforschung von Enteroiden berücksichtigt werden müssen, wie beispielsweise die Anzuchtbedingungen und die Größe der Wells beziehungsweise die Menge der pro Well ausgesäten Enteroide.

In Zukunft wird die Grundlagenforschung zu Enteroiden stets komplexer ausfallen, bis hin zum Ziel, ganze Organe mit ihrer kompletten Funktion *in vitro* nachzustellen. Künftig könnten zunächst mikrophysiologische Systeme integriert und in Kokultur mit Immunzellen erforscht werden, um die vielfältigen Funktionen und Interaktionen der verschiedenen Gewebe nachvollziehbar machen zu können (33). Dabei steht die Forschung am Epithel am Anfang und eröffnet eine ganze Reihe an künftigen Möglichkeiten um physiologische und pathologische Funktionen des Darmes darzustellen. Mit dem gewonnenen Wissen können nicht nur die pathophysiologischen Abläufe besser verstanden, sondern auch die Therapiemöglichkeiten und Medikamentenentwicklung vorangetrieben werden. Auch im Bereich der regenerativen Medizin können Enteroide zum Fortschritt beitragen (22).

Mit dieser Studie wurde ein weiterer Grundstein in der Forschung gelegt, indem die cAMP-abhängige Sekretion von *in vitro*-Enteroiden des Jejunums des Pferdes eindeutig nachgewiesen werden konnte, während eine entsprechende Sekretionsfähigkeit der Colonenteroide ebenfalls sehr wahrscheinlich ist.

Literatur

1. Gerhard Breves, Martin Diener, Gotthold Gäbel. Physiologie der Haustiere; 2022.
2. Do C, Evans GJ, DeAgüero J, Escobar GP, Lin HC, Wagner B. Dysnatremia in Gastrointestinal Disorders. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9:892265. doi: 10.3389/fmed.2022.892265.
3. Santos AS, Rodrigues MAM, Bessa RJB, Ferreira LM, Martin-Rosset W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. *Animal* 2011; 5(1):48–56. doi: 10.1017/S1751731110001588.
4. Clemente-Suárez VJ, Martín-Rodríguez A, Redondo-Flórez L, Villanueva-Tobaldo CV, Yáñez-Sepúlveda R, Tornero-Aguilera JF. Epithelial Transport in Disease: An Overview of Pathophysiology and Treatment. *Cells* 2023; 12(20). doi: 10.3390/cells12202455.
5. Ulrich Welsch, Wolfgang Kummer, Thomas Deller. Histologie Das Lehrbuch; 2018.
6. Franz-Viktor Salomon, Hans Geyer, Uwe Gille. Anatomie für die Tiermedizin; 2020.
7. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12(5):319–30. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
8. Csanády L, Vergani P, Gadsby DC. STRUCTURE, GATING, AND REGULATION OF THE CFTR ANION CHANNEL. *Physiol Rev* 2019; 99(1):707–38. doi: 10.1152/physrev.00007.2018.
9. Nighot P, Young K, Nighot M, Rawat M, Sung EJ, Maharshak N et al. Chloride channel CIC-2 is a key factor in the development of DSS-induced murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(13):2867–77. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182a82ae9.
10. Sakamoto H, Kawasaki M, Uchida S, Sasaki S, Marumo F. Identification of a new outwardly rectifying Cl⁻ channel that belongs to a subfamily of the CIC Cl⁻ channels. *J Biol Chem* 1996; 271(17):10210–6. doi: 10.1074/jbc.271.17.10210.
11. Yang J, Chen J, Del Carmen Vitery M, Osei-Owusu J, Chu J, Yu H et al. PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. *Science* 2019; 364(6438):395–9. doi: 10.1126/science.aav9739.
12. McNamara B, Winter DC, Cuffe JE, O'Sullivan GC, Harvey BJ. Basolateral K⁺ channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon. *J Physiol* 1999; 519 Pt 1(Pt 1):251–60. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.02510.x.
13. Lubert Stryer, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto jr. Biochemie; 2018.
14. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 2002; 82(1):245–89. doi: 10.1152/physrev.00026.2001.
15. Wilfried Kues, Maren von Köckritz-Blickwede. Biochemie für die Tiermedizin; 2020.
16. Tinker MK, White NA, Lessard P, Thatcher CD, Pelzer KD, Davis B et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet J* 1997; 29(6):448–53. doi: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb03157.x.

