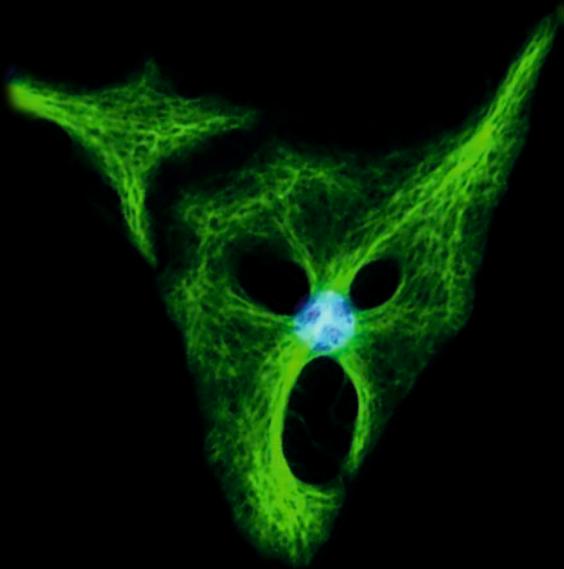


Isolierung, Charakterisierung und Differenzierung von Stammzellen des Spiralganglions

Veronika Gramling



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär – Anatomie, – Histologie und – Embryologie

Justus – Liebig – Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. medic. Stefan Arnhold

und

Klinik für Hals –, Nasen –, Ohrenheilkunde

Universitätsklinikum der Goethe Universität Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. med. Timo Stöver

Isolierung, Charakterisierung und Differenzierung von Stammzellen des Spiralganglions

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus – Liebig – Universität Gießen

Eingereicht von

Veronika Gramling, geb. Zecha

Tierärztin aus Erlenbach am Main

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus – Liebig – Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. med. vet. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. medic. Stefan Arnhold

Prof. Dr. med. Timo Stöver

Tag der Disputation: 25.04.2016

Für meine Mama und meinen Mann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie	1
1.2 Physiologie	2
1.3 Schwerhörigkeit	3
1.3.1 Formen	3
1.3.2 Ursachen	4
1.3.3 Vorkommen und Häufigkeit	4
1.4 Therapiemöglichkeit bei Schwerhörigkeit	5
1.4.1 Übersicht	5
1.4.2 Cochlea-Implantat	6
1.5 Stammzellforschung	7
1.5.1 Stammzellen allgemein	7
1.5.2 Adulte neurale Stammzellen	8
1.5.3 Neurale Stammzellen des Spiralganglions	11
1.6 Ziel der Arbeit	14
2 Material und Methode	16
2.1 Tiere	16
2.1.1 Maushaltung	16
2.1.2 Mauszucht	16
2.1.3 Rechtlicher Rahmen	17
2.2 Isolierung der Stammzellen des Spiralganglions	18
2.2.1 Mikrodissektion des Spiralganglions	18
2.2.2 Dissoziation der Zellen	19
2.2.3 Zellkultur	20
2.3 Isolierung der Stammzellen der Subventrikularzone	21
2.3.1 Mikrodissektion der Subventrikularzone	21
2.3.2 Zelldissoziation und Zellkultur der Subventrikularzone	21
2.4 Mikroskopie	22
2.4.1 Lichtmikroskopie	22
2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie	22

2.4.2.1	Immunhistochemische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie adhärenter Kulturen	22
2.4.2.2	Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie flotierender Zellen und Sphären.....	24
2.4.2.3	Antikörper.....	25
2.4.3	Elektronenmikroskopie.....	26
2.4.3.1	Rasterelektronenmikroskopie	26
2.4.3.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	27
2.4.4	Zeitraffermikroskopie	28
2.5	Propagation der Sphären.....	28
2.6	Zellzählung	29
2.6.1	Zellzählung mit Zählkammer	29
2.6.2	Zellzählung immunhistochemisch gefärbter Zellen.....	29
2.7	Evaluation des Neurosphären-Assays	29
2.8	Zellzahl-, Größen- und Volumenbestimmung der Sphären	30
2.9	Neurosphären-Assay mit transgenen Tieren.....	31
2.9.1	Klonalität in Abhängigkeit der Zelldichte und Kultivierungsdauer....	31
2.9.2	Klonalität in Abhängigkeit von Zelldichte und Bewegung.....	31
2.10	Agarose-Assay	32
2.11	Kollagen-Assay.....	33
2.12	Einzelzell-Assay.....	33
2.13	Differenzierung	34
2.14	Cryoschnitte der Cochlea und deren immunhistochemische Färbung	35
2.15	Statistik.....	36
2.16	Bildbearbeitung.....	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Morphologie von Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions und deren Sphären.....	37
3.1.1	Lichtmikroskopische Morphologie	37
3.1.2	Ultrastrukturelle Untersuchung der Sphären	39
3.2	Proliferation der Sphären.....	41
3.2.1	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Sphärenbildung	41
3.2.2	Wachstumsverlauf der Sphärenbildung.....	43
3.3	Proliferation und Nestinexpression der Sphären	46
3.4	Nachweis der Klonalität	48
3.4.1	Nachweise der Klonalität mittels transgener Tiere.....	48

3.4.2	Aggregation von Neurosphären in Abhängigkeit verschiedener Parameter	51
3.4.3	Klonales Wachstum von Sphären in semisoliden Medien	56
3.4.4	Klonales Wachstum von Sphären aus Einzelzellen.....	57
3.5	Differenzierung der Sphären des Spiralganglions	58
3.5.1	Morphologie differenzierter Zellen aus Sphären des Spiralganglions	58
3.5.2	TUJ und MAP2 als neuronale Marker	60
3.5.3	Differenzierung von Sphären in reife Zelltypen.....	61
4	Diskussion	65
4.1	Isolierung von Stammzellen des Spiralganglions	65
4.2	Charakterisierung von Stammzellen und Sphären des Spiralganglions	66
4.2.1	Morphologische Analogie zu Sphären des Gehirns.....	66
4.2.2	Aufbau und ultrastrukturelle Morphologie der Sphärenzellen	67
4.2.3	Proliferationsaktivität der Sphärenzellen	69
4.2.4	Wirkung von Wachstumsfaktoren auf sphärenbildende Stammzellen	70
4.2.5	Selbsterneuerung von Stammzellen.....	71
4.2.5.1	Propagation von Sphären.....	71
4.2.5.2	Markerexpression von Stammzellen.....	73
4.2.6	Klonalität in verschiedenen Assays	75
4.2.7	Multipotenz von Stammzellen	79
4.3	Ausblick	82
5	Zusammenfassung	85
6	Summary	86
7	Erklärung.....	87
8	Publikationen.....	88
9	Danksagung	90
10	Literaturverzeichnis.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Sphäre.....	9
Abb. 2: Darstellung des Neurosphären-Assays	10
Abb. 3: Mikrodissektion des Spiralganglions.....	19
Abb. 4: Illustration des Einzelzell-Assay	34
Abb. 5: Morphologie der Neurosphären.....	37
Abb. 6: Vergleich von Zellen und Sphären des Spiralganglions und der SVZ....	38
Abb. 7: Phalloidin-Färbung einer Sphäre.....	38
Abb. 8: Ultrastrukturelle Untersuchung von Sphären	40
Abb. 9: Sphärenbildung in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren.....	43
Abb. 10: Morphologie und Wachstumscharakteristika primärer und propagierter Sphären.....	45
Abb. 11: Proliferationsaktivität primärer und propagierter Sphären.....	47
Abb. 12: Nestinexpression primärer und propagierter Sphären	48
Abb. 13: Klonalitätsassay mit Hilfe grün-fluoreszierender Zellen	49
Abb. 14: Klonalitätsassay mit Hilfe fluoreszierender Zellen.....	50
Abb. 15: Formen klonaler und chimärer Sphären	51
Abb. 16: Parameter, die die Klonalität von Neurosphären beeinflussen.....	53
Abb. 17: Aggregation von Sphären.....	55
Abb. 18: Sphärenwachstum im Agarose-Assay.....	56
Abb. 19: Wachstumsverlauf von Sphären im NCFC-Assay	57
Abb. 20: Ergebnisse des Einzelzell-Assay.....	58
Abb. 21: Differenzierte Kulturen des Spiralganglions und der SVZ im Vergleich	59
Abb. 22: Zeitraffer-Aufnahmen einer anhaftenden Sphäre.....	60
Abb. 23: Neuronale Marker im neonatalen Spiralganglion.....	61
Abb. 24: Neuronale Marker in differenzierten Sphären des Spiralganglions	62
Abb. 25: MOSP-Expression in differenzierten Kulturen	63
Abb. 26: Nerven- und Gliazellen entstehen aus proliferierenden Zellen.....	63
Abb. 27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der differenzierten Kulturen.....	64

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der primären Antikörper	25
Tab. 2: Liste der sekundären Antikörper	26
Tab. 3: Auflistung der getesteten Wachstumsbedingungen	30

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
bzw.	Beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy5	Cyanin 5
D.h.	Das heißt
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DIV	Days <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DsRed	B6.Cg-Tg(CAG-DsRed*MST)1Nagy/J
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Gen.	Generation
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	C57BL/6-Tg(ACTbEGFP)10sb/J
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HS	Heparansulfat
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-I
Ki-67	Proliferationsmarkerprotein
kV	Kilovolt
MAP2	Mikrotubuli assoziiertes Protein
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
MOSP	Myelin/ oligodendrocyte specific protein
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Nestin	Neuroepithelial stem cell protein
NF-M	Neurofilament-M

NT-3	Neurotrophin 3
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLC γ	Phospholipase C-gamma
Sek.	Sekunde
Sox2	Sex determining region Y-box 2
Std.	Stunde
SVZ	Subventrikularzone
Tab.	Tabelle
TUJ	Neuron-specific class III beta-tubulin
TRITC	Tetramethylrhodamin
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Anatomie

Das periphere Hörorgan ist im Schläfenbein (Os temporale) lokalisiert. Es werden drei Anteile unterschieden. Zunächst das äußere Ohr (Auris externa), bestehend aus Ohrmuschel (Auricula) und äußerem Gehörgang (Meatus acusticus externus), das die ankommenden Schallwellen aufnimmt. Anschließend folgt das Mittelohr (Auris media). Neben dem Trommelfell (Membrana tympani) und der Paukenhöhle (Cavum tympani) setzt es sich aus den drei Gehörknöchelchen (Ossicula auditoria), Hammer (Malleus), Amboss (Incus), Steigbügel (Stapes) sowie den zwei Mittelohrmuskeln (Musculus stapedius, Musculus tensor tympani) und der Eustachischen Röhre (Tuba auditiva) zusammen. Die Tuba auditiva stellt eine Verbindung zwischen der Paukenhöhle und dem Nasenrachenraum zum Ausgleich atmosphärischer Druckdifferenzen her. Der Steigbügel ist in das ovale Fenster einpasst, das die Verbindung zum flüssigkeitsgefüllten Innenohr bildet. Das Innenohr (Auris interna), der dritte Anteil des Hörorgans, liegt in der Pars petrosa des Schläfenbeins und enthält das Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan) sowie das Hörorgan, das aufgrund seines Aussehens auch als Schnecke (Cochlea) bezeichnet wird. Die Hörschnecke besteht aus mehreren zusammenhängenden Gängen, die als Labyrinth bezeichnet werden. Man unterscheidet dabei das vestibuläre Labyrinth und das cochleäre Labyrinth, die über den Ductus reuniens miteinander verbunden sind. Weiterhin kann man einen häutigen Anteil, der den knöchernen Anteil auskleidet, unterscheiden. Der häutige Anteil enthält Endolymphe, eine der Ionenzusammensetzung des intrazellulären Milieus ähnliche Flüssigkeit, und Zilien tragende Sinneszellen, sogenannte Haarzellen. Das häutige Labyrinth der Cochlea wird auch als Ductus cochlearis bezeichnet und windet sich beim Menschen zweieinhalbmal spiralförmig um eine knöchernen Achse (Modiolus). Zwischen dem häutigen und dem knöchernen Anteil befindet sich eine Flüssigkeit, die man als Perilymphe bezeichnet und die in ihrer Zusammensetzung der des Liquor cerebrospinalis gleicht (Nickel et al. 1992).

Die Cochlea besteht aus drei getrennten Hohlräumen: der Scala media, Scala vestibuli und der Scala tympani. Die Basilarmembran bildet den Boden der Scala media (Ductus cochlearis). Im Querschnitt weist sie eine dreieckige Form auf und enthält die kaliumreiche, natriumarme Endolymphe, die von der Stria vascularis gebildet wird.

Oberhalb liegt die Scala vestibuli, die mit Perilymphe gefüllt und durch die Reissner-Membran von der Scala media getrennt ist. Die Scala tympani liegt unterhalb der Basilarmembran und ist in der Schneckenspitze über das Helicotroma mit der Scala vestibuli verbunden. Der Ductus cochlearis endet an dieser Stelle blind. Das Corti-Organ liegt der Basilarmembran auf und enthält Stützzellen (von innen nach außen: innere und äußere Pfeilerzellen, Deiters-Zellen, Hensen-Zellen, Claudius-Zellen) und darin eingebettete Sinneszellen (eine Reihe innerer und drei Reihen äußerer Haarzellen). Die Haarzellen tragen an der apikalen Membran feine Härchen, sogenannte Stereozilien, und werden von der Tektorialmembran, die von der Lamina spiralis ossea ausgeht, bedeckt. Jede der etwa 3000 inneren Haarzellen wird durch mehrere afferente Fasern des Nervus cochlearis bedient, wohingegen die 12000 äußeren Haarzellen vorwiegend von efferenten Hörnervenfasern innerviert werden (Nickel et al. 1992). Man unterscheidet daher zwei Typen von Spiralganglionneuronen (Berglund & Ryugo 1987, Liberman 1980, Rosenbluth 1962): Typ I-Neurone innervieren stets nur eine innere Haarzelle, wobei die innere Haarzelle von mehreren Neuronen kontaktiert wird. Typ II-Neurone treten mit den äußeren Haarzellen in Kontakt. 95% der Neurone sind Typ I-Neurone und stark myelinisiert, wohingegen Typ II-Neurone 5% ausmachen und nicht bemerkt sind (Spendlin 1971).

Das Ganglion cochleare, auch Ganglion spirale cochleare genannt, ist im knöchernen Modiolus der Schnecke lokalisiert. Als Nervus cochlearis verlaufen die Nervenfasern des Ganglion spirale zusammen mit dem Nervus vestibularis als Nervus vestibulocochlearis, VIII. Hirnnerv, im Meatus acusticus internus in Richtung des Hirnstamms. In der Medulla oblongata beginnt die zentrale Hörbahn mit dem Nucleus cochlearis und endet schließlich, nachdem sie mehrerer Nuclei passiert hat, im Temporallappen des Großhirns (Nickel et al. 1992).

1.2 Physiologie

Nachdem ankommende Schallwellen über die Ohrmuscheln und den äußeren Gehörgang trichterförmig weitergeleitet wurden und über das Trommelfell, die drei Gehörknöchelchen sowie das ovale Fenster zum Innenohr übertragen wurden, führt der Schall zu einer wellenartigen Anregung der Perilymphe. Je nach Frequenz verschiebt diese die Basilarmembran an verschiedenen Stellen. Als Wanderwelle setzt sie sich in Richtung des Helicotromas fort.

Besonderen Charakter erfährt sie durch den zur Spitze hin enger werdenden knöchernen Kanal und die breiter werdende Basilarmembran. Das Amplitudenmaximum der Wanderwelle ist für jede Frequenz spezifisch, bildet sich an einem bestimmten Ort der Basilarmembran ab und wird als Tonotopie bezeichnet. Hohe Frequenzen werden somit an der Basis der Cochlea und tiefe Frequenzen in der Nähe des Helicotroma repräsentiert. Durch die Verschiebung der Basilarmembran werden die Haarzellen über Auslenkung der Zilien mit darauffolgender Ionenverschiebung angeregt und generieren Aktionspotentiale, die über die bipolaren Nervenzellen des Spiralganglions aufgenommen und weiter transportiert werden (Hick & Hick 2000).

1.3 Schwerhörigkeit

1.3.1 Formen

„Nicht sehen trennt den Menschen von den Dingen. Nicht hören trennt den Menschen vom Menschen.“ Dieses Zitat des Philosophen Immanuel Kant (1724-1804) beschreibt in passender Weise die Situation in der sich taube oder schwerhörige Menschen befinden. Die aus Taubheit resultierende verminderte soziale Interaktion führt nicht selten zu Isolation und Vereinsamung betroffener Menschen. Oftmals gehen damit intellektuelle und ökonomische Folgen einher (Oshima et al. 2010). Umso wichtiger erscheint daher die Verbesserung bekannter oder die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung von Hörverlust.

Da dem Symptom der Schwerhörigkeit (Hypakusis) mannigfaltige Ursachen zugrunde liegen können, bedient man sich weiterer Einteilungen. Schalleitungsschwerhörigkeiten können von Schallempfindungsschwerhörigkeiten unterschieden werden. Schalleitungsschwerhörigkeiten haben ihre pathologische Veränderung im Bereich des äußeren Ohrs oder des Mittelohrs. Schallempfindungsschwerhörigkeiten sind dagegen im Innenohr oder in zentraler gelegenen Bereichen lokalisiert. Generell kann zwischen gemischten Schwerhörigkeiten und reinen Innenohrschwerhörigkeiten unterschieden werden. Das Auftreten kann uni- oder bilateral sein und es kann Restgehör vorhanden sein oder nicht. Man unterscheidet zwischen den häufiger vorkommenden cochleären oder sensorischen Schwerhörigkeiten, die die Cochlea betreffen, oder den neuralen oder retrocochleären Schwerhörigkeiten, die durch eine Störung des Hörnervens bedingt sind.

Gemischte Formen werden als sensorineurale Schwerhörigkeit bezeichnet (Hick & Hick 2000; Probst et al. 2008).

1.3.2 Ursachen

Ursachen für eine Schädigung der Haarzellen des Corti-Organs sind beispielsweise toxische Wirkungen bestimmter Pharmaka wie Aminoglykoside oder Diuretika, aber auch Sucht- und Genussmittel wie Heroin, Alkohol und Tabak. Des Weiteren kommt es altersbedingt häufig zu degenerativen Prozessen und hierdurch zur Altersschwerhörigkeit. Eine der häufigsten Ursachen, vor allem bei jüngeren Menschen, ist jedoch die Lärmschädigung (Hick & Hick 2000; Probst et al. 2008). Lange Zeit wurde angenommen, dass die neurale Degeneration des Spiralganglions hauptsächlich als Folge einer Haarzellschädigung auftritt (Spoendlin 1984). Diese sekundären neuronalen Veränderungen können durch den Verlust von Haarzellen entstehen, die trophische Komponenten sezernieren (Fritzsche et al. 1997). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass der neuronale Verlust auch ohne vorherige Schädigung der Haarzellen einhergehen kann. So konnte gezeigt werden, dass Lärmeinwirkung zu Verlust von Neuronen führen kann, selbst wenn dabei keine Haarzellen geschädigt wurden (Kujawa & Liberman 2009). Primäre Ursachen für Schwerhörigkeit der neuronalen Form sind außerdem Tumore des inneren Gehörgangs und Kleinhirnbrückenwinkeltumore, Kompressionen des Hörnervens durch Gefäßschlingen oder entzündliche Veränderungen, bedingt durch multiple Sklerose (Hick & Hick 2000; Probst et al. 2008). Ebenfalls zeigten Chemotherapeutika wie Cisplatin eine schädigende Wirkung auf Neurone des Spiralganglions (Hinojosa et al. 1995). Abgestorbene Nervenzellen können nicht wieder regeneriert werden (Hick & Hick 2000; Probst et al. 2008).

1.3.3 Vorkommen und Häufigkeit

Laut Angaben der World Health Organization leiden ungefähr 5% der Weltbevölkerung, das heißt 360 Millionen Menschen weltweit, an einer Schwerhörigkeit. Der Großteil dieser Betroffenen kommt aus Ländern mit geringem oder mittlerem Einkommen. Bei ungefähr einem Drittel der Menschen über 65 Jahren tritt eine Schwerhörigkeit auf (World Health Organization 2015). In Deutschland lebten Ende 2013 circa 300000 taube oder hochgradig schwerhörige, das heißt als schwerbehindert geltende, Menschen.

Im Vergleich zu den Vorjahren ist ein steigender Trend zu verzeichnen (Statistisches Bundesamt 2014). Die weltweite Produktion von Hörgeräten deckt nicht einmal 10% des Bedarfs (World Health Organization 2015). Dies verdeutlicht, dass es immer wichtiger wird, Therapien auszubauen oder neue Ansätze zu entdecken und zu erschließen. Weiterhin treten Präventivmaßnahmen gegen Hörverlust stärker in den Fokus, denn die Entstehung des Hörverlusts zu vermeiden gestaltet sich wesentlich einfacher als eine bestehende Schädigung des Gehörs zu behandeln.

1.4 Therapiemöglichkeit bei Schwerhörigkeit

1.4.1 Übersicht

Je nach Art und Lokalisation der Schwerhörigkeit steht eine Vielzahl an Therapiemöglichkeiten zu Verfügung. Im Folgenden sollen die gängigsten Behandlungsformen kurz dargestellt werden. Klassische Hörgeräte, wie Im-Ohr-Geräte (IdO) oder Hinter-dem-Ohr-Geräte (HdO), dienen dazu, das ankommende Signal zu verstärken. Das setzt voraus, dass die Cochlea und das Spiralganglion in solchen Fällen noch funktionstüchtig sind. Bei einseitiger Surditas kann am tauben Ohr ein Mikrofon und auf der gesunden Seite ein normales Hörgerät angebracht werden. Über Funk werden dann die Geräusche vom tauben auf das gesunde Ohr übertragen (Contralateral Routing of Signals; CROS). Somit lässt sich eine Art Richtungshören und eine bessere Zuordnung von Schallquellen erreichen. Über operative Intervention können knochenverankerte Implantate wie beispielsweise Bonebridge-Implantate zum Einsatz kommen, die die Funktionsfähigkeit des Innenohrs voraussetzen. Im Bereich der aktiven Mittelohrimplantate gibt es die sogenannte Vibrant Soundbridge, die die Schallsignale in mechanische Schwingungen konvertiert, die die Gehörknöchelchen stimulieren. Andererseits werden Systeme angewandt, die direkt die Perilymphe in Schwingungen versetzen (Direct Acoustic Cochlear Stimulator; DACS). Darüber hinaus gibt es Cochlea-Implantate (CI), die die Funktion der Cochlea ersetzen können und die Hörnervenfaser direkt stimulieren. Diese Implantate gibt es auch in kombinierter Form mit Hörgeräten, um die Signale für das vorhandene Restgehör zu verstärken und gleichzeitig die degenerierten Haarzellen zu ersetzen. Weitere Implantationstechniken basieren auf Hirnstamm-Implantaten (Auditory brain stem implant; ABI), die den Nucleus cochlearis elektrisch stimulieren (Portillo et al. 1993).

Diese Operationen sind chirurgisch weitaus komplexer als bei Cochlea-Implantaten, wodurch sich auch die medizinischen Risiken erhöhen (Nevison et al. 2002).

1.4.2 Cochlea-Implantat

Laut Angaben der Deutschen Cochlear Implant Gesellschaft e. V. gibt es deutschlandweit circa 30000 Träger eines Cochlea-Implantats, weltweit sollen es schätzungsweise 300000 Träger sein, wobei die Zahlen stetig ansteigen (Stand: November 2012). Bei einer jährlichen Implantationsrate von circa 3000 neuen Cochlea-Implantaten in Deutschland wird die Bedeutung dieser Therapieform offensichtlich. Cochlea-Implantate sind implantierbare Hörsysteme, die die Funktion des sensorischen Epithels des Corti-Organs ersetzen können. Dabei werden über einen Audioprozessor, der der Ohrmuschel kaudal direkt anliegt, Schallwellen über ein Mikrofon aufgenommen, in digitale Signale konvertiert und an eine Sendespule übertragen. Die Sendespule, die etwas weiter kaudal am seitlichen Kopf befestigt wird, überträgt die Signale auf das unter der Haut platzierte Implantat. An dieser Stelle werden elektrische Impulse gebildet und an den weichen, flexiblen Elektrodenträger, der sich in der Cochlea spiralg aufwindet, weitergeleitet. Funktionell kann hierdurch die elektrische Spannung, die normalerweise von den Haarzellen aufgebaut wird, durch die Elektroden gebildet werden. Der physiologischen Tonotopie nachempfunden, sind die ausgesendeten Signale an der Basis der Elektrode sehr hochfrequent und werden zur Spitze hin immer niederfrequenter. Die Mehrzahl der Patienten, die von sensorischer oder sensorineuraler Schwerhörigkeit betroffen sind, kann mit Hilfe eines Cochlea-Implantats wieder hören. Durch die elektrische Stimulation werden Spiralganglionzellen erregt, wodurch im Gehirn ein Höreindruck entsteht (Wilson & Dorman 2008). Selbst vollständig ertaubte Menschen können bei intakten Hörnerven durch dieses Verfahren wieder hören. Um einen wirkungsvollen Höreindruck zu erhalten, ist das Vorhandensein von Neuronen des Spiralganglions notwendig (Otte et al. 1978), da sonst die Informationen des Implantats nicht weitergeleitet werden können. Die langfristige elektrische Stimulation hat dabei keine negativen Auswirkungen auf die Nervenzellen des Spiralganglions (Shepherd et al. 1983).

1.5 Stammzellforschung

1.5.1 Stammzellen allgemein

Der Verlust von Neuronen des Spiralganglions beeinträchtigt den Wirkungsgrad von Hörgeräten und Cochlea-Implantaten (Incesulu & Nadol 1998). Die Reparatur oder der Ersatz dieser Nervenzellen könnte durch die Transplantation von exogenen Stammzellen in das beeinträchtigte Innenohr möglich sein (Zhang et al. 2013).

Damit eine Zelle als Stammzelle gilt, muss sie bezeichnende Kriterien erfüllen. Eine Stammzelle ist in der Lage, neue Stammzellen hervorzubringen und darüber hinaus sich selbst zu erneuern. Damit ist eine Stammzelle potentiell unsterblich. Die entstandenen Tochterzellen können zudem in verschiedene Zelltypen des Körpers ausdifferenzieren (Sell 2013).

Als Stammzellen bezeichnet man daher Zellen, die noch keine oder eine geringe Differenzierung aufweisen. Durch mitotische Teilung können entweder neue Stammzellen oder spezialisierte Zelltypen entstehen. Neurale Stammzellen sind folglich in der Lage sich symmetrisch und asymmetrisch zu teilen (Morshead et al. 1998). Bei der symmetrischen Teilung entstehen aus einer Stammzelle zwei gleichartige Tochterzellen. Die asymmetrische Teilung der Stammzelle bringt eine differenzierte Progenitorzelle und ein Replikat der Stammzelle selbst hervor, sie erneuert sich folglich selbst. Somit werden sowohl undifferenzierte Stammzellen neu gebildet als auch differenzierte Vorläuferzellen, die nicht weiter teilungsfähig sind.

Anhand ihres Potentials können Stammzellen in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Bis zum 8-Zell-Stadium nach der Befruchtung der Eizelle sind frühembryonale Zellen totipotent, das heißt sie können uneingeschränkt in jedes beliebige Gewebe des Körpers differenzieren und einen vollständigen Organismus bilden. In der darauffolgenden Embryonalentwicklung sind die Zellen pluripotent und können somit in die Gewebe der drei Keimblätter ausdifferenzieren. Im Fötus und Adulten sind die Stammzellen noch multipotent und können organspezifisch determiniert in Gewebe differenzieren, was vor allem der Regeneration dient. Beispielfhaft lassen sich hier die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks nennen, die sich zu allen Blutzelltypen spezialisieren können.

Aufgrund des Potentials in verschiedene Gewebe differenzieren zu können, rücken Stammzellen immer weiter in den Fokus neuer Therapieansätze.

Dem Einsatz und der Forschung mit embryonalen Stammzellen, vor allem humaner Herkunft, stehen große ethische Bedenken gegenüber, was strenge rechtliche Reglementierungen zur Folge hat (Beier 2002). Die therapeutische Verwendung adulter Stammzellen hingegen könnte ethische und teratogene Bedenken, die mit der Forschung an embryonalen Stammzellen verbunden sind, umgehen.

1.5.2 Adulte neurale Stammzellen

In ruhenden Geweben wie beispielsweise der Leber liegen die Zellen in differenzierter Form vor, sodass in der Regel keine Teilung mehr stattfindet. Diese reversibel postmitotischen Zellen können durch Stimulation wieder in die Teilung übergehen, woran eine Beteiligung der Stammzellen vermutet wird. Bei irreversibel oder fixiert postmitotischen Zellen wie Herz- oder Nervenzellen ist dagegen keine Teilung mehr möglich. Doch auch bei diesen lange als permanent angesehenen Geweben scheint ein regeneratives Potential, basierend auf Stammzellaktivität, vorhanden zu sein (Baumgärtner & Gruber 2011). Altman (1962) setzte Läsionen am Gehirn von Ratten und konnte beobachten, dass Neurone daraufhin proliferierten. Dies waren die ersten Anzeichen dafür, dass auch im adulten Gehirn von Säugetieren noch Proliferation möglich zu sein schien. Im Laufe der Jahre bestätigte sich die Annahme, dass im adulten Gehirn noch Stammzellen zu finden sind (Gage et al. 1995). Einer dieser Bereiche ist die sogenannte Subventrikularzone (SVZ), die sich an der lateralen Wand der Seitenventrikel des Gehirns befindet. Im adulten Gehirn von Säugetieren gibt es diese und andere spezielle Nischen, die neurale Stammzellen enthalten. Diese Nischen sind in der Lage kontinuierlich neue Neurone zu bilden (Pastrana et al. 2011).

Seit Einführung des Neurosphären-Assays (Reynolds & Weiss 1992) wurde eine Vielzahl von neuronalen Stammzellen mithilfe dieser Technik isoliert. Die sogenannten „Neurospheres“ sind frei schwimmende, kugelförmige Kolonien, die aus neuronalen Vorläuferzellen entstanden sind (Gritti et al. 1996; Reynolds & Weiss 1992; Reynolds & Weiss 1996). Im serumfreien Medium mit nicht adhäsiver Oberflächenbeschichtung entstehen unter Zugabe von Mitogenen Sphären im sogenannten Neurosphären-Assay mit dem Ziel der Selektion von Stammzellen (Ladiwala et al. 2012; Reynolds & Weiss 1992). Da Stammzellen über ein hohes proliferatives Potential verfügen, bilden diese in einer Suspensionskultur klonale, frei flotierende Sphären (**Abb. 1**).

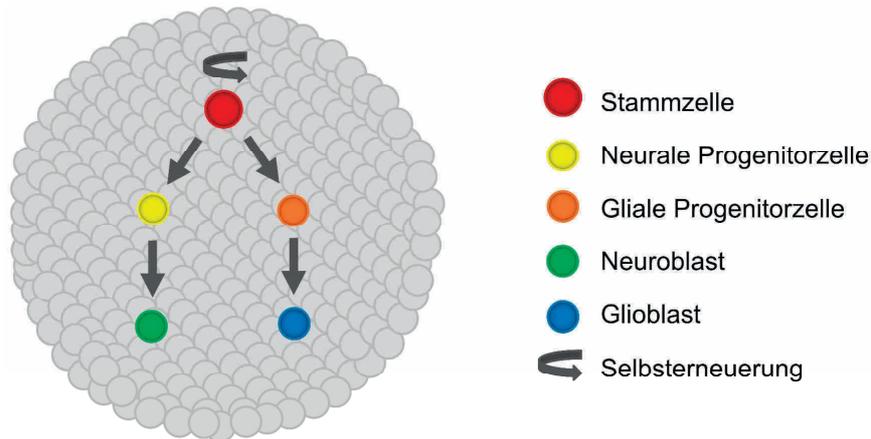


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Sphäre. Innerhalb der Sphäre befindet sich die Stammzelle, die sich zum einen selbst erneuern und zum anderen in verschiedene gliale und neuronale Vorläuferzellen teilen kann. Aus diesen Progenitorzellen entwickeln sich schließlich jeweils Glioblasten und Neuroblasten (Qian et al. 2000).

EGF und bFGF, auch FGF2 genannt, kommen standardmäßig bei Assays von Stammzellen des Gehirns zur Anwendung (Gritti et al. 1996; Reynolds & Weiss 1992). Jeder Faktor kann dabei eigenständig die Proliferation neuraler Stammzellen auslösen, wobei beide zusammen bei neuralen Stammzellen des Gehirns einen synergistischen Effekt zeigten (Tropepe et al. 1999). EGF fördert *in vivo* die Proliferation und das Überleben neuraler Vorläuferzellen (Kuhn et al. 1997). bFGF soll hauptsächlich über den FGF-Rezeptor-1 binden (Johnson & Williams 1993). Für die Proliferation neuraler Stammzellen des Striatums stellte sich außerdem IGF-1 als Synergist von EGF und bFGF heraus (Arsenijevic et al. 2001) und wurde zudem im Neurosphären-Assay verwendet. Da die Bindungsaffinität des bFGF zum Rezeptor und der mitogene Effekt durch Heparansulfat (HS) verstärkt wird (Brickman et al. 1995; Ornitz & Leder 1992; Roghani et al. 1994), fand dieses Proteoglycan zudem in eigenen Versuchen Anwendung.

Innerhalb des Assays überlebt eine geringe Anzahl von Zellen, die die Fähigkeit zur Proliferation beibehalten und in einem undifferenzierten Stadium innerhalb der Neurosphäre verharren (Deleyrolle & Reynolds 2009). Nach einer Wachstumsphase von circa einer Woche können die Neurosphären passagiert, das heißt vereinzelt und erneut kultiviert werden, was in einer Erhöhung der Sphärenanzahl und somit einer Anreicherung von Stammzellen resultiert.

Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren koppeln die Sphären an adhäsiven Substraten an und differenzieren in ausgereifte Phänotypen (**Abb. 2**).

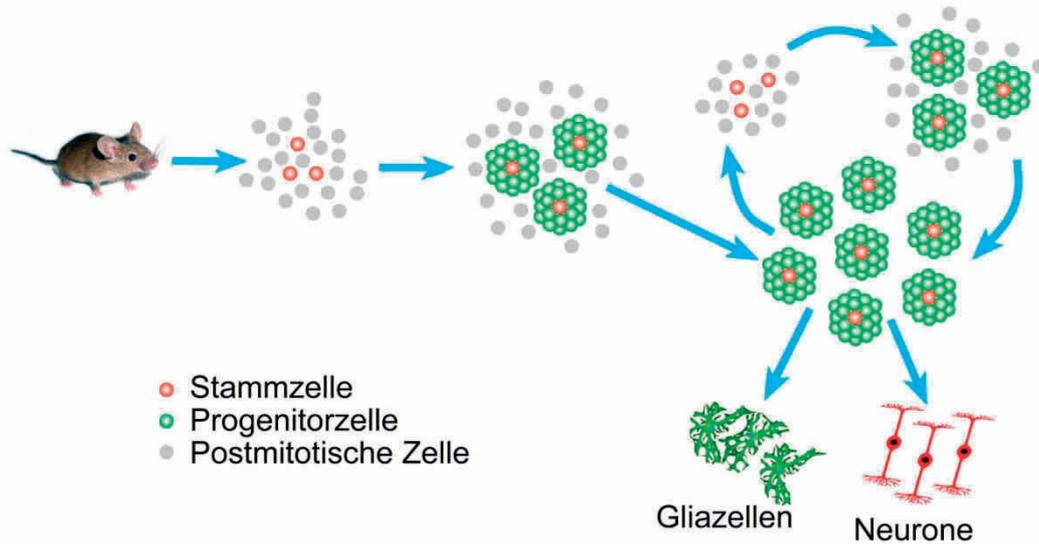


Abb. 2: Darstellung des Neurosphären-Assays. Dieses Schema zeigt die Schritte des Neurosphären-Assays. Aus dem Innenohr neonataler Mäuse wird das Spiralganglion isoliert, das sowohl Stammzellen als auch postmitotisch fixierte Zellen enthält. Aus diesen entstehen in einer Suspensionskultur freischwimmende Sphären, die einerseits Stammzellen, aber auch Progenitorzellen enthalten. Postmitotisch fixierten Zellen fehlt die Fähigkeit zur Sphärenbildung. Die gebildeten Sphären werden im Zuge der Propagation vereinzelt. Aus Stammzellen entstehen erneut Sphären, die das Potential besitzen, sich in reife Zelltypen, wie Neurone oder Gliazellen zu differenzieren. Sphären können mehrfach propagiert und schließlich differenziert werden.

Im Innenohr konnten sphärenbildende Stammzellen des Utriculus (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007b; Senn et al. 2007; Slattery et al. 2014), des Corti-Organs (Diensthuber et al. 2009; Di Santo et al. 2013; Malgrange et al. 2002; Oshima et al. 2007b; Senn et al. 2007), der Stria vascularis (Oshima et al. 2007b), des Spiralganglions (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a,b; Rak et al. 2014b; Rask-Andersen et al. 2005; Senn et al. 2007; Zhang et al. 2011) und auch im Nucleus cochlearis (Rak et al. 2011; Rak et al. 2014a; Volkenstein et al. 2013) separiert werden. Obwohl Stammzellen aus verschiedenen Geweben gemeinsame Merkmale aufweisen, zeigen sie dennoch wichtige Unterschiede (Lobo et al. 2003).

1.5.3 Neurale Stammzellen des Spiralganglions

Mit Hilfe des Neurosphären-Assays wurden bereits verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die neurale Stammzellen des Spiralganglions isolierten (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a,b; Rask-Andersen et al. 2005; Senn et al. 2007; Zhang et al. 2011). Rask-Andersen et al. (2005) gelang die Isolierung von Stammzellen aus Proben von adulten Meerschweinchen und Menschen, wohingegen in den übrigen Forschergruppen, wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, an neonatalen Tieren geforscht wurde. Die Präparation des Spiralganglions wurde mit zunehmendem Alter der Tiere aufgrund der Ossifikation erschwert, wodurch die Anzahl der isolierten Zellen abnahm (Oshima et al. 2007a).

Als Zugabe zum Medium wurden die Mitogene EGF und bFGF (Rask-Andersen et al. 2005; Zhang et al. 2011) zur Proliferationsstimulation mit IGF-1 und HS (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a,b; Senn et al. 2007) verwendet, sodass Neurosphären entstanden. Oshima et al. (2007a) quantifizierten, dass aus 10000 Zellen des Spiralganglions circa 97 Sphären an DIV 7 entstanden, die eine ungefähre Größe von 95 μm aufwiesen.

Verschiedene Parameter wie die Verarbeitungszeit oder das postmortale Intervall wurden in Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung beim Menschen untersucht. Die Sphärenbildung wurde durch die Dauer der Verarbeitung, das heißt die Mikrodissektion und Vereinzelung der Stammzellen, bis hin zum Kultivierungsstart nicht nachteilig beeinträchtigt (Oshima et al. 2007a). Die Morphologie der Sphären veränderte sich ebenfalls nicht, ungeachtet dessen, ob Zellen sofort oder 10 Tagen post mortem ausgesät wurden (Senn et al. 2007). Die Fähigkeit der Stammzellen zur Sphärenbildung ging allerdings 5 und 10 Tage post mortem im Vergleich zu frischem Material deutlich zurück (Senn et al. 2007). Erstaunlicherweise erhöhte sich die Anzahl der Sphären bei Verwendung von Spiralganglionzellen im Vergleich zu frischem Gewebe 6 Stunden oder 1 Tag post mortem (Senn et al. 2007). Die Veränderungen im absterbenden Gewebe wie Hypoxie, Azidose und Nährstoffmangel wurden als eine Stimulation oder positive Selektion auf Stammzellen gewertet. Sphären, die aus postmortalen Spiralganglien entstanden, verloren mit zunehmender Sterbedauer die Fähigkeit zur Differenzierung in reife Zelltypen (Senn et al. 2007).

Die Reduktion der Stammzellen binnen der ersten drei Lebenswochen, die anhand des zunehmenden Unvermögens der Sphärenbildung gemessen wurde, wurde als Zeichen für den Verlust der Stammzeleigenschaften gewertet (Oshima et al. 2007a). Damit einhergehend zeigte sich ein abnehmendes Expressionslevel von Zellmarkern binnen der ersten drei Lebenswochen (Oshima et al. 2007a).

Nestin als Marker für neurale Vorläuferzellen (Lendahl et al. 1990) wurde im neonatalen Spiralganglion (Oshima et al. 2007b) und in Sphären des Spiralganglions nachgewiesen (Oshima et al. 2007a,b; Rask-Andersen et al. 2005; Zhang et al. 2011). Musashi1, als weiterer neuraler Progenitorzellmarker (Kaneko et al. 2000) wurde außerdem im neonatalen Spiralganglion und in Sphären des Spiralganglions entdeckt (Oshima et al. 2007b). Zhang et al. (2011) konnten Sox2 als Marker für multipotente neurale Progenitorzellen (Bazan et al. 2004) bestätigen. Weitere neuronale Stammzellmarker und Marker des reifenden Innenohrs wurden sowohl in Spiralganglien selbst oder in Sphären, die aus Spiralganglien entstanden sind, detektiert (Oshima et al. 2007a,b). Über die Inkorporation von BrdU, das anstelle des Thymidins bei der Replikation der DNA eingebaut wird und somit mitotische Zellen markiert, konnte dargelegt werden, dass die Sphären des Spiralganglions mitotisch aktiv sind (Oshima et al. 2007b; Rask-Andersen et al. 2005; Zhang et al. 2011).

Die Selbsterneuerung konnte bestätigt werden, da Sphären des Spiralganglions über Passagieren expandiert werden konnten (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a; Rask-Andersen et al. 2005; Senn et al. 2007; Zhang et al. 2011). Dabei wurde die Propagation der Sphären nach DIV 5 (Oshima et al. 2007a; Senn et al. 2007) oder DIV 7 (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007b) durchgeführt. Zur Differenzierung wurden standardmäßig Sphären der sekundären oder einer höheren Generation kultiviert (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a,b; Rask-Andersen et al. 2005; Senn et al. 2007). Da die Selbsterneuerung eine wesentliche Eigenschaft von Stammzellen darstellt, sollte gewährleistet werden, dass Sphären, die tatsächlich aus Stammzellen gebildet wurden, für diese Versuche verwendet werden. Durch das Aussäen einer einzelnen Zelle von dissoziierten Sphären im Einzelzell-Assay, das heißt der Kultivierung einer sekundären Generation, sollte in den hier dargelegten Versuchen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung ebenfalls bewiesen werden.

Kreatin wurde als Faktor identifiziert, der die Propagation der Sphären des Spiralganglions positiv beeinflusst (Di Santo et al. 2013).

Aufgrund der Anzahl der gebildeten Sphären nach Propagation schlossen Oshima et al. (2007a) darauf, dass eine Sphäre des Spiralganglions circa ein bis drei Stammzellen enthält.

Die mRNA von Tropomyosin Rezeptor Kinasen TrkB und TrkC konnte im Spiralganglion nachgewiesen werden (Ernfors et al. 1992). Auch in der mRNA von Sphärenzellen des Spiralganglions konnten TrkB und TrkC zudem nachgewiesen werden (Oshima et al. 2007b, Rask-Andersen et al. 2005). Der Rezeptor TrkB bindet das Neurotrophin BDNF und der Rezeptor TrkC bindet NT-3, die als chemische Lockstoffe für das Auswachsen der Neuriten und die spätere Entwicklung der Neurone der Cochlea wichtig erschienen (Pirvola et al. 1992). Diese beiden Neurotrophine förderten das neuronale Wachstum von kultivierten Neuronen des Spiralganglions (Lefebvre et al. 1994) und Gleiches *in vivo* (Shinohara et al. 2002).

Die Aktivierung der Trk-Rezeptoren setzt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. Durch die Bindung des Liganden wird der Rezeptor phosphoryliert und über die Aktivierung von Ras, Raf und MEK die Phosphorylierungskaskade der MAP-Kinasen induziert (Huang & Reichardt 2003). Hierdurch kommt es zur Transkription im Nucleus und der metabolischen Aktivierung der Zelle. Folgen sind die Proliferation, die Differenzierung, das Überleben, das axonale und dendritische Auswachsen und die neuronale Plastizität der Zellen (Huang & Reichardt 2003). So konnte im Tiermodell bereits nachvollzogen werden, dass die beiden Neurotrophine BDNF und NT-3 das Aussprossen der Zellausläufer verstärkten (Wise et al. 2005). In Kulturen mit Explantaten von Spiralganglien neonater Mäuse und Wüstenrennmäuse förderte BDNF in Kombination mit NT-3 das neuronale Überleben (Mou et al. 1998). Bekanntermaßen haben Gliazellen eine ernährende und unterstützende Funktion für Nervenzellen. Daneben konnte gezeigt werden, dass auch Stützzellen zur Sezernierung von NT-3 in der Lage sind (Stankovic et al. 2004) und somit neuronales Überleben fördern können. Im Hinblick auf Cochlea-Implantate sind dies wichtige Erkenntnisse auf dem Weg zur Verbesserung der Funktion dieser Systeme.

BDNF (Di Santo et al. 2013; Zhang et al. 2011) einzeln oder in Kombination mit NT-3 (Rask-Andersen et al. 2005; Oshima et al. 2007a;b) wurde ebenfalls bei Kulturen der adhärenen Sphären des Spiralganglions zur Unterstützung der neuronalen Differenzierung und dem Überleben hinzugefügt. Bei kultivierten Zellen des Nucleus cochlearis verbesserten NT-3 und BDNF die Überlebensfähigkeit der Neurone (Rak et al. 2014a).

Daneben förderte BDNF zusätzlich das axonale Wachstum (Rak et al. 2014a). Nachdem Sphären des Spiralganglions über mehrere Tage hinweg differenziert waren, zeigten sie lichtmikroskopisch bereits neuronale Morphologie (Oshima et al. 2007a). Zum Nachweis der Entstehung von Neuronen wurde TUJ allein (Di Santo et al. 2013) oder in Verbindung mit GFAP (Oshima et al. 2007a,b; Senn et al. 2007; Zhang et al. 2011) zum Nachweis der Gliazellen immunhistochemisch gefärbt. Zu Beginn der Differenzierung war nur geringe Expression von reifen Zellmarkern in Sphären nachzuweisen. Nach Adhärenz der Sphären, Anwachsen sowie 14 Tagen Differenzierungsbedingungen wurden diese jedoch hochreguliert (Oshima et al. 2007a). In den Kulturen mit Spiralganglionzellen waren keine Haarzellmarker nachweisbar (Oshima et al. 2007a). Marker für reife Neurone, Neurofilament-M und Peripherin, die von Typ II-Neuronen des Spiralganglions exprimiert werden (Hafidi 1998), konnten in den differenzierten Sphärenzellen des Spiralganglions detektiert werden (Oshima et al. 2007a). Bei Kulturen von Stammzellen des Spiralganglions aus adulten Meerschweinchen konnte über die Doppelfärbung für BrdU und TUJ bzw. GFAP gezeigt werden, dass die nervenzell- und gliazellähnlichen Zellen durch Teilung neu entstanden waren (Rask-Andersen et al. 2005).