17. Uzal FA, Arroyo LG, Navarro MA, Gomez DE, Asín J, Henderson E. Bacterial and viral enterocolitis in horses: a review. *J Vet Diagn Invest* 2022; 34(3):354–75. doi: 10.1177/10406387211057469.
18. Schumacher J, Edwards JF, Cohen ND. Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases of the horse. *J Vet Intern Med* 2000; 14(3):258–65. doi: 10.1892/0891-6640(2000)014<0258:ciibdo>2.3.co;2.
19. Uzal FA, Navarro MA, Asin J, Henderson EE. Clostridial Diseases of Horses: A Review. *Vaccines (Basel)* 2022; 10(2). doi: 10.3390/vaccines10020318.
20. Uzal FA, Diab SS. Gastritis, Enteritis, and Colitis in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2015; 31(2):337–58. doi: 10.1016/j.cveq.2015.04.006.
21. Magalhães D, Cabral JM, Soares-da-Silva P, Magro F. Role of epithelial ion transports in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 310(7):G460–76. doi: 10.1152/ajpgi.00369.2015.
22. Zachos NC, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, In J, Blutt SE, Jonge HR de et al. Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. *J Biol Chem* 2016; 291(8):3759–66. doi: 10.1074/jbc.R114.635995.
23. Windhaber C, Heckl A, Csukovich G, Pratscher B, Burgener IA, Biermann N et al. A matter of differentiation: equine enteroids as a model for the in vivo intestinal epithelium. *Vet Res* 2024; 55(1):30. doi: 10.1186/s13567-024-01283-0.
24. Zietek T, Rath E, Haller D, Daniel H. Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion. *Sci Rep* 2015; 5:16831. doi: 10.1038/srep16831.
25. Hellman S. Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Vet Res* 2021; 52(1):108. doi: 10.1186/s13567-021-00976-0.
26. Zietek T, Giesbertz P, Ewers M, Reichart F, Weinmüller M, Urbauer E et al. Organoids to Study Intestinal Nutrient Transport, Drug Uptake and Metabolism - Update to the Human Model and Expansion of Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8:577656. doi: 10.3389/fbioe.2020.577656.
27. Middendorp S, Schneeberger K, Wiegerinck CL, Mokry M, Akkerman RDL, van Wijngaarden S et al. Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function. *Stem Cells* 2014; 32(5):1083–91. doi: 10.1002/stem.1655.
28. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7):676–82. doi: 10.1038/nmeth.2019.
29. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, van Es JH, van den Brink S et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011; 141(5):1762–72. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
30. VanDussen KL, Marinshaw JM, Shaikh N, Miyoshi H, Moon C, Tarr PI et al. Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. *Gut* 2015; 64(6):911–20. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306651.

31. Gonzalez LM, Williamson I, Piedrahita JA, Blikslager AT, Magness ST. Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration. *PLoS One* 2013; 8(6):e66465. doi: 10.1371/journal.pone.0066465.
32. Powell RH, Behnke MS. WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biol Open* 2017; 6(5):698–705. doi: 10.1242/bio.021717.
33. Stewart AS, Freund JM, Gonzalez LM. Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Vet J* 2018; 50(2):241–8. doi: 10.1111/evj.12734.
34. Stewart AS, Schaaf CR, Veerasammy B, Freund JM, Gonzalez LM. Culture of equine intestinal epithelial stem cells after delayed tissue storage for future applications. *BMC Vet Res* 2022; 18(1):445. doi: 10.1186/s12917-022-03552-6.
35. Kramer N, Pratscher B, Meneses AMC, Tschulenk W, Walter I, Swoboda A et al. Generation of Differentiating and Long-Living Intestinal Organoids Reflecting the Cellular Diversity of Canine Intestine. *Cells* 2020; 9(4). doi: 10.3390/cells9040822.
36. Staab JF, Lemme-Dumit JM, Latanich R, Pasetti MF, Zachos NC. Co-Culture System of Human Enteroids/Colonoids with Innate Immune Cells. *Curr Protoc Immunol* 2020; 131(1):e113. doi: 10.1002/cpim.113.
37. Ameen NA, Marino C, Salas PJI. cAMP-dependent exocytosis and vesicle traffic regulate CFTR and fluid transport in rat jejunum in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(2):C429–38. doi: 10.1152/ajpcell.00261.2002.
38. Ghanem E, Lövdahl C, Daré E, Ledent C, Fredholm BB, Boeynaems J-M et al. Luminal adenosine stimulates chloride secretion through A1 receptor in mouse jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(5):G972–7. doi: 10.1152/ajpgi.00346.2004.
39. Song P, Song W, Liu X, Jin C, Xie H, Zhou L et al. Function and expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator after small intestinal transplantation in mice. *PLoS One* 2013; 8(4):e62536. doi: 10.1371/journal.pone.0062536.
40. Cihak A, Burmester M, Geburek F, Feige K, Breves G. Electrophysiological characterization of electrolyte and nutrient transport across the small intestine in horses. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2009; 93(3):287–94. doi: 10.1111/j.1439-0396.2008.00882.x.
41. Collins D, Hogan AM, Skelly MM, Baird AW, Winter DC. Cyclic AMP-mediated chloride secretion is induced by prostaglandin F2alpha in human isolated colon. *Br J Pharmacol* 2009; 158(7):1771–6. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00464.x.
42. Nichols JM, Maiellaro I, Abi-Jaoude J, Curci S, Hofer AM. "Store-operated" cAMP signaling contributes to Ca²⁺-activated Cl⁻ secretion in T84 colonic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(8):G670–9. doi: 10.1152/ajpgi.00214.2015.
43. Sandle GI, Rajendran VM. Cyclic AMP-induced K⁺ secretion occurs independently of Cl⁻ secretion in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 303(3):C328–33. doi: 10.1152/ajpcell.00099.2012.

44. Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Ettayebi K, Blutt SE et al. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp Biol Med* (Maywood) 2014; 239(9):1124–34. doi: 10.1177/1535370214529398.
45. Kovbasnjuk O, Zachos NC, In J, Foulke-Abel J, Ettayebi K, Hyser JM et al. Human enteroids: preclinical models of non-inflammatory diarrhea. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4 Suppl 1(Suppl 1):S3. doi: 10.1186/scrt364.
46. Tse C-M, Yin J, Singh V, Sarker R, Lin R, Verkman AS et al. cAMP Stimulates SLC26A3 Activity in Human Colon by a CFTR-Dependent Mechanism That Does Not Require CFTR Activity. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019; 7(3):641–53. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.01.002.
47. Currid A, Ortega B, Valverde MA. Chloride secretion in a morphologically differentiated human colonic cell line that expresses the epithelial Na⁺ channel. *J Physiol* 2004; 555(Pt 1):241–50. doi: 10.1113/jphysiol.2003.059295.
48. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 2013; 340(6137):1190–4. doi: 10.1126/science.1234852.