Um die neuronale Differenzierung weiter voran zu treiben und zu optimieren, wurden verschiedene neurotrophe Faktoren getestet. Einerseits wurde das Neurokin Leukemia inhibitory factor (LIF) erprobt, das mehr Neurone und Gliazellen entstehen ließ, antiapoptotisch wirkte und die Teilungsrate erhöhte (Oshima et al. 2007b). Es zeigte sich ein synergistischer Effekt mit BDNF und NT-3 auf die Entstehung von Nervenzellen in den differenzierten Kulturen (Oshima et al. 2007 b). Andererseits steigerte Kreatin in Kombination mit BDNF zudem die Differenzierung in neuronale Zelltypen von Sphären des Spiralganglions (Di Santo et al. 2013). Taurin unterstützte in der Differenzierungskultur ebenso das Neuritenwachstum (Rak et al. 2014b).

1.6 Ziel der Arbeit

Durch die Anwendung eines modifizierten Neurosphären-Assay sollten Stammzellen des Spiralganglions neonataler Mäuse isoliert werden (Diensthuber et al. 2009; Oshima et al. 2007a; Li et al. 2003). Zur morphologischen und funktionellen Charakterisierung dieser sphärenbildenden Stammzellen wurden die Stammzellen isoliert, kultiviert und propagiert. Zunächst sollten die Sphären morphologisch und ultrastrukturell auf Besonderheiten hin untersucht werden.

Mittels immunhistochemischer Verfahren wurden der Stamm- und Progenitorzellmarker Nestin sowie Proliferationsmarker wie BrdU und Ki-67 in den Sphärenzellen nachgewiesen und detaillierte Expressionsprofile erstellt. In weiteren Versuchen sollte die Fähigkeit der Stammzellen zur Selbsterneuerung durch Propagation über mehrere Generationen getestet werden. Anhand des Neurosphären-Assays sollte der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf das Potential der Sphärenbildung reevaluiert werden. Dabei wurden die Mitogene EGF, IGF-1 sowie bFGF mit und ohne Kombination von Heparansulfat in Hinblick auf die Stimulation der Proliferation untersucht.

Über Videomikroskopie konnte bereits gezeigt werden, dass die Neurosphären des Spiralganglions durch amöboide Fortbewegung äußerst motil erschienen (Rask-Andersen et al. 2005). Untersucht werden sollte daher, wie stark der Faktor Aggregation bei der Sphärenbildung eine Rolle spielt. Verschiedene Arbeiten mit Stammzellen haben mit Hilfe farblich markierter Zellen die Klonalität von Neurosphären in Frage gestellt (Chaddah et al. 2012, Coles-Takabe et al. 2008, Jessberger et al. 2007, Singec et al. 2006). Daran anknüpfend wurden EGFP- und DsRed-fluoreszierende Zellen verwendet, um verschiedene Parameter zu analysieren, die die Klonalität von Neurosphären des Spiralganglions beeinflussen. Zudem kamen auf Agarose und Kollagen basierende semisoliden Medien (Louis et al. 2008) sowie ein Einzelzell-Assay zur Anwendung, um das Proliferationspotential und das solitäre Wachstum der Einzelzellen analysieren zu können. Abschließend wurde die Multipotenz, die Fähigkeit der Stammzellen zur Differenzierung in primäre Zelltypen des Ursprungsgewebes wie auditorische Neurone und Gliazellen, näher untersucht. Neuronenähnliche Zellen des Spiralganglions wurden mit den Markern TUJ und MAP2, Gliazellen mit den Markern GFAP und MOSP analysiert und quantifiziert. MAP2, das in Perikarya und Neuriten des Spiralganglions vorhanden ist (Hafidi et al. 1992), sollte als noch unbekannter Marker für die aus Stammzellen des neonatalen Spiralganglions differenzierten Neurone untersucht werden. Die im Zuge dieses Projekts eingesetzten Methoden umfassten die Mikrodissektion des Innenohrs neonataler Mäuse, Zellkulturexperimente, Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie sowie molekularbiologische Techniken.

2 Material und Methode

2.1 Tiere

2.1.1 Maushaltung

Die Elterntiere, deren Nachkommen für die Versuche verwendet wurden, wurden in Tierhaltungsräumen der Zentralen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums der Goethe Universität Frankfurt am Main gehalten. Diese Versuchstierhaltungseinrichtung ist von der zuständigen Behörde genehmigt. Die Mäuse, die ausschließlich für Versuchszwecke gezüchtet wurden, wurden in Typ II long Käfigen in einer offenen Filtertop Haltung untergebracht. Einstreut wurde mit rindenfreien Holzfasern und als Nestmaterial fungierten dünne, gewellte Pappstreifen. Wasser wurde über Tränkeflaschen und Futter in Form von Pellets permanent bereitgestellt. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden.

Für die Versuche, bei denen grün- und rot-fluoreszierende Zellen benötigt wurden, kamen C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J-Mäuse (Jackson Laboratory, Maine, USA), B6.Cg-Tg(CAG-DsRed*MST)1Nagy/J-Mäuse (Jackson Laboratory, Maine, USA) sowie C57BL/6JRj-Mäuse (Janvier Labs, St. Berthevin Cedex, Frankreich) zum Einsatz. Die übrigen Versuche wurden mit BALB/cByJRj-Mäusen (Janvier Labs, St. Berthevin Cedex, Frankreich) durchgeführt.

2.1.2 Mauszucht

Die Versuche wurden mit ein bis drei Tage alten Neonaten durchgeführt. Ab einem Alter von 10 Wochen wurden die Elterntiere verpaart und bis zu einem Alter von circa 7 bis 8 Monaten genutzt.

Bei den BALB/cByJRj-Mäusen wurden zwei Weibchen homozygot mit einem Böckchen verpaart und verblieben bis zu ihrem Ausscheiden aus der Zucht in dieser Konstellation.

GFP-Mäuse fluoreszieren durch Licht angeregt in allen Geweben, mit Ausnahme der Haare und Erythrozyten, grün (Okabe et al. 1997). Um GFP-Nachkommen zu erhalten, wurde ein heterozygoten GFP-Männchen mit zwei weiblichen C57BL/6JRj-Mäusen verpaart, da die Nachkommen einer homozygoten Verpaarung eines GFP-Paares im Embryonalstadium sterben (Nour et al. 2004). Mittels einer UV-Lampe wurden die grün-fluoreszierenden Neonaten für die Versuche ausgewählt. Die DsRed-Mäuse wurden homozygot verpaart (Vintersten et al. 2004).

Es wurde darauf geachtet, dass beide Mausstämme den gleichen genetischen Hintergrund hatten. Da beiden Stämmen C57BL/6 als genetischer Hintergrund zugrunde lag, konnte ausgeschlossen werden, dass die Inzidenz der Chimärenbildung der Neurosphären durch diesen Faktor beeinflusst war.

Für die Versuche mit grün- und rot-fluoreszierenden Zellen war es nötig, dass sowohl GFP-Mäuse als auch die DsRed-Mäuse im Alter von ein bis drei Tagen vorhanden waren. Zu diesem Zweck mussten die Tiere zeitgleich verpaart werden. Dazu wurden jeweils ein DsRed-Männchen und ein GFP-Männchen für circa 5 Tage einzeln in einen Käfig gesetzt, um den Männchen Zeit zur Erholung und zur Markierung ihres Reviers zu geben. Dann wurden zeitlich zum DsRed-Männchen zwei DsRed-Weibchen und zum GFP-Männchen zwei C57BL/6JRj-Weibchen hinzugesetzt. Dies sollte gewährleisten, dass die Verpaarung innerhalb weniger Tage zustande kam. Nach circa einer Woche wurden die Männchen jeweils wieder herausgesetzt.

2.1.3 Rechtlicher Rahmen

Da die Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken getötet wurden, um nach dem Tod Organe zu entnehmen, fallen die hier dargestellten Experimente unter die Regelungen des §4 Absatz 3 in Verbindung mit §7 Absatz 2 des Tierschutzgesetzes. Formal handelte es sich um Tötungen und keine Tierversuche im eigentlichen Sinn, wobei dennoch eine ethische Abwägung zur Unerlässlichkeit der Versuche vorangegangen sein musste. Die Versuche waren dem Tierschutzbeauftragten des Fachbereichs bekannt.

Nach der Versuchstiermeldeverordnung in Verbindung mit §16 c des Tierschutzgesetzes müssen jährlich Angaben zur tierschutzrechtlichen Zuordnung, Angaben über Tierkategorie, Anzahl der verwendeten Tiere sowie den Anteil transgener Tiere an die zuständige Behörde übermittelt werden. Die tierschutzrechtlichen Vorschriften nach §9 Tierschutzgesetz in Verbindung mit §16 Absatz 1 Satz 3 mit den persönlichen Voraussetzungen zur Qualifikation und Sachkunde der durchführenden Personen, auch dem Töten von Tieren, war mit der Approbation als Tierärztin erfüllt. In Übereinstimmung mit den Vorschriften des §2 Absatz 2 und der Anlage 2 der Tierschutz-Versuchstierverordnung wurden die neonaten Tiere durch Dekapitation und die Elterntiere beim Ausscheiden aus der Zucht mit einer speziell dafür vorgesehene vollautomatische CO₂-Anlage getötet. Nach der CO₂-Asphyxie wurde bei den Adulten der Tod durch cervikale Dislokation sichergestellt.

2.2 Isolierung der Stammzellen des Spiralganglions

2.2.1 Mikrodissektion des Spiralganglions

Die Präparation wurde nach dem von Oshima et al. (2009) verfassten Protokoll durchgeführt. Neonatale Mäuse beider Geschlechter wurden ein bis drei Tage post natum per Scherenschlag mit einer extra dünnen Irisschere (Fine Science Tools) enthauptet. Nach Abziehen der Schädelhaut wurden die Hemisphären entlang der Sutura sagittalis durchtrennt. Durch Entfernung des Gehirns lag das Felsenbein mit dem Innenohr frei, das durch ein dorsal verlaufendes Blutgefäß, das den Vestibularapparat u-förmig umgab, gut erkennbar war (**Abb. 3**). Das Os temporale wurde grob herausgelöst und in eine 35 mm Petrischale (BD Falcon) mit eisgekühlter Hank's balanced salt solution (Invitrogen) gegeben. Die nun folgenden Arbeiten wurden unter dem Präparationsmikroskop Zeiss Stemi 2000-C unter einer Werkbank Hera Guard HPH 12 mit Hilfe von Dumont Pinzetten Nummer 5 und 55 (Fine Science Tools) durchgeführt. Das Innenohr wurde vom umliegenden Gewebe befreit und in toto herausgenommen. Anschließend wurde die knorpelige Bulla vorsichtig eröffnet, so dass die Cochlea sichtbar wurde. Nachdem die Kapsel vollständig entfernt war, wurde die Cochlea vom Vestibularorgan getrennt und herausgelöst.

Nun wurde der Ductus cochlearis bestehend aus Corti-Organ, Ligamentum spirale und Stria vascularis, die als bandförmige Struktur vorliegen, sorgfältig abgezogen. Die Neuriten des Spiralganglions sollten dabei nicht zusammen mit dem Corti-Organ abgelöst werden, sondern im Ganzen am Spiralganglion verbleiben (**Abb. 3**).

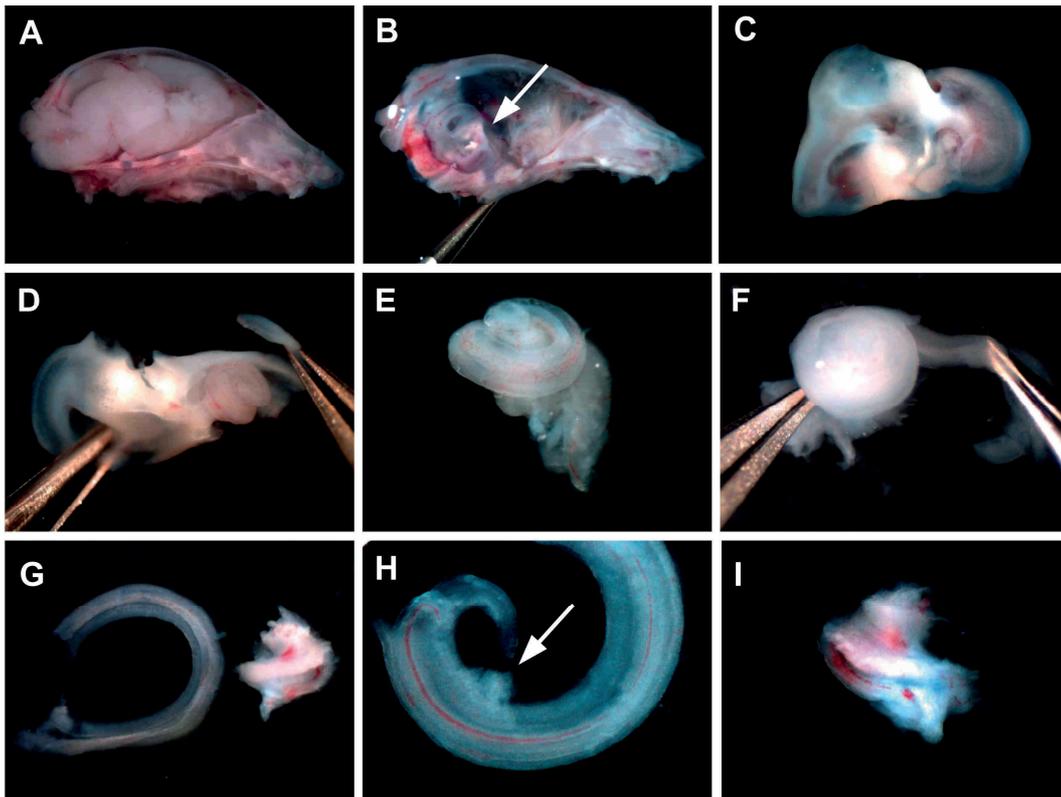


Abb. 3: Mikrodissektion des Spiralganglions. Nach der Abtrennung des Kopfes und der sagittalen Halbierung des Schädels (A) wurde das Gehirn vollständig entfernt (B). Hierdurch wurde das Innenohr bereits sichtbar (B, Pfeil), das in toto extrahiert wurde (C). Durch Eröffnung der knorpeligen Kapsel (D) konnte die Cochlea entnommen werden (E). Die bandartigen Strukturen der Stria vascularis, des Ligamentum spirale und Corti-Organ wurden nun vorsichtig abgezogen (F), so dass das Spiralganglion isoliert von diesen Schichten vorlag (G). Sorgfalt war beim Abziehen geboten, da sonst Neuriten (Pfeil) mit dem Corti-Organ verbunden blieben (H). I zeigt das intakte Spiralganglion, das als Ausgangsmaterial der Versuche diente.

2.2.2 Dissoziation der Zellen

Zur Isolierung der sphärenbildenden Stammzellen wurde ein modifizierter Neurosphären Assay angewandt (Martinez-Monedero et al. 2008; Oshima et al. 2009; Diensthuber et al. 2009). Folgende sterile Arbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank Hera Safe KS 18 durchgeführt. Inkubiert wurden die Zellen im Inkubator Heraeus Heracell bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchte von über 95% und 5% CO₂.

Beide Modioli mit den aufliegenden Spiralganglienzellen eines Tieres wurden in 50 µl PBS (Life Technologies) in eine 6-Well-Suspensionsplatte (Greiner Bio One) gegeben. 50 µl 37 °C vorgewärmtes 0,125% Trypsin/EDTA (Invitrogen) wurde hinzugefügt und für 5 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden 50 µl eines Gemischs aus 10 mg/ml Sojabohnen Trypsin Inhibitor (Worthington) und 1 mg/ml DNaseI (Worthington) zum Stoppen der enzymatischen Verdauung und 50 µl Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12; Sigma) ergänzt mit 1% N2, 2% B27 (beide Invitrogen), Epidermal Growth Factor (EGF; 20 ng/ml), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; 10 ng/ml), Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1; 50 ng/ml), Heparansulfat (HS; 50 ng/ml) und Ampicillin (50 µg/ml) (alle Sigma) beigegeben. 30- bis 40-mal wurde dieser Tropfen anschließend ohne dass Luftblasen entstanden mit einer Pipettenspitze (Starlab) trituriert. Der Dissoziierungsgrad der Organe wurde mikroskopisch beurteilt und gegebenenfalls durch weitere Trituration verbessert. Ziel war es, viele einzelne Zellen und nur wenige kleine Zellklumpen bestehend aus maximal 2 bis 5 Zellen zu erhalten. Eine völlige Vereinzelnung der Zellen wurde nicht angestrebt, um die Zellen möglichst zu schonen.

Dann wurde 1 ml DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml HS und 50 µg/ml Ampicillin hinzu pipettiert. Die Zellen wurden behutsam resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb (BD Falcon) hindurch gesiebt. Bei den Versuchen mit grün- und rot-fluoreszierenden Zellen sowie dem Agarose- oder Einzelzell-Assay, bei denen eine Einzelzellsuspension ohne das Vorhandensein von Zellklumpen obligat erforderlich war, wurden die Zellsuspension zweimal durch ein 40 µm Sieb (BD Falcon) hindurch gesiebt.

2.2.3 Zellkultur

Die Einzelzellen eines einzelnen Modiolus wurden dann in ein Well einer 6-Well-Suspensionsplatte gegeben, das mit 2 ml 37 °C vorgewärmtem DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml HS und 50 µg/ml Ampicillin befüllt war. Die 6-Well-Platten wurden zuvor mit Poly HEMA (Sigma) für 3 Min. beschichtet, um adhärentes Wachstum der Zellen gänzlich zu verhindern. Nach vollständiger Trocknung wurden die Wells zweimal mit PBS und einmal mit DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27 und 50 µg/ml Ampicillin gespült.

Eine tierspezifische Nachvollziehbarkeit der Herkunft der Zellen war zu jedem Zeitpunkt gegeben. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ bei unterschiedlicher Kultivierungsdauer. Zur Analyse der BrdU-Inkorporation wurden das Medium für zwei oder drei Tage mit 10 mg/ml 5-Bromo-2'-deoxyuridine (Sigma) ergänzt.

2.3 Isolierung der Stammzellen der Subventrikularzone

2.3.1 Mikrodissektion der Subventrikularzone

Zum Vergleich der Zell- und Sphärenmorphologie wurden Stammzellen des Gehirns aus der Subventrikularzone (SVZ) isoliert (Lois & Alvarez-Buylla 1993). Vorgegangen wurde dabei in Anlehnung an das Protokoll von Mirzadeh et al. (2010). Neonatale BALB/c Mäuse wurden ein bis sechs Tage post natum mit einem Scherenschlag durch eine extra dünne Irisschere enthauptet. Nach der Enthäutung wurde das Gehirn entnommen und in eiskalte Hank's balanced salt solution gegeben. Der Bulbus olfactorius sowie das Kleinhirn wurden entfernt und die Hemisphären entlang der Falx cerebri durchtrennt. Daraufhin wurde der Cortex vorsichtig entfernt, um den Bereich zwischen Striatum und den Seitenventrikeln, wo die SVZ liegt, allmählich zu isolieren. Da die Größenverhältnisse der Neonaten recht klein waren, wurde beim weiteren Vorgehen das um die Subventrikularzone herumliegende Gewebe großflächig entnommen, um keine Anteile dessen zu verlieren.

2.3.2 Zelldissoziation und Zellkultur der Subventrikularzone

Analog den Spiralganglien wurde die SVZ in gleicher Weise dissoziiert. Circa fünfmal wurde der Tropfen nach dem Stoppen der enzymatischen Verdauung ohne dass Luftblasen entstanden mit einer Pipettenspitze trituriert. Analog den Spiralganglien wurde resuspendiert und gefiltert. Etwa 1 bis 2 µl der Einzelsuspension der SVZ wurde jeweils auf die Wells einer 6-Well-Suspensionsplatte, die mit 2 ml 37 °C vorgewärmtem DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml HS und 50 µg/ml Ampicillin befüllt waren, aufgeteilt. Die 6-Well-Platten wurden zuvor mit Poly HEMA beschichtet und wie bereits oben beschrieben gespült. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ bei unterschiedlicher Kultivierungsdauer.

2.4 Mikroskopie

2.4.1 Lichtmikroskopie

Bilder über die lichtmikroskopische Darstellung der Präparationsschritte, die Morphologie der Zellen, Sphären oder adhärenen Kulturen wurden mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 40 CFL, der Kamera AxioCam ICc1 und der Software AxioVision Rel. 4.8.2 erstellt. Die Semidünnschnitte der Sphären (siehe weiter unten) wurden mit dem Zeiss Axioplan 2 und der AxioCam ICc1 aufgenommen.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

2.4.2.1 *Immunhistochemische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie adhärenter Kulturen*

Viergeteilte 35 mm Gewebekulturschalen (Greiner Bio-One) wurden für 30 Min. mit 100 µl 0,1% Gelatine (Millipore) beschichtet. Circa 25 Sphären eines Tieres wurden zufällig einzeln mit einer 20 µl Pipettenspitze (Starlab) aufgesammelt und in das Well einer viergeteilten 35 mm Gewebekulturschale (Greiner Bio One) gegeben. Die Wells waren mit jeweils 100 µl DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27 und 50 µg/ml Ampicillin befüllt. Im Falle der Sphären, die mit Ki-67 gefärbt werden sollten, wurde noch zusätzlich 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1 und 50 ng/ml Heparansulfat hinzugefügt, um die proliferative Aktivität der Sphären nicht zu unterbrechen. Für die Differenzierungskulturen wurde DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, BDNF (50 ng/ml), NT-3 (50 ng/ml) (beide von R&D Systems) und 50 µg/ml Ampicillin aufgetragen. Die Sphären der Subventrikularzone erhielten zusätzlich 10% fetales Kälberserum (PAA Laboratories).

Die Analyse der Marker-Expression wurde 4 bis 5 Std. nach Ausplattierung der Sphären durchgeführt, damit die Sphären möglichst kurz anhefteten. Somit sollte gewährleistet werden, dass die Sphären ihre Eigenschaften als solche beibehielten und nicht beginnende Differenzierung das Proteinmuster beeinflusste. Die Analyse der differenzierten Kulturen wurde nach 8 bis 10 Tagen *in vitro* durchgeführt.

Es wurden je Well einer 35 mm Gewebekulturschale stets 100 µl Volumen hinzu gegeben und nach der Kultivierungsdauer mit einer Absaugpumpe entfernt. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und für 15 Min. mit 4% Paraformaldehyd (Electron Microscopy Sciences) in PBS fixiert.

Für die Detektion von BrdU wurden die Zellen nach der Fixation mit 2 N Salzsäure (Applichem) für 15 Min. inkubiert, um durch Denaturierung die Bindungsstelle der DNA für den Antikörper zugänglich zu machen. Dann wurden die Wells mit PBT-1 (PBS, 0,1% Triton X-100 (Sigma), 1% Bovines Serumalbumin (Sigma), 5% hitzeinaktiviertes Ziegen Serum (Invitrogen)) einmal gewaschen und für 15 Min. damit inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren und unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschungen mit PBT-1 für 10 Min. und zwei Waschungen mit PBT-2 (PBS, 0,1 % Triton X-100, 0,1% bovines Serumalbumin) für jeweils 5 Minuten. Der speziesspezifische sekundäre Antikörper, der mit einem Fluorophor konjugiert war, wurde bei Raumtemperatur für 2 Std. hinzu gegeben. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBT-2 für jeweils 10 Min. gewaschen und anschließend mit dem blau-fluoreszierenden Nucleinsäurefarbstoff 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI; Invitrogen) in der Verdünnung 1:1000 in PBS zur Visualisierung der Zellkerne gegengefärbt. Zweimal wurde die Probe dann mit PBS für 10 Min. gewaschen und schließlich mit jeweils einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium (Dako) pro Well überzogen. Mit einem runden Deckgläschen im Durchmesser von 10 mm (Marienfeld GmbH & Co. KG) wurde die Probe schließlich bedeckt, um Austrocknung zu verhindern und eine glatte optische Fläche für die Mikroskopie zu schaffen.

Bei der Quantifizierung der Ki-67 Expression wurden nur die Zellen mit einem sehr starken nukleären Signal gezählt.

Bei jeder Färbung lief eine Negativkontrolle mit, bei der anstelle des primären Antikörpers PBS verwendet wurde, um die unspezifischen Signale des sekundären Antikörpers erkennen zu können. In allen Fällen zeigte sich, dass durch das Fehlen des primären Antikörpers keine spezifische Färbung ausgelöst wurde.

Bilder wurden am Mikroskop Zeiss Axio Imager.M2 mit der Software AxioVision Rel. 4.8.2 und der Kamera AxioCam MRm Rev.3 erstellt.

2.4.2.2 *Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie flotierender Zellen und Sphären*

Repräsentative Sphären, bei der Färbung auf Phalloidin nur solche, die Filopodien an ihrer Oberfläche aufwiesen, wurden nach 3 DIV einzeln mit einer Pipette gesammelt und für 3 Min. in PBS in die Vertiefung einer viergeteilte 35 mm Gewebekulturschale gegeben. Nach jedem Schritt wurden die Zellen auf den Rüttler gestellt, um ein Festhaften der Sphären am Plattenboden möglichst zu verhindern. Danach wurde die Probe in 4 % Paraformaldehyd in PBS für 10 Min. fixiert und zweimal 3 Min. mit PBT-1 gewaschen. Der primäre Antikörper in PBT-1 wurde über Nacht bei 4 °C beziehungsweise im Falle des Phalloidin-Toxins, das mit dem Fluorescein FITC konjugiert war (Sigma, P5282; 1:40), für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde in PBT-2 verdünnt und für 2 Stunden aufgetragen. Es wurde 3 Min. mit PBS gewaschen und die Kerne der Zellen 10 Min. mit DAPI gefärbt. Nach zweimal 3 Minuten Waschungen mit PBS wurde die Probe mit einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium bedeckt und mit einem Deckgläschen gedeckelt.

Mit dem Zeiss Mikroskop Axiovert 40 CFL, der Kamera AxioCam ICc1 und der Software AxioVision Rel. 4.8.2 wurden mehrdimensionale Bilder erstellt. Dabei kamen die Filtersätze 20 Rhodamin und 38 Endow GFP (beide Zeiss) zum Einsatz. In dieser Kombination wurden sowohl die Bilder der immunhistochemisch gefärbten Sphären sowie alle Bilder mit transgenen Zellen oder Sphären erstellt.

2.4.2.3 Antikörper

Folgende primäre und sekundäre Antikörper wurden zur Analyse der immunhistochemischen Expression verschiedener Marker bei Sphären und aus Sphären hervorgegangenen Zellen verwendet:

Tab.1: Liste der primären Antikörper

Marker	Name	Klonalität	Wirtsspezies	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung	Referenz
Stamm- und Vorläuferzelle	Anti-Nestin	monoklonal	Maus	Developmental Studies Hybridoma Bank	Rat-401	1:200	Hockfield & McKay 1985
Proliferierende Zelle	Anti-BrdU	monoklonal	Maus	Sigma	B2531	1:500	Oshima et al. 2007b
	Anti-BrdU	monoklonal	Ratte	Novus Biologicals	NB500-169	1:500	Chang et al. 2008
	Anti-Ki-67	monoklonal	Kaninchen	DCS	Ki681C01	1:100	Gerdes et al. 1991
Differenzierte Zelle	Anti-GFAP	polyklonal	Kaninchen	Dako	Z0334	1:500	Oshima et al. 2007a
	Anti-MAP2	monoklonal	Maus	Sigma	M4403	1:2000	Rak et al. 2011
	Anti-MOSP	monoklonal	Maus	Millipore	MAB328	1:1000	Glavaski-Joksimovic et al. 2009
	Anti-Myosin-VIIa	polyklonal	Kaninchen	Proteus Bioscience	25-6790	1:500	Di Santo et al. 2013
	Anti-TUJ1	monoklonal	Maus	Covance	MMS-435P	1:500	Oshima et al. 2007a

Tab.2: Liste der sekundären Antikörper

Bezeichnung	Wirtspezies	Iso-typ	Konjugat	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Anti-Kaninchen	Ziege	IgG	FITC	Jackson Immunoresearch	111-095-144	1:200
Anti-Kaninchen	Ziege	IgG	TRITC	Jackson Immunoresearch	111-025-144	1:200
Anti-Maus	Ziege	IgG	Cy5	Jackson Immunoresearch	115-175-146	1:200
Anti-Maus	Ziege	IgG	FITC	Jackson Immunoresearch	115-095-146	1:200
Anti-Maus	Ziege	IgG	TRITC	Jackson Immunoresearch	115-025-146	1:200
Anti-Maus	Ziege	IgM	Cy5	Millipore	AP128S	1:300
Anti-Ratte	Ziege	IgG	FITC	Jackson Immunoresearch	112-095-143	1:200

2.4.3 Elektronenmikroskopie

2.4.3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Zellen, die für 10 Tage in Differenzierungskultur waren, verblieben während der ganzen Prozedur in der vierteilten Gewebekulturschale. Die fünf Tage alten Sphären hingegen wurden in einen Microtube (Sarstedt) gegeben. Der Überstand wurde nach jedem Schritt durch Zentrifugation bei 500 U/Min. für jeweils 10 Min. herunter zentrifugiert. Das Pellet, das die Sphären enthielt, wurde durch das folgende Reagenz resuspendiert.

Die Zellen und Sphären wurden für 2 Std. mit 2% Glutardialdehyd (Merck) in PBS fixiert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 25%, 50%, 70%, 95%, 99% Ethanol für jeweils 10 Min. folgte die Entwässerung. Die Beschichtung erfolgte mit Hexamethyldisilazan-Lösung (Merck) über Nacht. Erneut wurde Hexamethyldisilazan-Lösung zugegeben, um die Zellen und Sphären unter dem Abzug zu trocknen und einer Artefaktbildung, wie Zerplatzen oder Zusammenfallen, vorzubeugen. Nach vollständiger Trocknung wurden die Proben in eine 94 mm Zellkulturschale (Greiner Bio One) mit Calciumchlorid-Granulat (Roth) gegeben, um die Probe dehydriert zu belassen. Die Zellkulturschale wurde zum Schutz vor Staub und Flüssigkeit mit Parafilm umschlossen. Dann wurden die Präparate auf einen Kohlekleber, der auf einem Aluminium-Präparate-Teller befestigt war, aufgebracht.

Zur Herstellung der elektrischen Leitfähigkeiten wurden die Proben zwei- bis dreimal für 60 Sek. mit dem Agar Sputter Coater (Agar Scientific) mit Gold-Palladium-Staub überzogen. Am Feldemissionselektronenmikroskop (Hitachi REM S4500) wurden die Proben mit 5 kV in einem Arbeitsabstand zwischen 10 und 15 mm angeschaut. Die Fotos (SE 2000x1600 Pixel, 52 Sek.) wurden digital mit dem Fotosystem Digital Image Processing System 2.6 der Firma Point Electronic erstellt.

2.4.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

5 Tage alte Sphären wurden für 2,5 Std. in Yellow Fix (2% Paraformaldehyd (Merck), 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (Merck, pH 7,2), 0,02% gesättigte Pikrinsäure (Fluka), dem kurz vor Gebrauch 2% Glutaraldehyd (Agar Scientific), zugesetzt wird) fixiert. Es folgte dreimal für 10 Min. eine Spülung mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer. Anschließend wurden die Sphären 30 – 40 Min. in 1% Osmiumsäure (Carl Roth) nachfixiert und dreimal für 10 Min. mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer gespült. Die Entwässerung erfolgte für jeweils 15 Min. in 50%, 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol und zweimal je 30 Min. 100% Ethanol. Dann wurden die Sphären dreimal für 10 Min. in Xylol (Carl Roth) überführt. Über Nacht wurden sie in ein 1:1 Gemisch aus Epon und Xylol gegeben. Das hier verwendete Epon setzt sich zusammen aus 36,2% Glycidether, 28,5% (w/v) 2-Dodecenylnsuccinicanhydride, 25,1% Methyladicanhydride und 1,5% 2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol (alle Serva). 4 – 5 Std. reines Epon folgten. Zur Aushärtung wurden die Sphären in Epon im Brutschrank bei 60 °C circa 20 Std. ausgehärtet. Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1 µm wurden mit dem Reichert Ultracut S Mikrotom angefertigt, auf einen Objektträger gegeben und dienten zunächst als Orientierung, wurden aber auch zur lichtmikroskopischen Untersuchung herangezogen. Mit Richardson (1% Methylenblau (Merck) und 1% Borax (Merck) in destilliertem Wasser, und 1% Azur II (Fluka) in destilliertem Wasser, gemischt 1:1) wurden die Schnitte für 15 Sek. bei 60 °C gefärbt. Anschließend wurden mit dem Reichert Ultracut S Mikrotom Ultradünnschnitte, die 70 – 90 nm dünn waren, geschnitten und auf Kupfernetze (Plano) aufgebracht. Kontrastiert wurden die Schnitte mit 0,5% Uranylacetat für 30 Min. und 0,2% Bleicitrat (beide Laurylab) für 1,2 Min. Am Transmissionselektronenmikroskop EM 109 der Firma Zeiss wurden die Schnitte angesehen und die Bilder mit Image SP [Professional] gemacht.

2.4.4 Zeitraffermikroskopie

5 Tage alte Sphären wurden einzeln aufgesammelt und wie beim Vorgehen zur Differenzierung in eine 4-Well-Platte, die zuvor mit 0,1% Gelatine beschichtet wurde, zur Initiation des adhärenenten Wachstums gegeben. Die Zeitrafferaufnahmen wurden mit einem Zeiss Mikroskop Axio Observer.Z1 gemacht, das mit einem Inkubationssystem Temp Module S1 und CO₂ Module S1 ausgestattet war. Alle 15 Min. wurden mittels einer AxioCam MRm und der Software AxioVision Rel. 4.7 Bilder geschossen. Die beginnende Differenzierung wurde bei den Sphären des Spiralganglions über einen Zeitraum von 45,5 Std. beobachtet.

2.5 Propagation der Sphären

Nach einer Kultivierungsdauer von 3 bis 5 Tagen wurden die Sphären passagiert. Das gesamte Volumen der Zellsuspension mit Spiralganglionzellen aus zwei 6-Well-Platten wurde in ein 15 ml Röhrchen (BD Falcon) transferiert und bei 800 U/Min. für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf circa 300 µl abgenommen und 300 µl vorgewärmtes Accumax (PAA Laboratories) hinzugefügt. Das Pellet mit den Zellen wurde aufgeschüttelt und für 5 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Suspension zweimal erneut durch Schütteln vermischt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze (Starlab) vorsichtig fünf- bis siebenmal trituriert.

Die Zellsuspension wurde mikroskopisch auf ihren Vereinzelungsgrad hin untersucht. Ziel war es, viele einzelne Zellen und nur wenige Zellklumpen bestehend aus maximal 2 bis 10 Zellen zu erhalten. Gegebenenfalls wurde durch erneute Trituration eine bessere Dissoziation der Zellen erreicht.

Anschließend wurden die Zellen auf die Wells einer mit Poly HEMA beschichteten 6-Well-Suspensionsplatte ausgesät, die jeweils 2 ml 37 °C warmes DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml HS und 50 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Zellen, die ursprünglich von zwei Spiralganglien stammten und auf 2 Wells aufgeteilt waren, wurden nun auf vier Wells aufgeteilt. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ bei unterschiedlicher Kultivierungsdauer.

2.6 Zellzählung

2.6.1 Zellzählung mit Zählkammer

Nach Präparation und Vereinzelung der Zellen wurden nach dem Sieben 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (Carl Roth) versetzt und kurz mit dem Vortexer vermischt. Dann wurden 10 µl dieses Gemischs in eine Einweg Zählkammer (Neubauer improved; Science Service) gegeben. Die lebenden Zellen, die in den fünf Großquadraten, einschließlich der Zellen, die auf der oberen und linken Begrenzung dieser Quadrate lagen oder diese berührten, wurden gezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen pro ml wurde mittels folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen aus 5 Großquadraten}}{5} \bullet \text{Verdünnungsfaktor} \bullet \text{Volumenfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor betrug 2, der Volumenfaktor 10000 und so konnte mit Hilfe des Dreisatzes jede beliebige Zellzahl errechnet werden.

2.6.2 Zellzählung immunhistochemisch gefärbter Zellen

Immunhistochemisch gefärbte Zellen wurden anhand der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Bilder über das Zählwerkzeug von Adobe Photoshop CS5 ausgezählt. Alle Bereiche der Wells wurden in die Zählung mit eingeschlossen. Die ursprünglich ausplattierten Sphären wurden getrennt voneinander ausgezählt. Alle Zellen einer Sphäre, deren Kerne mit DAPI gefärbt waren, wurden gezählt. Die Anzahl der Zellen, die den jeweiligen Marker innerhalb der Sphäre exprimierten, wurde ebenfalls ermittelt. Hierdurch konnte pro Sphäre der prozentuale Anteil der jeweiligen Marker über einen Dreisatz bestimmt werden. In drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3) wurden jeweils 3 Replikate ausgewertet.

2.7 Evaluation des Neurosphären-Assays

Pro Versuch wurden die Zellen eines Tieres verwandt, die pro getesteter Bedingung jeweils drei Replikate lieferten. Insgesamt wurde der Versuch dreimal wiederholt. Nach der Präparation wurden je Well einer 24-Well-Suspensionsplatte (Greiner Bio One), die mit jeweils 400 µl DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27 und 50 µg/ml Ampicillin befüllt war, 2500 Zellen ausplattiert. Folgende Faktoren wurden zusätzlich ins Medium hinzugefügt und getestet:

Tab. 3: Auflistung der getesteten Wachstumsbedingungen

Bedingung	Faktor(en)
Kontrolle	Bovines Serumalbumin
1	EGF
2	IGF-1
3	bFGF
4	bFGF + HS
5	EGF + IGF-1
6	bFGF + EGF
7	bFGF + IGF-1
8	bFGF + EGF + IGF-1
9	bFGF + IGF-1 + HS
10	bFGF + EGF + HS
11	bFGF + EGF + IGF-1 + HS

Die Konzentrationen der Substanzen waren 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1 und 50 ng/ml HS. 0,002% Bovines Serumalbumin fungierte als Kontrollgruppe. Jeden zweiten Tag wurden 100 µl Medium unter mikroskopischer Sichtkontrolle, um keine Zellen oder Sphären mit aufzusaugen, entnommen und 100 µl 37 °C warmes, frisches Medium hinzugefügt. An DIV 7 wurden je Well alle Sphären, die größer oder gleich 40 µm waren, fotografiert und gezählt.

2.8 Zellzahl-, Größen- und Volumenbestimmung der Sphären

Zellen des Spiralganglions neonataler Mäuse wurden, wie oben beschrieben, präpariert und zum Wachstum der Sphären inkubiert. Zur Parameterbestimmung der primären Generation wurden die Sphären ab DIV 0 bis DIV 7 beurteilt. Die Neurosphären für die sekundäre Generation wurden nach der Präparation für 3 Tage inkubiert, anschließend propagiert und analog zur ersten Generation täglich von DIV 0 bis DIV 7 bewertet. Für die tertiäre Generation wurden Sphären nach der Präparation für 3 Tage inkubiert, dann propagiert und nach 3 Tagen Kultivierungsdauer erneut propagiert. Auch hierbei wurden schließlich ab DIV 0 bis DIV 7 der dritten Generation die Versuche durchgeführt. Pro Tag wurden pro Tier zehn Neurosphären gesammelt und in eine mit 0,1% Gelatine beschichtete 4-Well-Platte gegeben. Sofort nach der Aussaat wurden die Sphären fotografiert, um den maximalen Durchmesser ermitteln zu können. Danach wurden die Sphären über Nacht inkubiert und konnten somit auf der Beschichtung anhaften. Anschließend wurde ein modifiziertes Färbeprotokoll angewandt.

Die Sphären wurden zunächst mit PBS (Life Technologies) gespült und in 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 Min. fixiert. Dann wurde mit PBS gespült und für 10 Min. mit DAPI in der Verdünnung 1:1000 in PBS gefärbt, um die Kerne darstellen zu können. Zweimal folgten Spülungen mit PBS für jeweils 10 Min. Schließlich wurde mit jeweils einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium pro Well die Probe überzogen und einem runden Deckgläschen bedeckt. Die Zählung der Kerne erfolgte anhand der Bilddateien, die über das Zählwerkzeug von Adobe Photoshop CS5 ausgezählt wurden.

Das Volumen wurde anhand der Formel für Kugeln $\frac{1}{6}\pi d^3$ berechnet (Reubinoff et al. 2001).

2.9 Neurosphären-Assay mit transgenen Tieren

2.9.1 Klonalität in Abhängigkeit der Zelldichte und Kultivierungsdauer

24-Well-Suspensionsplatten wurden je Well mit 400 μ l DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml Heparansulfat und 50 μ g/ml Ampicillin befüllt und im Inkubator vorgewärmt. Nach der oben beschriebenen Mikrodissektion wurden aus jeweils einem DsRed- und einem GFP-Welpen Zellen des Spiralganglions isoliert. Der Trituration der Zellen folgte zweimaliges Sieben mit einem 40 μ m Sieb (BD Falcon) und die Zellzählung mit einer Zählkammer. Die GFP- und DsRed-positiven Zellen wurden zu gleichen Teilen ko-kultiviert. Getestet wurden die Zelldichten 0,5 Zellen/ μ l, 10 Zellen/ μ l und 25 Zellen/ μ l. An DIV 2 und 7 wurde dann die Anzahl der entstandenen Sphären, die größer oder gleich 40 μ m waren, je Well ermittelt. Dabei wurde zwischen ausschließlich rot-, ausschließlich grün- oder mischfluoreszierenden Sphären differenziert.

2.9.2 Klonalität in Abhängigkeit von Zelldichte und Bewegung

24-Well-Suspensionsplatten wurden je Well mit 400 μ l DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml Heparansulfat und 50 μ g/ml Ampicillin befüllt und im Inkubator vorgewärmt. Der Isolierung von GFP- und DsRed-positiven Zellen folgte die Trituration mit zweimaligem Sieben (40 μ m) und die anschließend Bestimmung der Zelldichte mit einer Zählkammer. Kultiviert wurden die Zellen im Verhältnis 1:1.

In Anlehnung an Coles-Takabe et al. (2008) wurden die Zelldichten 0,5 Zellen/ μl , 1 Zelle/ μl , 5 Zellen/ μl , 10 Zellen/ μl und 25 Zellen/ μl bzw. 105,3 Zellen/ cm^2 , 210,5 Zellen/ cm^2 , 1052,6 Zellen/ cm^2 , 2105,3 Zellen/ cm^2 , 5263,2 Zellen/ cm^2 in die Wells verteilt. Platten wurden zweimal täglich bewegt, um zu testen, ob die Bewegung einen Einfluss auf klonales Wachstum der Sphären hat. Die unbewegten Platten verblieben bis zum Tag der Auswertung an DIV 3 völlig unbewegt im Inkubator. Ermittelt wurde schließlich der Anteil der Sphären, die größer oder gleich 40 μm waren und ausschließlich grün-, ausschließlich rot- oder mischfluoreszierend waren.

2.10 Agarose-Assay

Zunächst wurde eine 2,8%ige Agarose Stocklösung (Carl Roth) in DMEM/F12 hergestellt und autoklaviert. Für die Gewinnung der primären Generation wurden die Mäuse wie oben beschrieben präpariert, die Zellen dissoziiert und nach zweimaligem Filtern durch ein 40 μm Sieb mit einer Zählkammer der Anteil lebender Zellen ermittelt. Zum Erhalt sekundärer Zellen wurden drei bis fünf Tage alte Sphären analog dem Vorgehen bei der Propagation zunächst vorbehandelt, das heißt nach Zentrifugation wurde das entstandene Pellet mit Accumax bei 37 °C für 5 Min. inkubiert und anschließend trituriert. Nach zweimaliger Filterung durch ein 40 μm Sieb wurde der Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe einer Zählkammer errechnet. Die Zwischenräume der 6-Well-Suspensionsplatte wurden mit PBS befüllt, um die Zellen später in einer Art feuchten Kammer inkubieren zu können.

Die Zellen wurden in 1ml je Well mit 0,35% Agarose in DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml Heparansulfat und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin ausgesät und kultiviert. An verschiedenen Kulturtagen wurden die Platten dahingehend kontrolliert, ob Sphären entstanden waren und dies gegebenenfalls fotografiert. Es wurden die Zelldichten 0,5 Zellen/ μl , 10 Zellen/ μl und 25 Zellen/ μl bzw. 520,8 Zellen/ cm^2 , 1041,7 Zellen/ cm^2 , 2604,2 Zellen/ cm^2 getestet.

2.11 Kollagen-Assay

Die Zellen des Spiralganglions wurden in Anlehnung an Azari et al. (2011) kultiviert. Dazu wurden in einer 1:10 Verdünnung NeuroCult® NSC Proliferation Supplements mit NeuroCult® NSC Basal Medium ergänzt mit 2 µg/ml Heparin (alle Stemcell Technologies), 20 ng/ml EGF (Sigma), 10 ng/ml bFGF (Sigma), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories) die Zellen zweimal durch ein 40 µm Sieb hindurch gefiltert und anschließend der Anteil lebender Zellen mit der Zählkammer ermittelt. 850 µl NeuroCult™ NCFC Serum-Free Medium without Cytokines (Stemcell Technologies) wurde mit 165 µl NeuroCult® NSC Proliferation Supplements, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 4 µg/ml Heparin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin supplementiert und 8125 Zellen darin suspendiert bevor im letzten Schritt 650 µl kalte Kollagen Lösung (Stemcell Technologies) hinzugefügt wurde. Die Zellsuspension wurde vorsichtig vermischt und 1,5 ml des Ansatzes in eine 35 mm Kulturschale (Stemcell Technologies) ausgesät.

Die finale Konzentration der Zellen betrug 5 Zellen/µl bzw. 862,1 Zellen/cm². Die 35 mm Petrischale wurde zusammen mit einer weiteren mit PBS gefüllten, deckellosen Schale in eine 100 mm Petrischale gegeben deren Deckel im Inkubator geschlossen blieb. Einmal wöchentlich wurde das Medium ergänzt durch Zugabe von je 60 µl pro Schälchen mit 1:10 Verdünnung von NeuroCult® NSC Proliferation Supplements mit NeuroCult® NSC Basal Medium ergänzt mit 0,5 µg/ml EGF, 0,25 µg/ml bFGF und 0,1 mg/ml Heparin. In regelmäßigen Abständen wurden die Platten unter dem Mikroskop begutachtet und die entstandenen Kolonien gegebenenfalls fotografiert.

2.12 Einzelzell-Assay

Nach der Mikrodissektion der Spiralganglien wurden die primären Zellen nach der Zelldissoziation zweimal durch ein 40 µm Sieb gefiltert und anschließend mit einer Zählkammer die Zelldichte bestimmt. Sekundäre Zellen wurden aus drei bis fünf Tage alten Sphären gewonnen, indem die Sphärensuspension analog dem Vorgehen zur Propagation zentrifugiert wurde, mit Accumax die Zellen dissoziiert wurden und nach zweimal durch ein 40 µm Sieb gefiltert wurden. Danach folgte die Ermittlung des Anteils der lebenden Zellen über die Zählkammer.

Es wurden 100 Zellen in 11 ml DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 50 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml Heparansulfat und 50 µg/ml Ampicillin gegeben und je 110 µl mit einer Multiwellpipette auf die Wells einer 96-Well-Suspensionsplatte (Greiner Bio One) verteilt, so dass theoretisch eine Zelle pro Well vorhanden war (**Abb. 4**). Zur Kontrolle wurde ein Well mit 101 Zellen befüllt. Da es auch vorkam, dass keine, zwei oder mehr Zellen pro Well zum Liegen kamen, wurde nach einer Kultivierungsdauer von circa 30 Min. verifiziert, in welchen Wells tatsächlich nur eine Zelle lag und diese markiert. An DIV 7 und 14 wurden diese Wells betrachtet und gegebenenfalls das Wachstum von Sphären dokumentiert.

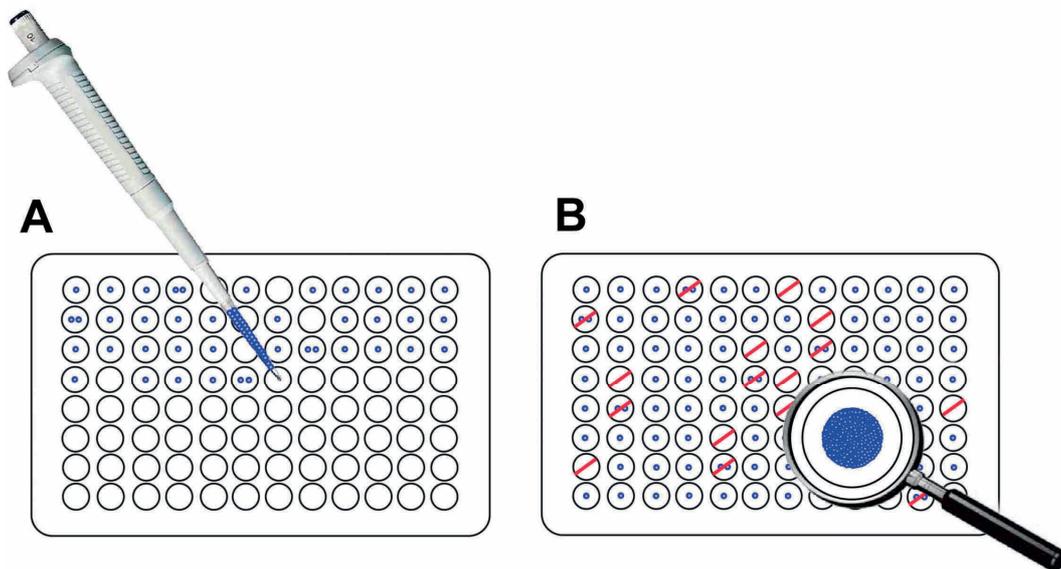


Abb. 4: Illustration des Einzelzell-Assays. Einzelne Zellen wurden in die Wells einer 96-Well-Platte aufgeteilt (A). Zeitnah wurde verifiziert in welchen der Wells tatsächlich eine einzelne Zelle lag, die anderen Wells wurden aus der Analyse ausgeschlossen (B, rote Striche). Am Ende der Kultivierungsdauer von 14 Tagen waren primäre und sekundäre Sphären entstanden (B).

2.13 Differenzierung

Etwa 25 sekundäre Sphären wurden einzeln mit einer 20 µl Pipettenspitze gesammelt und in 100 µl DMEM/F12 ergänzt mit 1% N2, 2% B27, BDNF (50 ng/ml), NT-3 (50 ng/ml) (beide von R&D Systems) und 50 µg/ml Ampicillin in die Wells einer 35 mm viergeteilte Gewebekulturschale gegeben. Die Sphären der Subventrikularzone erhielten zusätzlich 10% fetales Kälberserum (PAA Laboratories).

70 µl des Mediums wurde alle 2 Tage abgenommen und durch 100 µl 37 °C vorgewärmtes frisches Medium ersetzt. Immunhistochemie und ultrastrukturelle Analyse der differenzierten Kulturen wurde nach 8 bis 10 Tagen *in vitro* durchgeführt.

2.14 Cryoschnitte der Cochlea und deren immunhistochemische Färbung

Die Cochlea wurde im Zuge der Präparation vollständig entnommen und als Ganzes in 4% Paraformaldehyd in PBS über Nacht fixiert. Danach wurde einmal mit PBS gespült und die Cochlea in 15% Sucrose (Sigma) in PBS über Nacht gegeben, um eine Schädigung der Zellen durch das Einfrieren zu verhindern. Weiterhin folgte eine Inkubation über Nacht in 30% Sucrose in PBS. Anschließend wurde die Cochlea in Tissue-Tek® OCT™ Compound in Cryomold® Intermediate Schälchen (beides Sakura Finetek) bei -80 °C eingefroren. Mit dem Reichert Jung 2800 Frigocut E Cryostat wurden bei -18 °C Gefrierschnitte mit einer Dicke von 7 bis 8 µm angefertigt, die auf einen Superfrost® plus Objektträger (Thermo Scientific) aufgegeben wurden und gegebenenfalls erneut bei -80 °C eingefroren wurden. Nach circa 10 Min. Auftauen wurde die Probe mit einem Delimiting Pen (Dako) umkreist, der ein Auslaufen der aufgetragenen Flüssigkeiten verhindern sollte. Die Objektträger befanden sich in einer Metallbox mit Wasser zum Schutz vor Verdunstung. Eine Stunde wurde mit PBT-1 inkubiert, um das Einbettungsmedium zu entfernen. Danach wurde erneut ein Kreis mit dem Delimiting Pen um die Probe gezogen. Der primäre Antikörper wurde in PBT-1 über Nacht bei 4 °C aufgebracht. Die Spülung erfolgte dreimal mit PBT-1 für jeweils 15 Min. und einmal mit PBT-2 für 15 Min. Der sekundäre Antikörper wurde in PBT-2 verdünnt und für 2 Std. aufgetragen. Es wurde dann dreimal mit PBS für 15 Min. gespült und für 3 Min. mit DAPI in PBS zur Kerndarstellung inkubiert. Je Probe wurden circa 10 µl Fluorescence Mounting Medium hinzugefügt, mit einem Standard Deckglas (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH) bedeckt und mit Klarlack (Carl Roth) an den Rändern des Deckglases versiegelt.

2.15 Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt (n=3) mit jeweils 3 - 10 Replikaten. Die Daten sind stets als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit IBM SPSS Statistics 21 (International Business Machines Corp., New York, USA) getestet. Ein Stern (★) zeigt an, dass es sich um eine Irrtumswahrscheinlichkeit auf dem 5%-Niveau handelt. Bei zwei Sternen (★★) beträgt das Signifikanzniveau 1%. Graphen wurden mit Microsoft Excel 14.3.9 erstellt.

Die verschiedenen Bedingungen bei der Evaluation des Neurosphären-Assays wurden über die einfaktorielle Varianzanalyse mit Mehrfachvergleichen im Post-hoc-Test nach Scheffé analysiert. Die statistische Auswertung der Klonalitätsversuche mit transgenen fluoreszierenden Zellen erfolgte mit der univariaten Varianzanalyse mit Mehrfachvergleichen im Post-hoc-Test nach Scheffé-Prozedur. Zusätzlich kamen hierbei T-Tests unabhängiger Stichproben zum Einsatz.

Im Experiment zur Klonalität in Abhängigkeit von Zelldichte und Bewegung der Platten wurde zudem eine zweifaktorielle Varianzanalyse angewandt.

2.16 Bildbearbeitung

Die Bilddateien wurden mit Adobe Photoshop CS5 mittels Tonwertkorrektur bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie von Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions und deren Sphären

3.1.1 Lichtmikroskopische Morphologie

Aus dem Spiralganglion neonataler Mäuse wurden unter Anwendung eines modifizierten Neurosphären-Assays Stammzellen isoliert. In einer serumfreien Suspensionskultur verfügten diese Zellen über das Potential Sphären zu bilden. Hierbei entstanden aus Einzelzellen nach wenigen Tagen sphärische Zellaggregate, die aus Stammzellen hervorgegangenen Sphären des Gehirns vergleichbar waren. Die Sphären waren rund bis oval, mit traubenartig dicht aneinander angeordneten Zellen, die im Inneren solide erschienen (**Abb. 5**). Sehr selten fanden sich hohle Sphären in den Kulturen, die im Inneren leer waren und nur aus einer äußeren Zellschicht bestanden. Diese wurden aufgrund ihrer Rarität nicht näher quantifiziert oder charakterisiert.

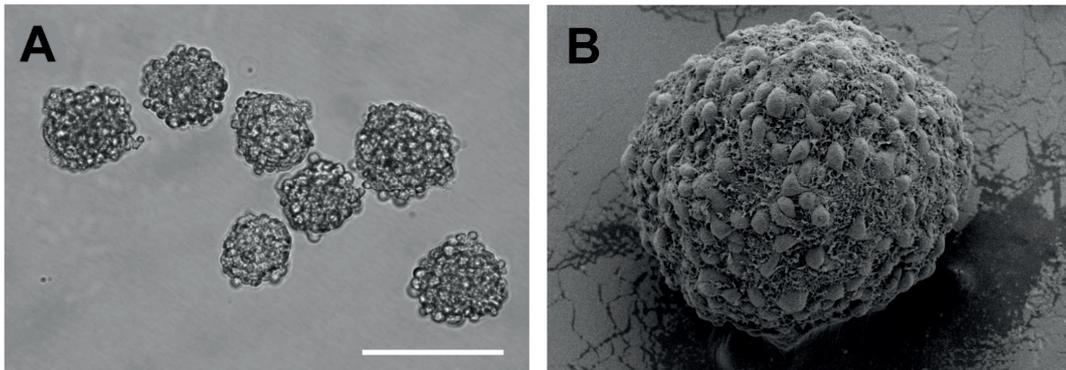


Abb. 5: Morphologie der Neurosphären. Lichtmikroskopische (A) und elektronenmikroskopische (B) Aufnahme zeigen die charakteristische traubenartige Kugelform der Sphären des Spiralganglions. Maßstabsbalken entspricht 100 μm in A, 20 μm in B.

Ein charakteristisches Merkmal junger, vitaler Sphären, die aus Stammzellen des Gehirns entstanden sind, sind Filopodien an deren Oberfläche, die ebenso bei Sphären aus Zellen des Spiralganglions zu finden waren. Des Weiteren zeigten sich diese Filopodien bereits partiell bei Einzelzellen wenige Stunden nach der Mikrodissektion (**Abb. 6**). Die Filopodien der Neurosphären, auch Microspikes genannt, konnten mit Hilfe des Phalloidins, einem Fluorescein-konjugierten Toxins gegen F-Aktin, immunhistochemisch dargestellt werden (**Abb. 7**).

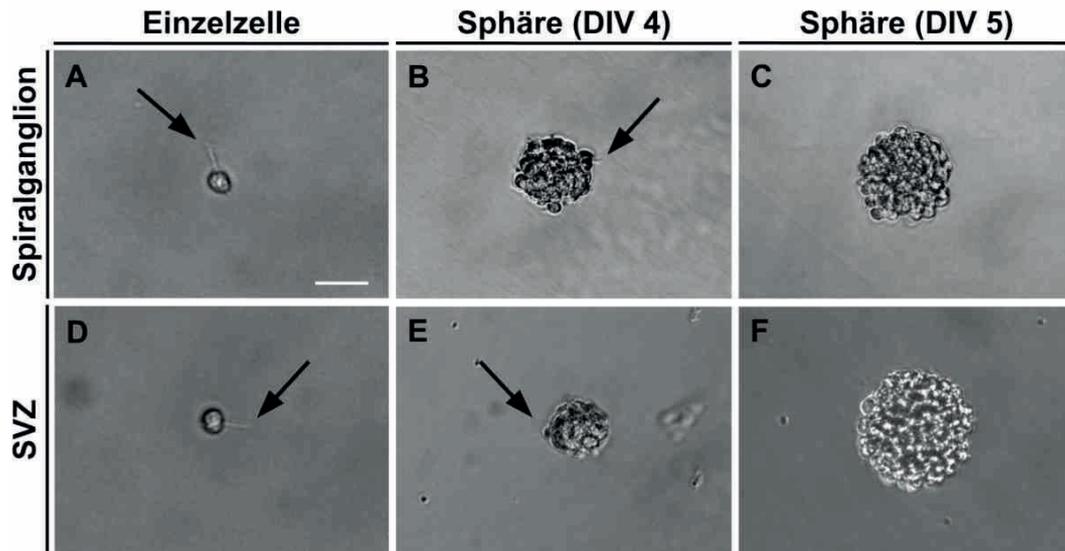


Abb. 6: Vergleich von Zellen und Sphären des Spiralganglions und der SVZ. Partiiell zeigten Einzelzellen des Spiralganglions (A) und der SVZ (D) Filopodien, sogenannte Spikes (Pfeil) auf der Oberfläche. Junge, vitale Sphären der SVZ (E) exprimierten ebenfalls Spikes (Pfeil) an der Oberfläche. Dieses Charakteristikum ließ sich zudem bei jungen Sphären des Spiralganglions finden (B). Morphologisch ähneln sich Neurosphären des Spiralganglions (C) und der SVZ sehr (F). DIV gibt die Kultivierungsdauer wieder. Maßstabsbalken entspricht 25 μm in A, D, 50 μm in B, C, E, F.

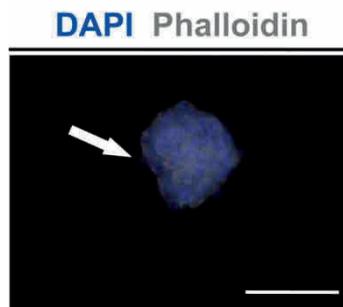


Abb. 7: Phalloidin-Färbung einer Sphäre. Sowohl das Zytoskelett als auch die sogenannten Microspikes (Pfeil) der Neurosphären konnten mit Hilfe von Phalloidin dargestellt werden. Maßstabsbalken entspricht 60 μm .

3.1.2 Ultrastrukturelle Untersuchung der Sphären

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden Querschnitte durch Sphären näher untersucht. Frei schwimmende, dreidimensionale Neurosphären entstehen unter Anwendung des modifizierten Neurosphären-Assays aus Stamm- und Vorläuferzellproliferation. Über dieses System lassen sich Stamm- und Vorläuferzellen daher *in vitro* genauer charakterisieren. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Sphären im Inneren nicht hohl sind, sondern auch dort Zellen dicht gepackt aneinander liegen (**Abb. 8**). Vereinzelt fanden sich Spalten im Interzellularraum. Außerdem zeigten sich gelegentlich leere Vakuolen und vakuolige Erscheinungen, die mit spiralartigen Gebilden gefüllt erschienen. Diese mit exzentrisch aneinander gelagertem Material gefüllten Vakuolen stellten degenerierte Reste der Membran von Mitochondrien dar. Die leeren Vakuolen könnten einerseits durch Fixierung und Trocknung hervorgerufene Artefakte gewesen sein, aber auch einen Hinweis auf beginnende Nekrose geben. Völlig intakte Zellen lagen unmittelbar neben Zellen, die sich in Degeneration befanden. Pseudopodienartige Fortsätze an der Oberfläche setzten sich über die Interzellularräume bis ins Innere der Sphären fort. Die Zellen hatten große Nuclei.

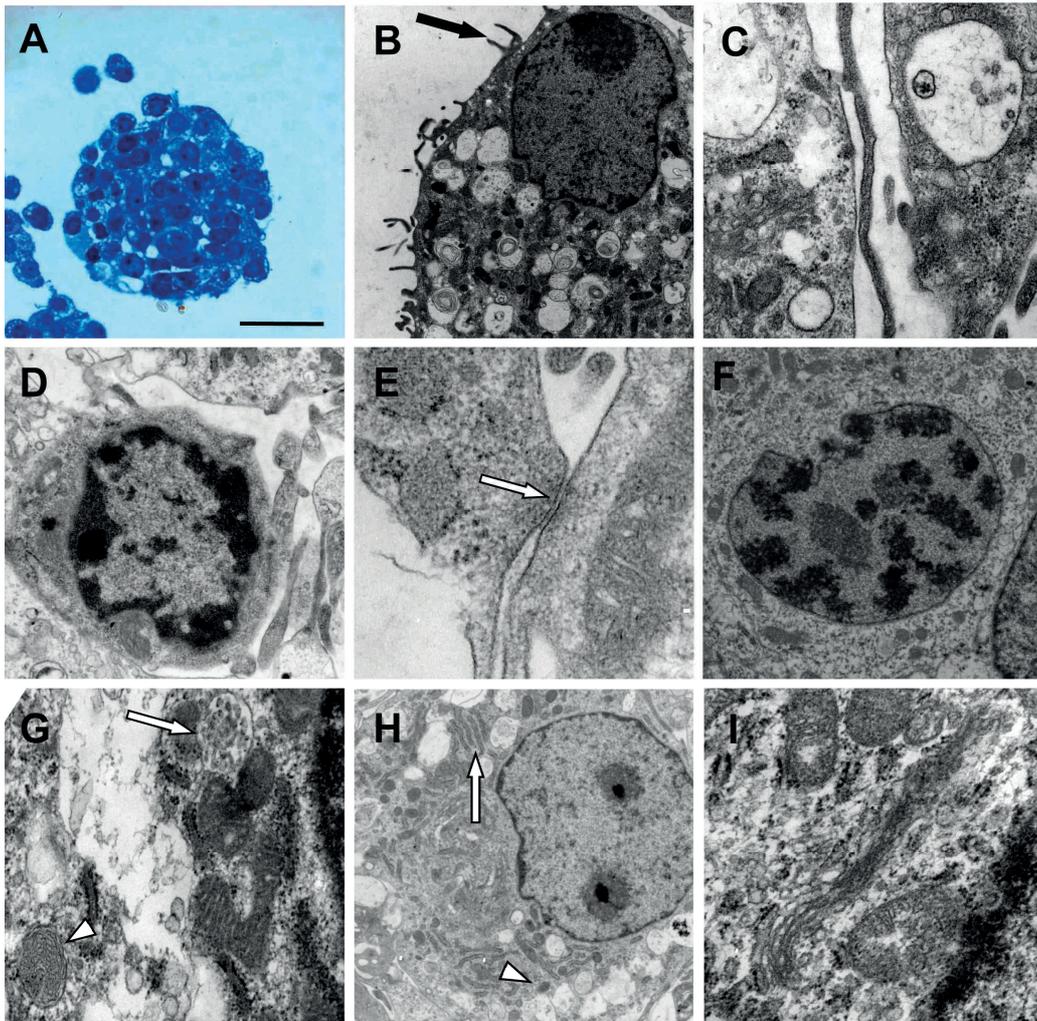


Abb. 8: Ultrastrukturelle Untersuchung von Sphären. A zeigt einen Semidünnschnitt gefärbt nach Richardson durch eine Sphäre des Spiralganglions mit dicht aneinander gelagerten Zellen. B-I stellen transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch Sphären dar. Artefaktbildung oder degenerierte Mitochondrien fanden sich innerhalb von Einzelzellen (B). Filopodien waren sowohl auf der Außenseite der Neurosphäre (B, Pfeil) als auch in den Interzellularräumen zu finden (C). Apoptotische Zellen (D) zeigten kein besonderes Verteilungsmuster innerhalb der Sphäre. Als Verbindungsform der Zellen untereinander fungierten Adherens Junctions (E, Pfeil). Zellen mit Heterochromatin (F) waren Anhaltspunkt für inaktive DNA-Synthese, beispielsweise nach Mitose. Peroxisom (G, Pfeilspitze) und Mikrotubulus (G, Pfeil) stellten wichtige Bestandteile einer aktiven Zelle dar. Raues endoplasmatisches Retikulum (H, Pfeil), Ribosomen (H, Pfeilspitze) und Golgi Apparat (I) wiesen auf die metabolische Aktivität der Zellen hin. Maßstabsbalken entspricht 200 nm in E, H, 500 nm in C, G, I, 1 μm in B, D, 2 μm in F, 25 μm in A.

Gelegentlich konnte eine beginnende Apoptose, die mit einer Kondensation des Chromatins, Kernzerfall und Schrumpfung der Zelle einhergeht, beobachtet werden. Als Verbindungsform zwischen den Zellen fungierten Adherens Junctions. Es konnten Zellen entdeckt werden, bei denen der Nucleus viel Heterochromatin enthielt, das durch seine inaktive Form stark kondensiert vorlag und daher sehr dunkel erschien. Strukturen, die partiell einem Mikrotubulus glichen, als Teil des Spindelapparates während der Mitose, waren ebenfalls in den Zellen der Sphären zu finden. Zudem fand sich ein Organell mit diffuser Organisation im Inneren, das ein Peroxisom darstellen könnte. Die Zellen zeigten Bereiche in denen große Mengen an endoplasmatischem Retikulum oder Mitochondrien enthalten waren. Dies ist ein Indiz für den hohen Energieumsatz von proliferierenden Zellen. Zudem waren Organellen, wie der Golgi-Apparat mit Zisternen erkennbar, der sich charakteristischerweise direkt neben dem Nucleus befand und eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel einnimmt.

3.2 Proliferation der Sphären

3.2.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Sphärenbildung

Zur Reevaluation des Neurosphären-Assays wurden Wachstumsfaktoren, die als Teil dieses Assays Verwendung finden, alleine oder in verschiedenen Kombinationen miteinander im Hinblick auf das Potential Sphärenwachstum anzuregen verglichen (**Abb. 9**). Als Kontrolle fungierte BSA ohne weitere Wachstumsfaktoren, was durchschnittlich lediglich $2,6 \pm 0,8$ Sphären/2500 Zellen hervor brachte. Die Faktoren EGF mit $5,4 \pm 2,0$ Sphären/2500 Zellen oder IGF-1 mit $5,7 \pm 2,9$ Sphären/2500 Zellen zeigten nicht signifikant mehr Sphären als jeweils einzige Wachstumsfaktoren. bFGF als alleiniger Faktor generierte $58,7 \pm 8,8$ Sphären/2500 Zellen, was eine signifikant höhere Anzahl an Sphären im Vergleich zur Kontrollgruppe war ($P < 0,01$; $n=3$). Tendenziell verstärkt wurde dieser Effekt noch durch HS womit durchschnittlich $67,8 \pm 13,3$ Sphären/2500 Zellen entstanden. In den Kombinationen von EGF mit bFGF entstanden $73,2 \pm 7,5$ Sphären/2500 Zellen, durch Zusatz von HS $84,7 \pm 15,5$ Sphären/2500 Zellen. IGF-1 zusammen mit bFGF als Mediumbeigabe generierten mit durchschnittlich $63,7 \pm 13,3$ Sphären/2500 Zellen ebenfalls signifikant mehr Sphären als die Kontrolle ($P < 0,01$; $n=3$). Ein leichter Anstieg auf $75,7 \pm 13,6$ Sphären/2500 Zellen wurde auch hierbei über den Zusatz von HS erreicht.

Die Kombination von EGF, IGF-1 und bFGF brachte durchschnittlich $86,1 \pm 8,5$ Sphären/2500 Zellen hervor, was ebenfalls signifikant mehr als bei der Kontrollgruppe war ($P < 0,01$; $n=3$). Die Zugabe von HS zu dieser Dreierkombination verstärkte die Sphärenbildung auf durchschnittlich $106,7 \pm 4,5$ Sphären/2500 Zellen zusätzlich und war gleichfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($P < 0,01$; $n=3$) (**Abb. 9**). EGF und IGF-1 zeigten eine nur geringfügig erhöhte Sphärenbildung. Eine signifikante Steigerung dieses Effekts konnte durch die Zugabe von bFGF erreicht werden ($P < 0,01$; $n=3$). Dadurch stellte sich bFGF als potentester der hier verwendeten Wachstumsfaktoren heraus, da dieser alleine oder in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren oder HS die Sphärenbildung forcierte. Die Kombination aller vier Komponenten zeigte eine weitere Erhöhung im Vergleich zu den übrigen Bedingungen. Da hierdurch die maximale Anzahl an gebildeten Sphären erreicht wurde, wurde dies als Standard für die weiteren Experimente genutzt.

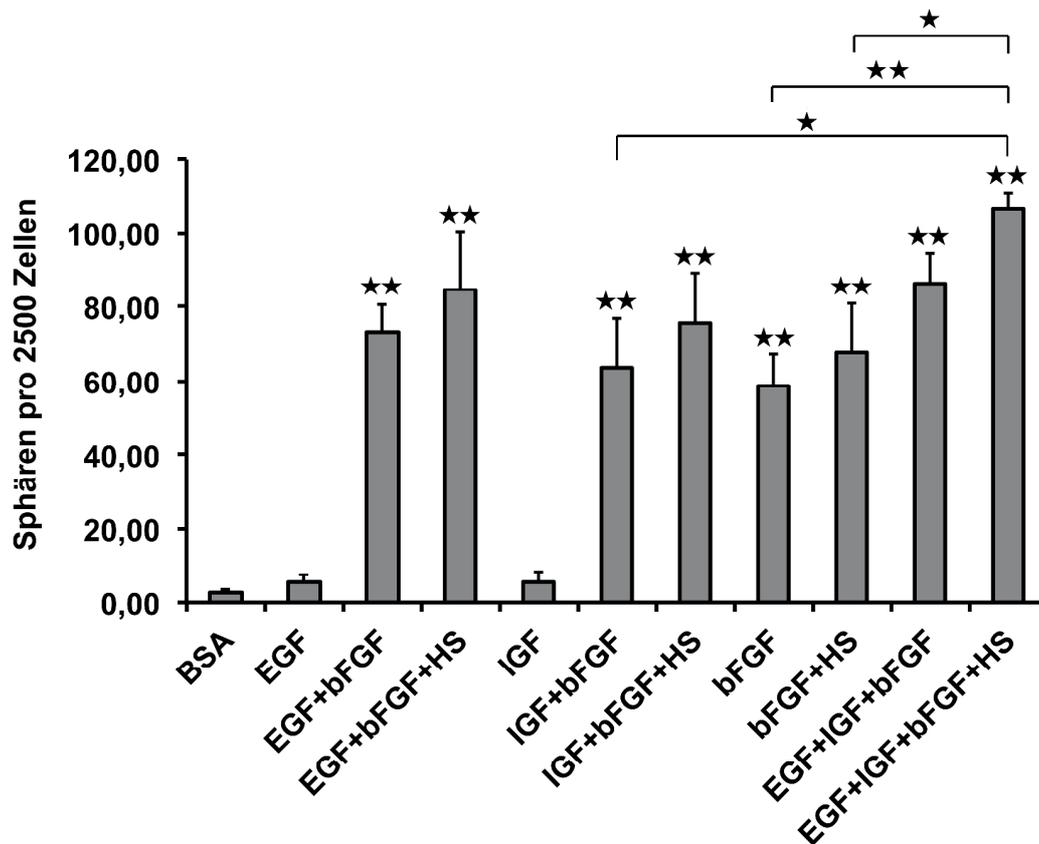


Abb. 9: Sphärenbildung in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren. Neurosphären des Spiralganglions proliferierten unterschiedlich stark bei Zugabe verschiedener Mitogene. bFGF und variable Kombinationen mit EGF, IGF-1 und dem Proteoglykan HS brachten signifikant mehr Sphären hervor als die Kontrollgruppe BSA ($P < 0,01$). bFGF alleine ($P < 0,01$), bFGF plus HS ($P < 0,05$) und IGF-1 mit bFGF ($P < 0,05$) waren signifikant weniger potent in Bezug auf die Anregung der Sphären zum Wachstum im Vergleich zu EGF, IGF-1, bFGF und HS. bFGF schien daher der Faktor zu sein, der das Wachstum der Neurosphären des Spiralganglions am besten stimuliert. ★★ kennzeichnet $P < 0,01$, ★ kennzeichnet $P < 0,05$.

3.2.2 Wachstumsverlauf der Sphärenbildung

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens von Sphären wurden Sphären ab dem ersten Tag in Kultur beobachtet. Täglich wurde eine repräsentative Stichprobe aus den Kulturplatten entnommen und der maximale Durchmesser, die Zellzahl und das Volumen der entstanden Sphären ermittelt. Schon nach DIV 1 fanden sich kleine Zellanhäufungen, die kontinuierlich bis zu DIV 7 anwuchsen.

Dieses Verhalten zeigte sich sowohl bei der primären Generation, aber auch nach Propagation in der sekundären und tertiären Generation (**Abb. 10**). Die drei Parameter verhielten sich in allen Generationen völlig gleichmäßig, das heißt, Wachstum fand in gleichem Maße statt. Mit dem Wachstum der Sphären stieg sowohl der maximale Durchmesser als auch die Zellzahl und das Volumen nahm zu. Der Anstieg der Zellzahl lässt vermuten, dass innerhalb der Sphären keine Volumenexpansion der Zellen stattfand. Die entscheidenden Faktoren für das Wachstum schienen die Proliferation und wahrscheinlich Aggregation zu sein. Zwischen den Generationen war lediglich ein Unterschied hinsichtlich der Größe und damit einhergehend der Zellzahl und des Volumens der Sphären an DIV 1 zu erkennen, da die primäre Generation einen besseren Dissoziierungsgrad aufwies als die folgenden Generationen (siehe Kapitel Propagation). Im weiteren Verlauf waren die Werte der ersten beiden Generationen bis auf kleine Abweichungen nahezu identisch. Die Werte der dritten Generation lagen ab DIV 3 darunter, was bedeutet, dass die Sphären der dritten Generation etwas kleiner waren und entsprechend aus weniger Zellen bestanden.

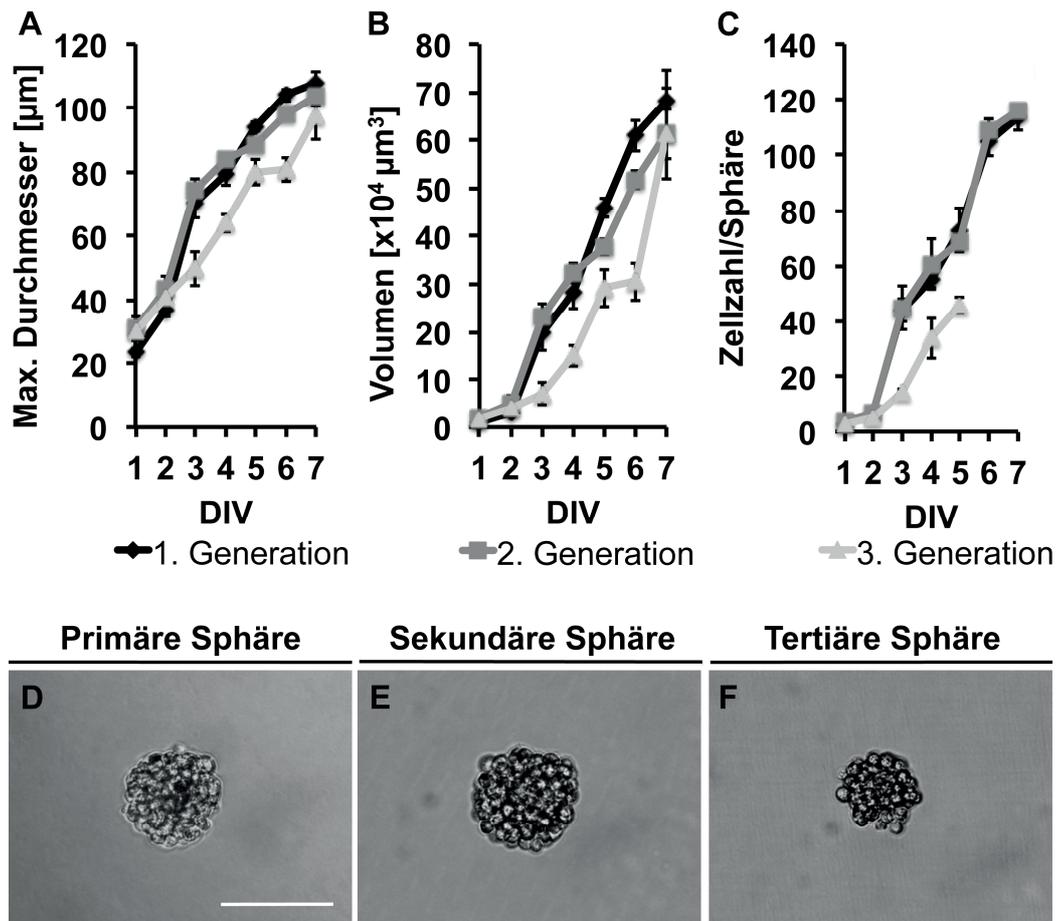


Abb. 10: Morphologie und Wachstumscharakteristika primärer und propagierter Sphären. Die kontinuierliche Größenzunahme (A) und der Volumenzuwachs (B) von Kultivierungstag (DIV) 1 bis 7 sind durch den Anstieg der Zellzahl bedingt (C) und weisen innerhalb der verschiedenen Generationen einen ähnlichen Verlauf auf. Aufgrund schlechter Adhärenz tertiärer Sphären konnte ab DIV 6 keine Zellzahl pro Sphäre mehr bestimmt werden. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen die morphologische Analogie primärer (D), sekundärer (E) und tertiärer Sphären (F). Maßstabsbalken entspricht 100 μm in D-F.

In einem Zeitraum von DIV 1 bis 7 wuchsen die Sphären kontinuierlich. Es zeigte sich eine hohe Homologie und damit morphologische Ähnlichkeit der primären, sekundären und tertiären Generation hinsichtlich der Entwicklung von Größe, Volumen und Zellzahl der Sphären.

3.3 Proliferation und Nestinexpression der Sphären

Zur Beweisführung, dass Sphären nicht nur aus primären, sondern auch propagierten proliferierenden Zellen entstanden waren, wurden die Marker BrdU und Ki-67 in den Kulturen getestet und quantitativ analysiert.

Da BrdU als Analogon anstelle des Thymidins während der DNA Replikation eingebaut wurde, markierte es Zellen, die durch Teilung in der S-Phase BrdU inkorporiert hatten (**Abb. 11**). Der Ki-67-Antikörper hingegen färbte nur Zellen an, die sich gerade in der Teilung befanden (**Abb. 11**). In ruhenden Zellen, das heißt Zellen in der G0-Phase, ist Ki-67 nicht detektierbar. Bei den primären Sphären waren $75,7 \pm 0,8\%$ der Sphärenzellen BrdU-positiv und $4,7 \pm 0,4\%$ Ki-67-positiv. Nach der Propagation waren $38,2 \pm 1,6\%$ der sekundären Sphärenzellen BrdU-positiv und $3,1 \pm 0,2\%$ Ki-67-positiv. In der tertiären Generation waren noch $10,4 \pm 4,3\%$ der Zellen BrdU-positiv und $2,6 \pm 0,7\%$ Ki-67-positiv. Primäre Sphären zeigten die höchste Proliferationsrate, welche nach Propagation signifikant abnahm ($P < 0,05$).

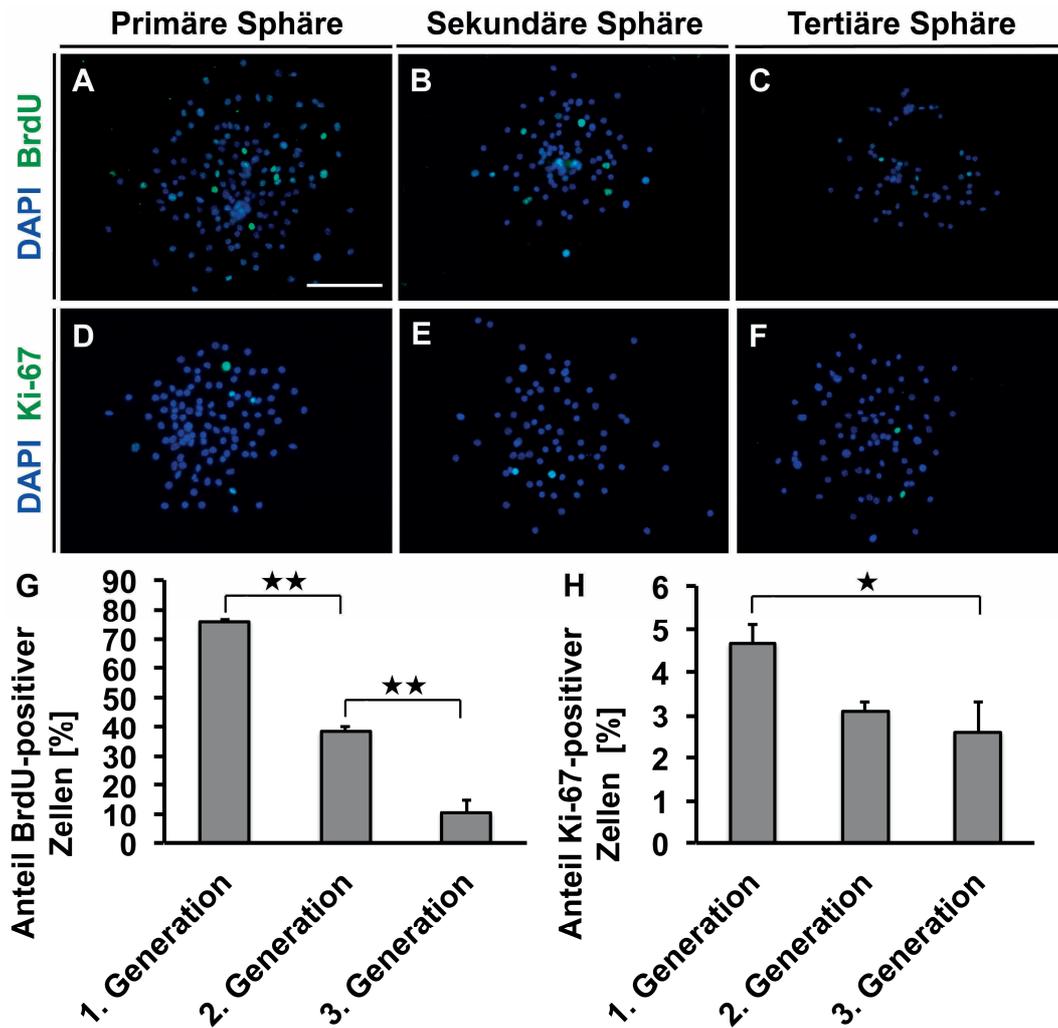


Abb. 11: Proliferationsaktivität primärer und propagierter Sphären. Immunhistochemisch untersucht wurde hierfür die BrdU- (A-C, G) und Ki-67-Expression (D-F, H). Zellen primärer Sphären (A, D) wiesen eine hohe Proliferationsrate auf, die im Verlauf der Propagation sinkt (G, H). Sekundäre (B, E) und tertiäre (C, F) Sphären blieben nach Propagation mitotisch aktiv (G, H). Maßstabsbalken entspricht 100 μ m in A-F. ** kennzeichnet $P < 0,01$, * kennzeichnet $P < 0,05$.

Nestin als Intermediärfilament in Stamm-/Vorläuferzellen wurde in primären, sekundären und tertiären Sphären nachgewiesen (**Abb. 12**). Auch nach Propagation wurde dieser Stamm-/Vorläuferzellstatus beibehalten. Der Anteil der Nestin-positiven Zellen war in primären Sphären signifikant höher als in propagierten Sphären ($P < 0,01$).

Das Proliferationspotential der Sphären blieb über die Generationen hinweg erhalten, verringerte sich jedoch. Ebenso verhielt sich die Nestinexpression innerhalb der Sphären.

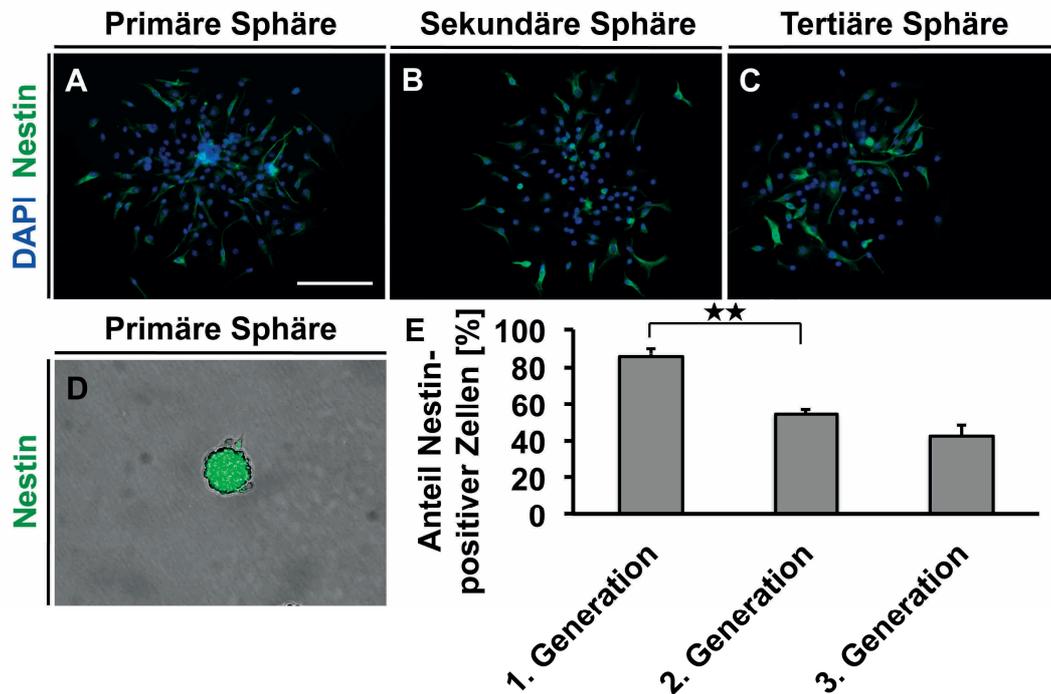


Abb. 12: Nestinexpression primärer und propagierter Sphären. Zellen primärer Sphären (A, D) exprimierten zum Großteil Nestin (E). Die Expression dieses Markers blieb bei sekundären (C) und tertiären (D) Sphären nach Propagation erhalten, wenngleich der Anteil der positiven Zellen abnahm (E). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (A-C). Maßstabsbalken entspricht 100 μ m in A-D. ★★ kennzeichnet $P < 0,01$.

3.4 Nachweis der Klonalität

3.4.1 Nachweise der Klonalität mittels transgener Tiere

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den frei flotierenden Gebilden in der Suspensionskultur tatsächlich um klonale Sphären und nicht um zusammengelagerte Zellaggregate handelt, wurden Experimente mit fluoreszierenden Zellen durchgeführt. Diese farblich markierten Zellen sollten anzeigen, welche Sphären klonal aus einer Einzelzelle entstanden waren.

In der ersten Versuchsreihe wurden transgene GFP-Mäuse zusammen mit Balb/c-Mäusen präpariert und deren Zellen miteinander inkubiert, um zu analysieren, ob Sphären klonalen Ursprungs sind (**Abb. 13**).

Es wurden GFP-Zellen und nicht fluoreszierende Zellen des Spiralganglions zu gleichen Teilen ko-kultiviert. Daraus entstanden in der primären und sekundären Generation jeweils sowohl ausschließlich nicht fluoreszierende als auch grün-fluoreszierende Sphären.

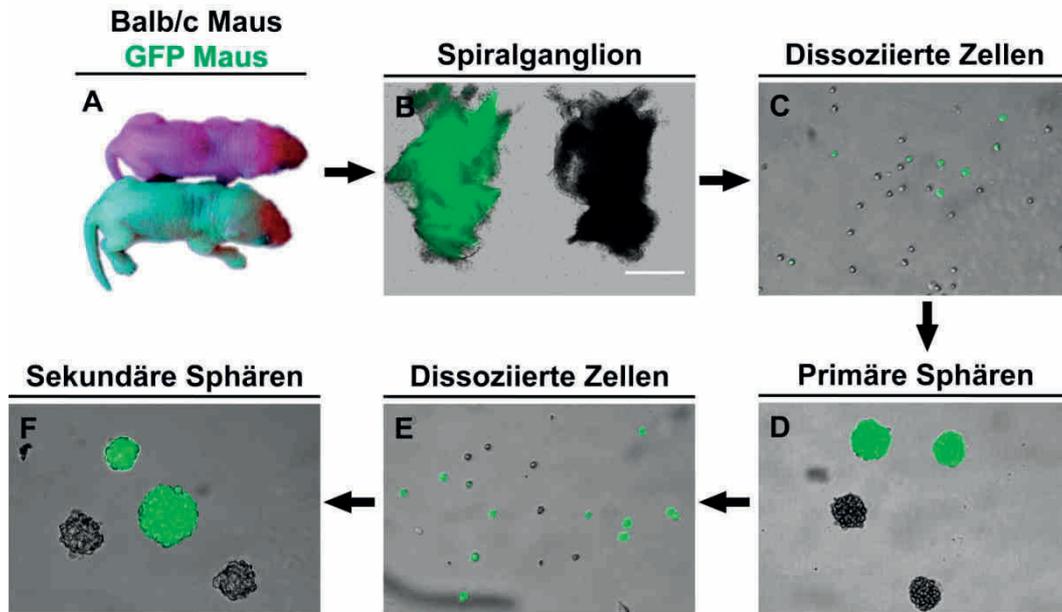


Abb. 13: Klonalitätsassay mit Hilfe grün-fluoreszierender Zellen. Aus GFP- und Balb/c-Neonaten (A) wurde jeweils das Spiralganglion isoliert (B) und eine Suspension aus grün- und nicht fluoreszierenden Zellen zu gleichen Teilen angefertigt (C). Aus diesen Zellen entstanden nach wenigen Tagen einfarbige, klonale GFP-positive und nicht fluoreszierende Sphären (D). Durch erneute Dissoziation dieser Sphären (E) entstanden sekundäre klonale Sphären (F). Maßstabsbalken entspricht 100 µm in B-F.

Da die Möglichkeit bestand, dass grün-fluoreszierende Sphären einzelne nicht fluoreszierende, angeheftete Zellen maskierten und die starke Leuchtkraft eine nicht fluoreszierende Zelle überdecken könnte, wurden DsRed-Mäuse in Verbindung mit GFP-Mäusen im weiteren Verlauf herangezogen. DsRed-Mäuse hatten zum einen den Vorteil, dass sie nicht durch GFP-Zellen überstrahlt werden konnten und dass beide Mausstämme fortan den gleichen genetischen Hintergrund hatten. Da C57BL/6 beiden Stämmen zugrunde lag, konnte hierdurch ausgeschlossen werden, dass die Inzidenz der Chimärenbildung der Neurosphären durch diesen Faktor beeinflusst war. Somit wurden zum Nachweis der Klonalität Spiralganglien aus GFP-Neonaten und DsRed-Neonanten isoliert und deren Zellen zu gleichen Teilen ko-kultiviert (**Abb. 14**).

Es entstanden sowohl primäre klonale Sphären und nach Propagation ebenfalls sekundäre klonale Sphären.

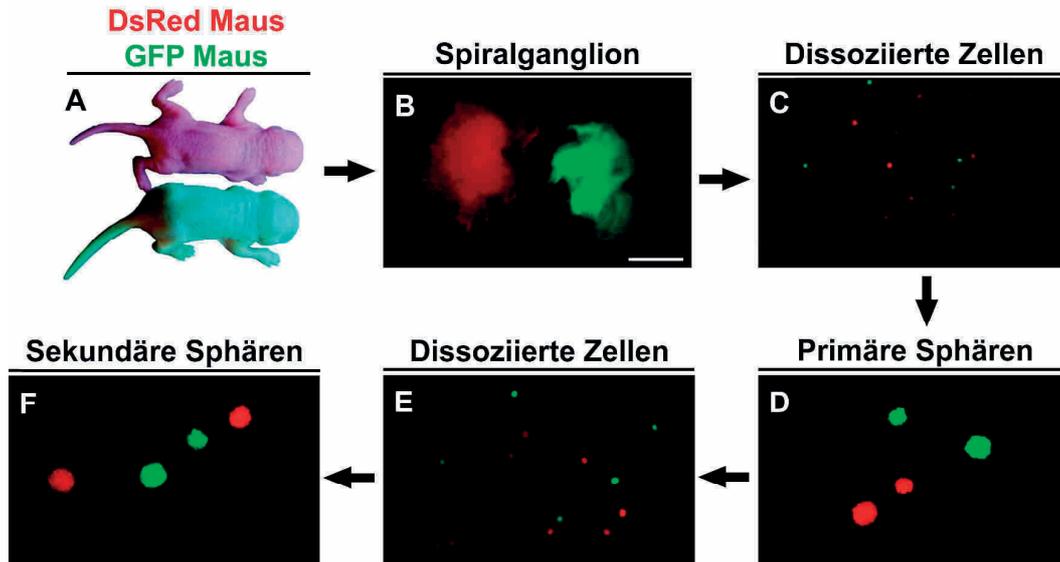


Abb. 14: Klonalitätsassay mit Hilfe fluoreszierender Zellen. Aus GFP- und DsRed-Neonaten (A) wurde jeweils das Spiralganglion isoliert (B) und eine Ko-Kultur zu gleichen Teilen angefertigt (C). Aus diesen Zellen entstanden nach wenigen Tagen einfarbige, klonale GFP-positive und DsRed-positive Sphären (D). Durch erneute Dissoziation dieser Sphären (E) entstanden sekundäre Sphären klonalen Ursprungs (F). Maßstabsbalken entspricht 100 μm in B-F.

Durch die Mischung von grün- und rot-fluoreszierenden Zellen in der Suspensionskultur konnte beobachtet werden, dass selbst bei geringer Zelldichte immer wieder Aggregation von Zellen und Sphären stattfand. Dies betraf einerseits Sphären, die miteinander fusionierten, aber auch Einzelzellen, die sich entweder mit Einzelzellen konjugierten oder mit Sphären aggregierten. Neben klonalen Sphären konnten somit in den Kulturplatten ebenso chimäre Sphären in unterschiedlichem Maß detektiert werden (**Abb. 15**). Als Chimäre galt eine Sphäre sobald nur eine einzelne andersfarbig-fluoreszierende Zelle an oder in der Sphäre zu erkennen war.

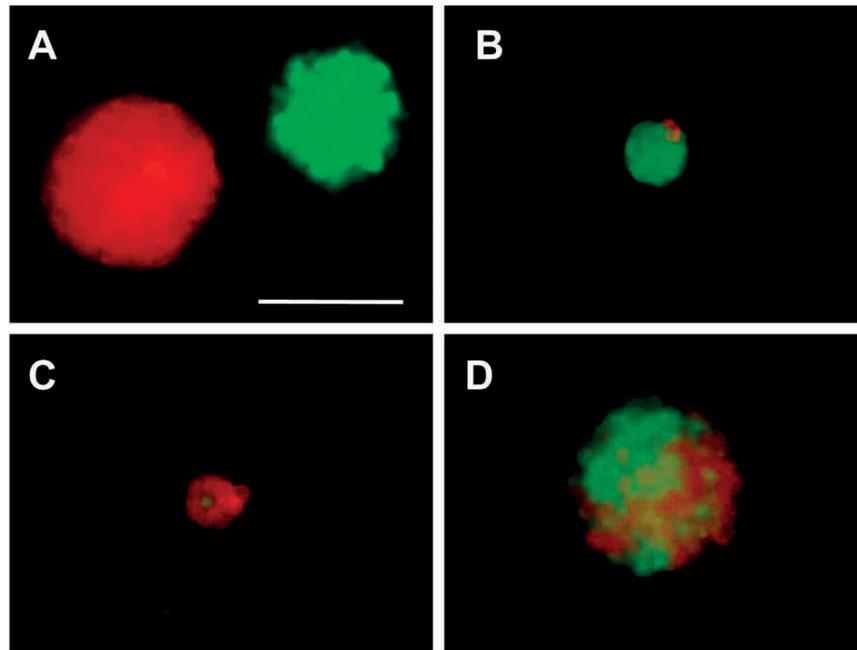


Abb. 15: Formen klonaler und chimärer Sphären. Im Neurosphären-Assay entstanden sowohl klonale GFP-positive Sphären als auch klonale DsRed-positive Sphären (A). Außerdem waren verschiedene Formen der Aggregation vorzufinden (B-D). Es kam sowohl zur Anlagerung einzelner DsRed-Zellen an GFP-positive Sphären (B) und vice versa (C), womit diese Sphären als Chimäre gewertet wurden. Überdies kam es zur Verklumpung ganzer Sphären miteinander (D). Maßstabsbalken entspricht 100 μm in A-D.

3.4.2 Aggregation von Neurosphären in Abhängigkeit verschiedener Parameter

Ausgehend von der Beobachtung, dass Chimärismus bei der Sphärenbildung eine wichtige Rolle spielt, wurden die Faktoren hierfür näher ergründet. In drei unterschiedlichen Zelldichten wurden GFP- und DsRed-Zellen zu gleichen Teilen ko-kultiviert und an verschiedenen Tagen der Inkubation auf Chimärismus hin untersucht. Dabei wurde der Anteil der klonalen, das heißt ausschließlich einfarbig-fluoreszierenden Sphären ermittelt. Der Anteil der klonalen Sphären an DIV 2 war signifikant unterschiedlich zwischen der sehr niedrigen, der mittleren und der hohen Zelldichte ($P < 0,01$; $n=3$) (**Abb. 16A**). Ebenso verhielt es sich mit den Zelldichten an DIV 7 ($P < 0,05$; $n=3$). Auch hierbei bestanden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelldichten. Betrachtete man die Zelldichten 0,5 Zellen/ μl und 10 Zellen/ μl , fiel auf, dass der Anteil der klonalen Sphären zwischen den Kulturtagen signifikant unterschiedlich war ($P < 0,01$; $n=3$).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierungsdauer bei geringen und mittleren Zelldichten ein wichtiger Parameter im Hinblick auf Chimärenbildung bei Neurosphären darstellt und die Klonalität nachteilig beeinflusst. Bei der Dichte 25 Zellen/ μ l bestand hingegen kein signifikanter Unterschied im Anteil an klonalen Sphären an DIV 2 und 7. In allen Einzelversuchen war bei der Dichte 25 Zellen/ μ l die Gesamtzahl an Neurosphären, die größer oder gleich 40 μ m waren, an DIV 2 höher als an DIV 7. Die Bedingungen für klonales Wachstum waren jedoch in dieser hohen Zelldichte unabhängig vom Zeitpunkt der Beobachtung nicht gegeben.

Um einen weiteren Faktor zu untersuchen, der sich potentiell nachteilig auf die Klonalität von Neurosphären während der Entstehung auswirken könnte, wurden Platten in unterschiedlichen Zelldichten bei Bewegung oder Bewegungslosigkeit während der Inkubation beobachtet. Diese Versuchsreihe sollte die Effekte der Bewegung von Kulturplatten zur täglichen Untersuchung, wie beispielsweise Mikroskopierung, analysieren.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab, dass es an DIV 3 sowohl zwischen Bewegung und Bewegungslosigkeit einen signifikanten Unterschied ($P < 0,01$; $n=3$), als auch zwischen den einzelnen Zelldichten einen signifikanten Unterschied im Anteil an klonalen Sphären gab ($P < 0,01$; $n=3$). Einerseits hatte die steigende Zelldichte einen Einfluss auf die Chimärenbildung von Neurosphären. Je höher die Zelldichte lag, desto mehr Aggregation fand statt (**Abb. 16B**). Andererseits wurde durch die tägliche Bewegung der Platten im Vergleich zu den unbewegten Platten die Chimärenbildung ebenfalls begünstigt. Im weiteren Verlauf wurden dann Zelldichte, Kultivierungsdauer und primäre gegen sekundäre Sphären gemeinsam untersucht. Dabei wurden die Platten bis zur Auswertung an DIV 3 oder 7 nicht bewegt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test nach Scheffé ergab, dass es zwischen der primären und sekundären Generation jeweils an DIV 3 und 7 signifikante Unterschiede zwischen den Zelldichten ($P < 0,01$; $n=3$) und zwischen den Generationen ($P < 0,01$; $n=3$) gab. Demnach hat das Passagieren eine negative Auswirkung auf das Konglomerationsverhalten der Sphären, was durch steigende Zelldichte noch begünstigt wird. Betrachtet man den Anteil der klonalen Sphären der primären Generation an unterschiedlichen Kulturtagen, ist zu erkennen, dass bei niedriger Zelldichte, das heißt 0,5 bis 10 Zellen/ μ l, ein signifikanter Unterschied zwischen DIV 3 und 7 bestand (T-Test; $P < 0,05$; $n=3$).

In der sekundären Generation waren leichte Tendenzen im Hinblick auf die Klonalität in unterschiedlichen Zelldichten erkennbar, wobei bei der Dichte 5 Zellen/ μL ein signifikanter Unterschied zwischen DIV 3 und 7 vorlag ($P < 0,05$; $n=3$). Analysiert man den dritten Kulturtag der primären Generation im Vergleich zur sekundären Generation im Hinblick auf die Klonalität bei steigender Zelldichte stellte sich heraus, dass die mittleren und hohen Zelldichten, von 1 Zelle/ μL bis 25 Zellen/ μL signifikant unterschiedlich waren ($P < 0,05$; $n=3$) (**Abb. 16C**).

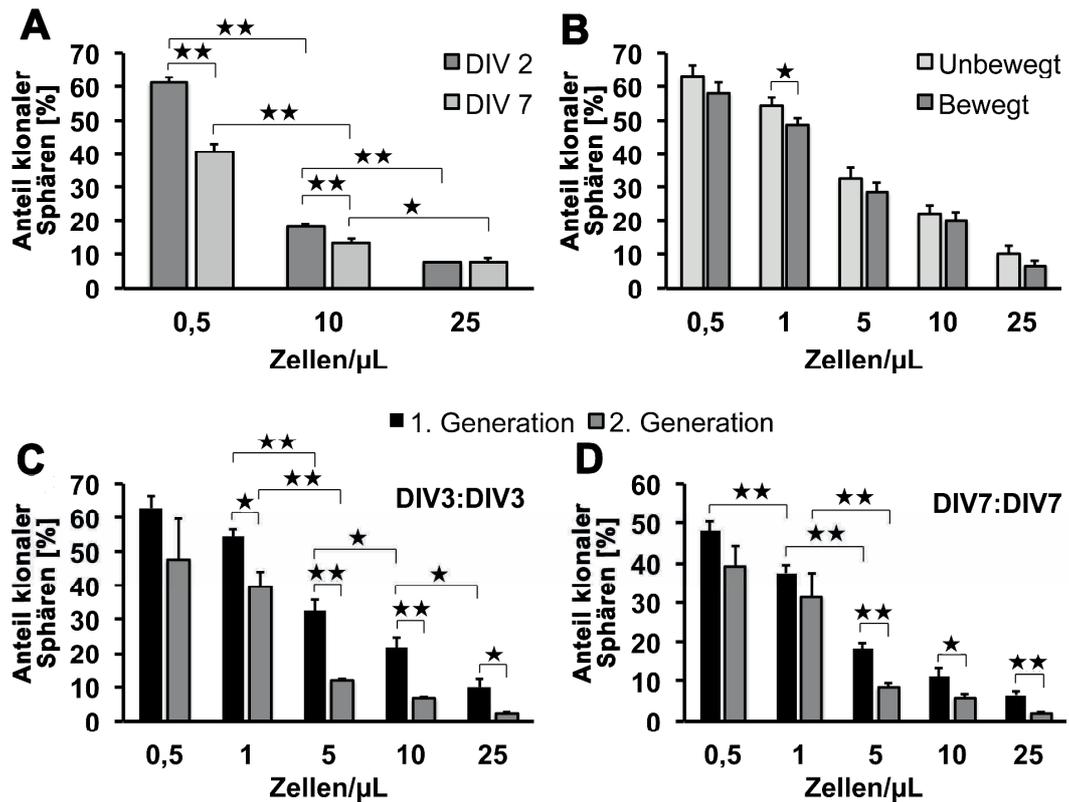


Abb. 16: Parameter, die die Klonalität von Neurosphären beeinflussen. Bereits nach 2 DIV waren weniger primäre Sphären bei niedriger Zelldichte (0,5 Zellen/ μL) klonal (A). Je länger die Neurosphären in Kultur blieben, desto niedriger wurde der Anteil der klonalen Sphären in Abhängigkeit steigender Zelldichte (A). Daneben stellte sich die Bewegung der Platten nach DIV 3 als nachteiliger Faktor für klonales Wachstum primärer Sphären heraus (B). Sekundäre Neurosphären aggregierten häufiger nach DIV 3 (C) und DIV 7 (D) als primäre Sphären. ★★ kennzeichnet $P < 0,01$, ★ kennzeichnet $P < 0,05$.

Am dritten Kultivierungstag der primären Generation bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Zelldichte 0,5 Zellen/ μl im Vergleich zu 1 Zelle/ μl , 1 Zelle/ μl zu 5 Zellen/ μl sowie 5 Zellen/ μl zu 10 Zellen/ μl ($P < 0,01$ oder $P < 0,05$; $n=3$) (**Abb. 16C**). In der primären Generation an DIV 7 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Zelldichte 0,5 Zellen/ μl im Vergleich zu 1 Zelle/ μl sowie 1 Zelle/ μl zu 5 Zellen/ μl ($P < 0,01$; $n=3$) (**Abb. 16D**). Die sekundären Sphären zeigten sowohl an DIV 3 als auch DIV 7 einen signifikanten Unterschied bei dem Vergleich der Zelldichte 1 Zelle/ μl zu 5 Zellen/ μl ($P < 0,01$; $n=3$) (**Abb. 16C, D**).

Um das Aggregationsverhalten von Sphären zu untersuchen, wurden 25 klonale GFP-Sphären und 25 klonale DsRed-Sphären zusammen in ein Well gegeben. Nach 16 Stunden wurde die Anzahl der verbliebenen Sphären ermittelt. In der primären Generation waren lediglich $18,7\% \pm 2,1\%$ der Sphären verblieben. Sekundäre Sphären waren nach 16 Stunden noch zu einem Anteil von $13,6\% \pm 5,9\%$ vorhanden (**Abb. 17**). Keine der verbliebenen Sphären war zugrunde gegangen. Tatsächlich unterschied sich die Anzahl an verbliebenen Sphären im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ($P < 0,01$ oder $P < 0,05$; $n=3$). Dabei entstanden teilweise größere Klumpen, die anzeigten, dass mehrere Sphären miteinander fusioniert waren.

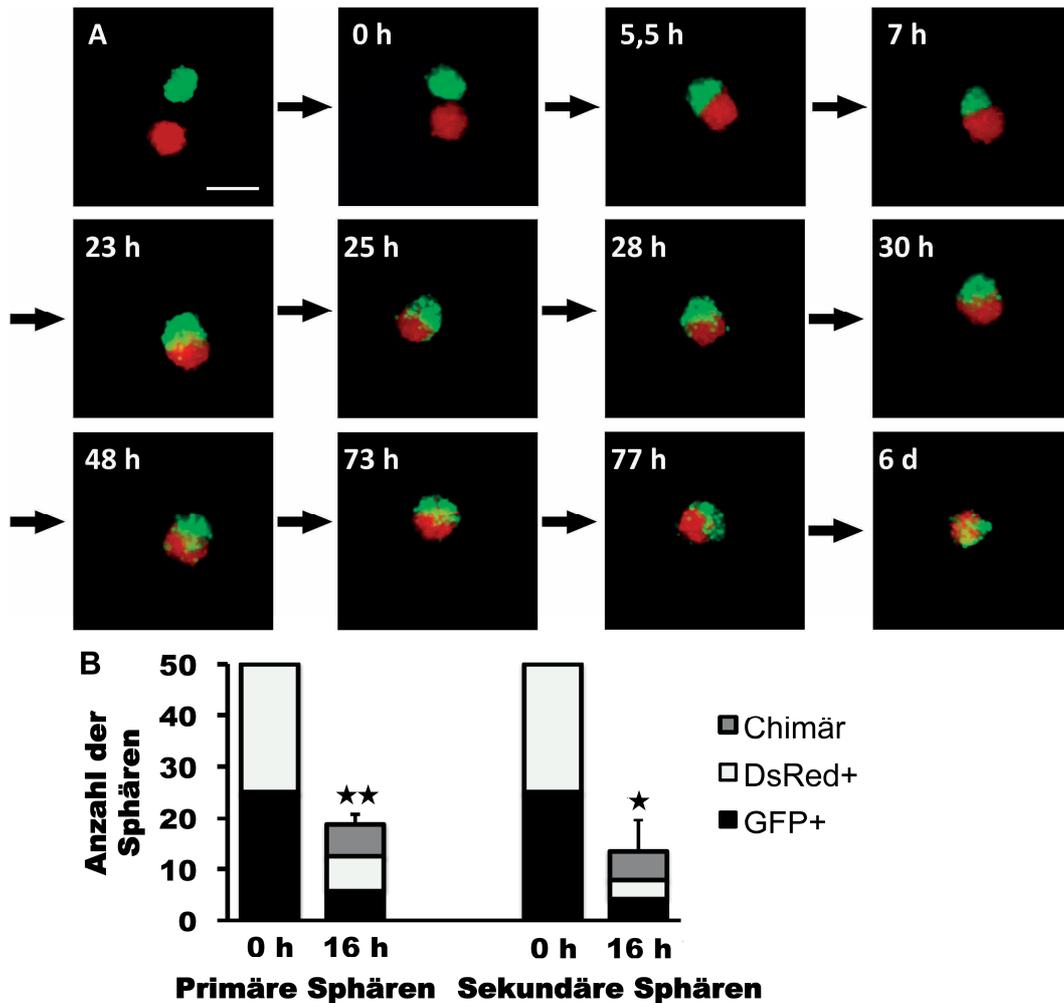


Abb. 17: Aggregation von Sphären. Dargestellt ist die Zeitrafferaufnahme der Aggregation einer GFP-positiven und einer DsRed-positiven Sphäre (A) im Zeitverlauf über 6 Tage hinweg. Bereits kurz nach der ersten Berührung (0 h) begannen die Sphären miteinander zu verschmelzen (5,5 h). Nach einem Tag durchmischten sich die Zellen allmählich (23 h, 25 h) und waren nach 2 Tagen (48 h) fast vollständig vermischt. An Tag 6 erschien die Sphäre vollständig durchmischts, so dass keine Abgrenzung einzelner Anteile mehr möglich war (6 d). Wurden 25 grüne und 25 rote Sphären für 16 Stunden zusammen inkubiert, reduzierte sich die Anzahl der frei schwimmenden Sphären durch Konglomeration signifikant (B). Primäre und sekundäre Sphären aggregierten dabei in ähnlicher Weise (B). Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. ★★ kennzeichnet $P < 0,01$, ★ kennzeichnet $P < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangswert.

3.4.3 Klonales Wachstum von Sphären in semisoliden Medien

In semisoliden Medien wurden Einzelzellen ausplattiert, um zu untersuchen, ob aus Einzelzellen klonale Neurosphären entstehen können. Durch die Viskosität des Mediums wurde die Bewegung von Zellen und damit die Aggregation verhindert. Dabei wurden sowohl die primäre Generation als auch die sekundäre Generation von Sphären analysiert. Medium auf Basis von Agarose und Kollagen wurde eingesetzt. Eine geringe Zelldichte von 5 Zellen/ μl und die Viskosität des Mediums machte Aggregation im Zuge der Kultivierungsdauer oder durch Bewegung der Platten höchst unwahrscheinlich. Unter diesen Bedingungen entstanden Sphären, die morphologisch andersartig erschienen, als diejenigen, die in Suspension entstanden waren (**Abb. 18**).

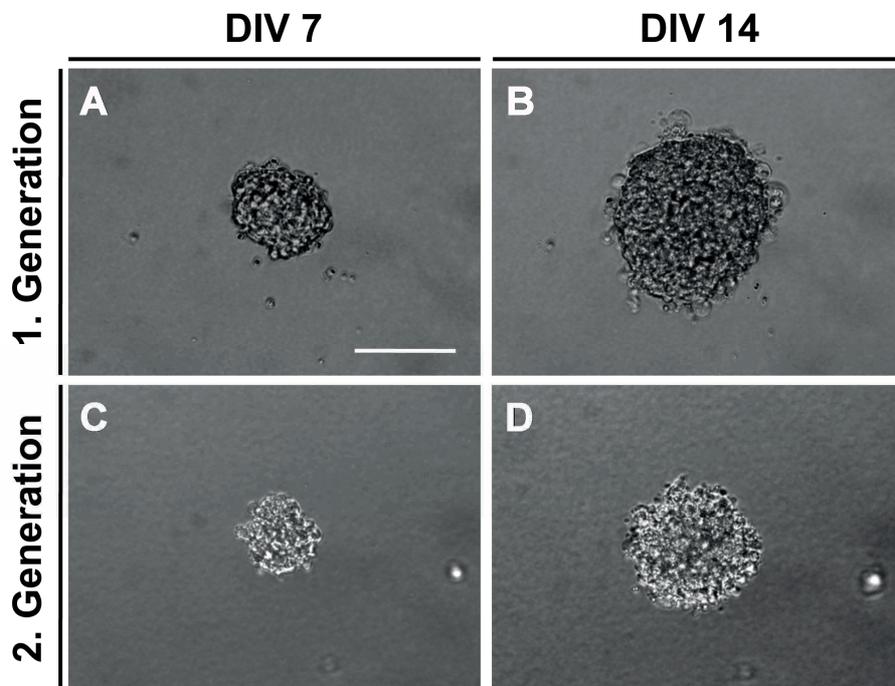


Abb. 18: Sphärenwachstum im Agarose-Assay. Im semisoliden Medium auf der Basis von Agarose entstanden aus Einzelzellen primäre (A, B) und sekundäre Sphären (C, D). Illustriert ist der Wachstumsverlauf einer primären Sphäre an Kultivierungstag (DIV) 7 (A) und 14 (B) und analog hierzu das Wachstum einer sekundären Sphäre an DIV 7 (C) und DIV 14 (D). Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Es konnte gezeigt werden, dass die Sphären des Spiralganglions klonalen Ursprungs sein können. Die Kolonien, die in Kollagen-basiertem Medium wuchsen, zeigten ein unterschiedliches Proliferationspotential.

Die größte Sphäre hatte an DIV 21 einen maximalen Durchmesser von 677 μm , die kleinste dagegen gerade einmal 81 μm ($n=3$) (**Abb. 19**).

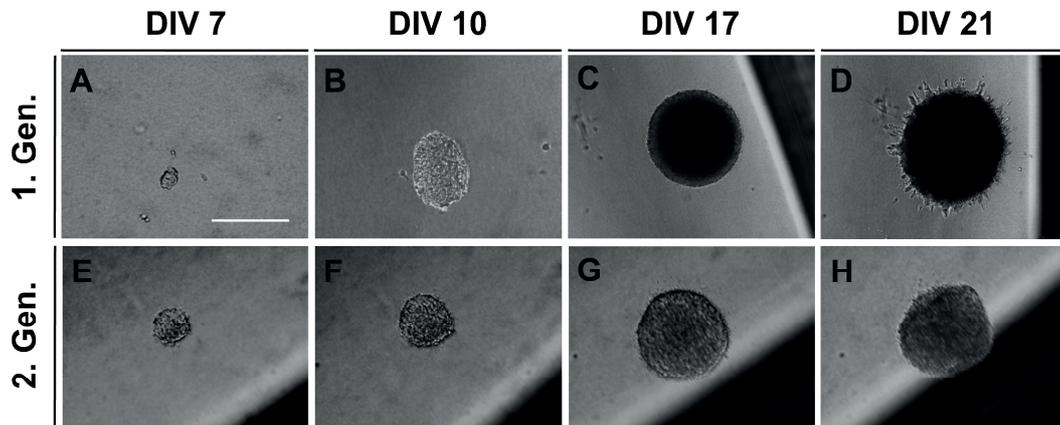


Abb. 19: Wachstumsverlauf von Sphären im NCFC-Assay. Aus Einzelzellen entwickelten sich im semisoliden Kollagen-Medium primäre Kolonien von DIV 7 bis zu DIV 21 (A-D). Nach Propagation zeigten sekundäre Kolonien ein ähnliches Verhalten und wuchsen kontinuierlich innerhalb der Kultivierungsdauer von 21 Tagen (E-H). Maßstabsbalken entspricht 400 μm in A, B, E, F und 200 μm in C, D, G, H.

3.4.4 Klonales Wachstum von Sphären aus Einzelzellen

Der zuverlässigste Test zum Nachweis von klonalem Wachstum von Sphären ist die Platzierung einer Zelle pro Well und deren Proliferation. Hierbei wurde einerseits die primäre Generation, andererseits die sekundäre Generation von Sphären beobachtet. Durch die Anwendung des Einzelzell-Assays konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Zelle des neonatalen Spiralganglions das Potential aufweist, eine Sphäre zu bilden (**Abb. 20**). Von 1000 analysierten Einzelzellen entstanden in der primären Generation 9 Sphären, in der sekundären Generation 3 Sphären. Trotz fehlender Zell-Zell-Interaktionen bleibt diese Fähigkeit in Isolation erhalten. In der primären Generation waren 7 der entstandenen Sphären als einzelnes Objekt im Well wiederzufinden. Zweimal wurde beobachtet, dass aus einer Einzelzelle eine adhärenente Sphäre mit Satellitenkolonien gewachsen war (**Abb. 20C**).

Durch die Anwendung des Einzelzell-Assays konnte bewiesen werden, dass Neurosphären des Spiralganglions klonalen Ursprungs sein können. Auffällig war, dass die Sphären, die an DIV 14 vorhanden waren, unterschiedliche Durchmesser auswiesen.

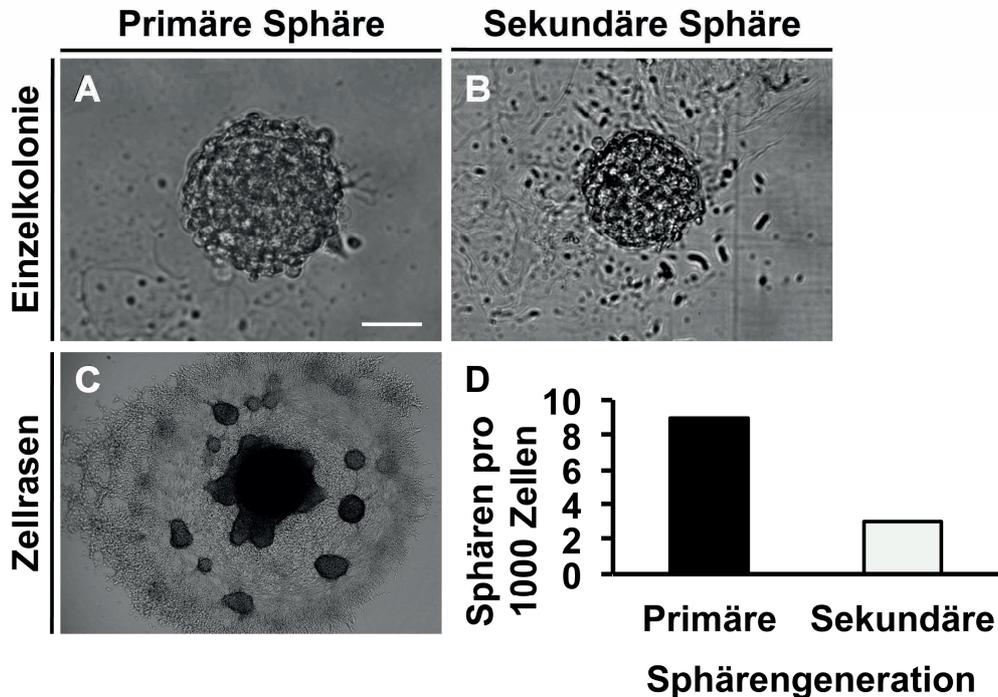


Abb. 20: Ergebnisse des Einzelzell-Assay. Nach der Aussaat von Einzelzellen waren nach 9 bzw. 14 DIV primäre (A, C) und nach 11 DIV sekundäre (B) Sphären entstanden. Primäre Sphären entstanden nach einer Kultivierungsdauer von DIV 14 mit einer Häufigkeit von 9 aus 1000 Zellen (D). Von 3 aus 1000 Zellen bildeten sich nach 14 DIV sekundäre Sphären (D). Maßstabsbalken entspricht 50 μm in A, B und 400 μm in C.

3.5 Differenzierung der Sphären des Spiralganglions

3.5.1 Morphologie differenzierter Zellen aus Sphären des Spiralganglions

Nach dem Entzug proliferationsfördernder Wachstumsfaktoren begannen Sphären sich am Boden der mit Gelatine beschichteten Kulturplatten anzuheften. Bereits nach sehr kurzer Dauer waren die Sphären adhärent und die Zellen bewegten sich aus der dreidimensionalen Struktur der Sphäre heraus in einen adhärent wachsenden Zellverband. Die beginnende Differenzierung von Neurosphären des Spiralganglions ähnelte sehr stark der von Neurosphären der Subventrikularzone (**Abb. 21**).

Erstaunlicherweise wanderten die Zellen innerhalb dieser Kolonien sehr stark und waren keineswegs statisch oder träge (**Abb. 22**).

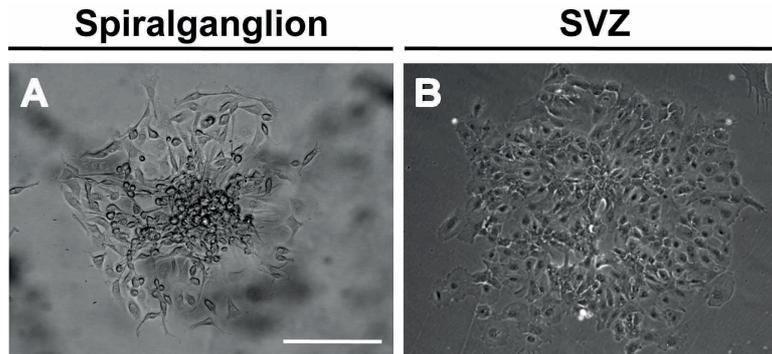


Abb. 21: Differenzierte Kulturen des Spiralganglions und der SVZ im Vergleich. In der Differenzierungskultur wuchsen Sphären zu einem Zellrasen aus (A, B). Neurosphären des Spiralganglions (A) zeigten große morphologische Ähnlichkeit zu Neurosphären der SVZ (B). Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Eine interessante Beobachtung ergab sich in einzelnen Versuchen, als es in den Kulturplatten zu einer verstärkten Reduktion des Mediums kam. Mit Verringerung des Mediums bis hin zum Verschwinden konnte beobachtet werden, dass die Sphären zu Beginn in üblicher Weise anhefteten und die sphäroide Struktur beim Auswachsen verloren ging. Doch mit schwindendem Medium zogen sich die Zellen immer weiter zusammen und bildeten schließlich erneut ein kugeliges Gebilde bis zum völligen Austrocknen der Platte, was im Tod der Zellen endete. Allem Anschein nach bot die dreidimensionale Struktur der Sphäre einen energieoptimalen Zustand, der den Schwund des Medium und die zunehmende Austrocknung zumindest zeitweise kompensieren konnte.

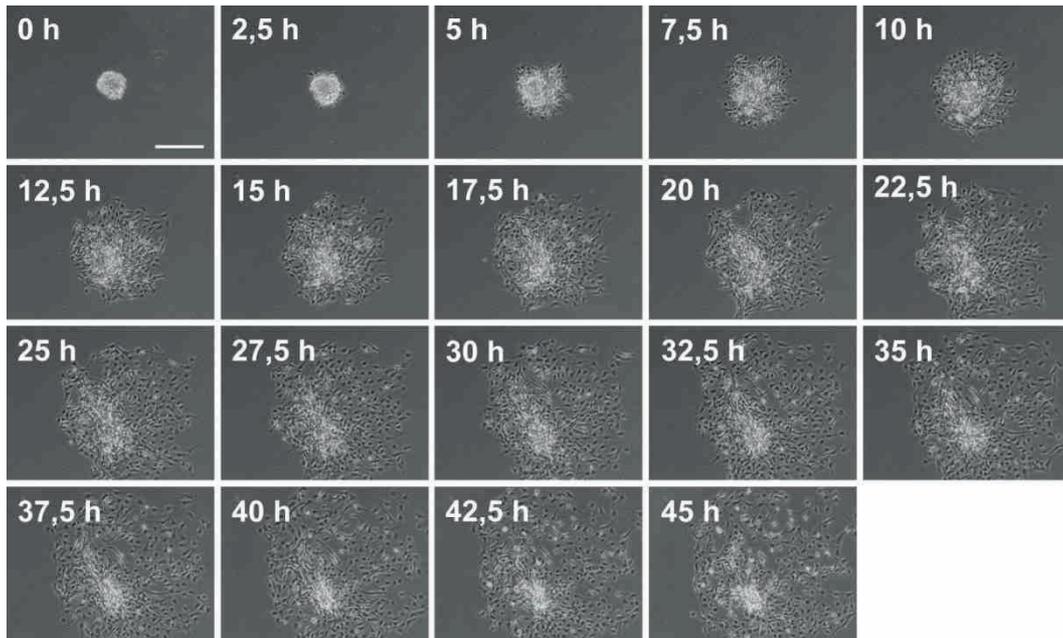


Abb. 22: Zeitraffer-Aufnahmen einer anhaftenden Sphäre. Dargestellt wird der zeitliche Verlauf einer Sphäre des Spiralganglions, die allmählich adhärenz anwuchs und zu differenzieren begann. Der Entzug von Wachstumsfaktoren zusammen mit der beschichteten Oberfläche gab der Sphäre den Anstoß zum Anheften (0 h). Bereits nach wenigen Stunden (7,5 h) war die dreidimensionale Struktur der Sphäre verloren gegangen und die Zellen wuchsen aus. Circa zwei Tage später (45 h) ließ sich die ursprüngliche Sphäre nur noch erahnen und die Differenzierung schritt weiter voran. Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

3.5.2 TUJ und MAP2 als neuronale Marker

An Gefrierschnitten der Cochlea wurde getestet, ob TUJ und MAP2 geeignete Marker für Neurone des Spiralganglions sind. Zur Darstellung der Haarzellen wurden die Schnitte zudem mit einem Antikörper gegen Myosin-VIIa angefärbt. Gut erkennbar waren die drei Reihen äußerer und die eine Reihe innerer Haarzellen. Sowohl TUJ als auch MAP2 stellten geeignete Marker für Neurone des Spiralganglions dar (**Abb. 23**). Beide neuronale Marker wurden in der nativen Umgebung des Spiralganglions exprimiert. Daher wurden diese Marker als geeignet für die Analyse der Markerexpression der *In-vitro*-Experimente angesehen, um neu entstandene neurale Zellen aus Sphären untersuchen zu können.

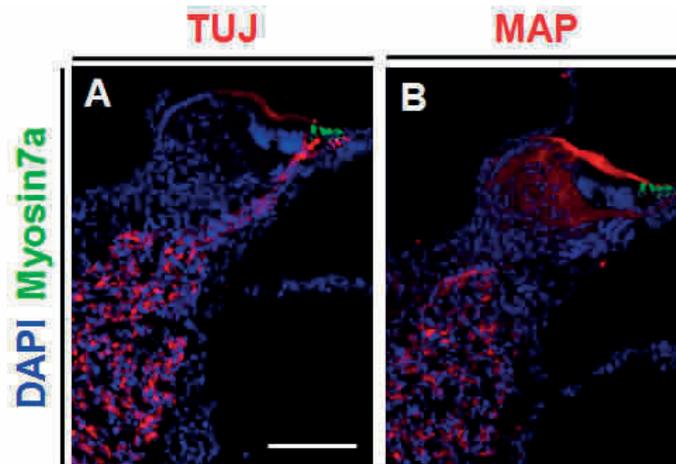


Abb. 23: Neuronale Marker im neonatalen Spiralganglion. Immunreaktivität für TUJ (A) und MAP2 (B) lässt sich in den Neuronen des neonatalen Spiralganglions nachweisen. Die Haarzellen wurden mit Myosin-VIIa markiert (A, B) und die Kerne mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

3.5.3 Differenzierung von Sphären in reife Zelltypen

Sphären, die auf Gelatine-Beschichtung ausgesät wurden, flachten ab, wuchsen aus und begannen unter Einfluss von BDNF und NT-3 zu differenzieren. Nachdem sich die Zellen zehn Tage in Kultur befanden, wurde zum Nachweis reifer Zellen mit den Antikörpern gegen Gliazellen und Neuronen gefärbt (**Abb. 24**). Gliaähnliche Zellen kamen mit einem Anteil von $13,1 \pm 4,2\%$ vor. $1,9 \pm 0,2\%$ der Zellen hatten einen neuronähnlichen Phänotyp. Es konnte beobachtet werden, dass gliaähnliche Zellen teilweise auch solitär gelegen vorkamen, während neuronähnliche Zellen stets in der Nähe oder sogar auf GFAP-exprimierenden Zellen gefunden werden konnten. Dies war ein weiterer Indikator dafür, dass es sich bei den MAP2- und TUJ-exprimierenden Zellen tatsächlich um Neurone handeln könnte, da diese *in vivo* ebenso auf den sie unterstützenden Gliazellverband angewiesen sind. Keine der analysierten Zellen zeigte eine Doppelfärbung für MAP2 bzw. TUJ und GFAP.

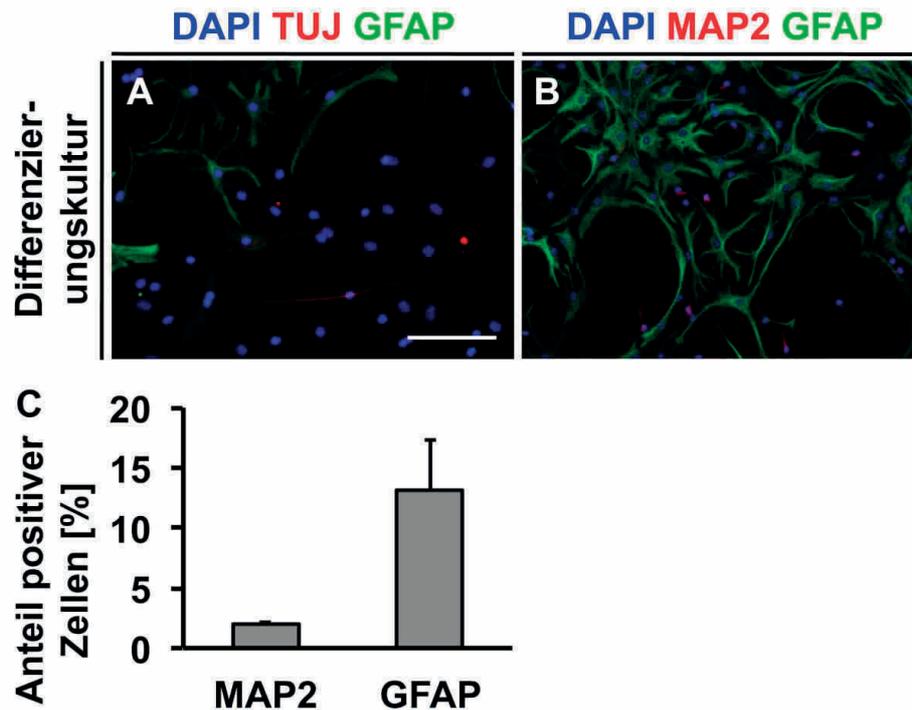


Abb. 24: Neuronale Marker in differenzierten Sphären des Spiralganglions. In den differenzierten Kulturen der Sphären des Spiralganglions konnten TUJ-positive (A) und MAP2-positive (B, C) Neuronen neben GFAP-positiven Gliazellen detektiert werden. Der Anteil der MAP2- und GFAP-positiven Zellen wurde quantifiziert (C). Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Zur weiteren Charakterisierung der gliaähnlichen Zellen wurde ein Oligodendrozyten-spezifischer Antikörper herangezogen. In den Kulturen der Spiralganglionzellen konnte dieser Antikörper nicht entdeckt werden. Um Fehler in der Methodik ausschließen zu können, wurden parallel dazu Zellen der Subventrikularzone kultiviert und gefärbt. Dabei zeigte sich ein deutlich positives MOSP-Signal innerhalb der Zellpopulation (**Abb. 25**), das spezifisch Oligodendrozyten markiert. Daraus ließ sich schließen, dass es sich bei den gliaähnlichen Zellen, die aus Spiralganglionzellen hervorgehen, vornehmlich um Schwann-Zell-ähnliche Zellen handeln musste. Bei der Aussaat von dissoziierten sekundären Sphärenzellen, eine üblichen Methode bei der Differenzierung von Sphären des Gehirns, starben die Zellen im Laufe der Kultivierungsdauer und exprimierten keinerlei Marker.

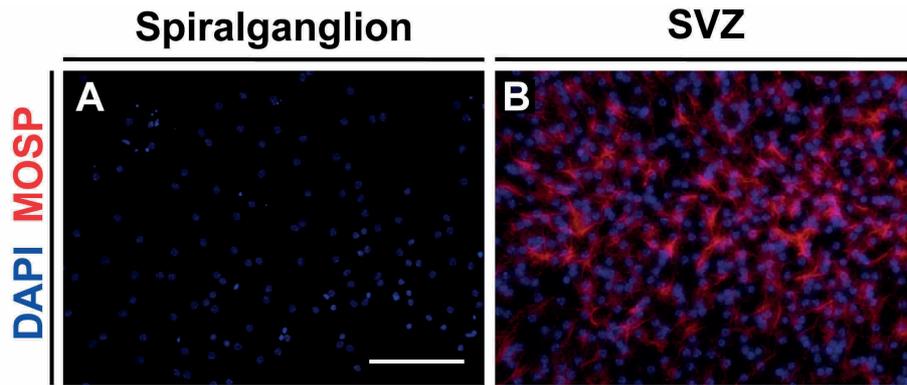


Abb. 25: MOSP-Expression in differenzierten Kulturen. Nachdem Sphären des Spiralganglions mehrere Tage in Differenzierungskultur waren, konnte kein MOSP-Signal detektiert werden (A). Bei differenzierten Zellen der SVZ konnte das Protein MOSP hingegen detektiert werden (B). Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Um der Frage nachzugehen, ob die glia- und neuronenähnlichen Zellen durch Zellteilung neu entstanden waren, wurden die Sphären während der Genese mit BrdU inkubiert. Die Färbung am Ende der Differenzierungsdauer machte deutlich, dass sowohl die GFAP-positiven gliaähnlichen Zellen als auch die MAP2-positiven neuronenähnlichen Zellen aus proliferierenden Zellen gebildet wurden (**Abb. 26**). Somit konnte bewiesen werden, dass diese vorhandenen Zellpopulationen nicht bereits zu Beginn der Kultur vorhanden waren.

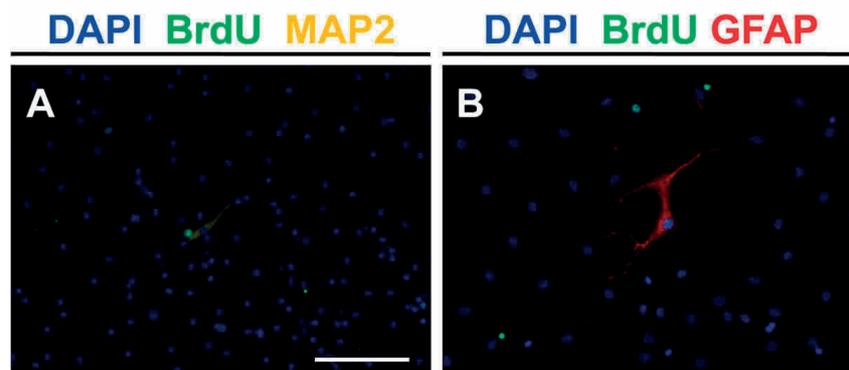


Abb. 26: Nerven- und Gliazellen entstehen aus proliferierenden Zellen. Aus mitotischen Sphärenzellen, die BrdU-Inkorporation aufwiesen (A, B), entstanden während der Differenzierung neuronenähnliche (A) und gliazellähnliche (B) Zellen. Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Differenzierungskultur brachte hervor, dass die aus Sphären des Spiralganglions hervorgegangenen Zellen morphologische Ähnlichkeiten mit Neuronen und Gliazellen hatten. Zellen mit schlankem Soma und langen, dünnen Fortsätzen ähnelten stark Neuronen mit dendritischen Ausläufern (**Abb. 27**). Diese fanden sich vorwiegend auf darunter flach ausgebreiteten Zellrasen, die den Gliazellen ähnelten. Hinweise auf Zell-Zell-Interaktionen brachten typische interneurale Verbindungsformen, wie beispielsweise dendro-dendritischer oder axo-somatischer Kontakt zwischen den Neuronen.



Abb. 27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der differenzierten Kulturen. Morphologisch ähnelten die differenzierten Kulturen des Spiralganglions sehr Neuronen (Pfeil) und Gliazellen (Pfeilspitze) (A). Als Kontakt zwischen den Nervenzellen fanden sich dendro-dendritische (B) und axo-somatische (C) Verbindungen. Maßstabsbalken entspricht 30 μm in A und C, 20 μm in B.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Isolierung von sphärenbildenden Stammzellen des neonatalen Spiralganglions. Die Neurosphären sollten näher charakterisiert werden, um deren Stammzellstatus zu testen und zu überprüfen. Schließlich wurde analysiert, ob die Selbsterneuerung durch Propagation und eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen möglich ist.

4.1 Isolierung von Stammzellen des Spiralganglions

Aus dem Innenohr neonataler Mäuse wurden Zellen des Spiralganglions gewonnen, um die sphärenbildenden Vorläufer- und Stammzellen untersuchen zu können. Durch die Anwendung eines modifizierten Neurosphären-Assays konnten die Stammzellen isoliert sowie expandiert werden, um anschließend aus dem proliferativen Stadium die Differenzierung einzuleiten. Ausgehend von der Entwicklung dieses Assays zur Isolierung adulter Stammzellen des Gehirns durch Reynolds und Weiss (1992), fand eine Übertragung dieser Methode auf eine Vielzahl anderer Zelltypen statt.

Andere Arbeitsgruppen, die auditorische Neurone erforschten (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a,b; Rask-Andersen et al. 2005; Senn et al. 2007; Rak et al. 2011; Volkenstein et al. 2013; Zhang et al. 2011), hatten diese etablierte Methode bereits zur Isolierung angewandt. Daher wurde in den vorliegenden Versuchen ebenfalls der Neurosphären-Assay verwendet, um sphärenbildende Stammzellen des Spiralganglions isolieren zu können.

Neurosphären stellen sehr heterogene, traubenähnliche zelluläre Strukturen dar, die zum einen aus Stammzellen, zum anderen aus Vorläuferzellen und reiferen Zelltypen bestehen (Reynolds & Weiss 1996; Suslov et al. 2002). Innerhalb der Sphären sind sowohl die klonogene Stammzelle selbst als auch die verschiedenen Differenzierungsstufen der klonogenen Zelle, die sich asymmetrisch geteilt hat, enthalten. Dieses Phänomen spiegelt sich in den unterschiedlichen Phänotypen der Zellen wider.

Senn et al. (2007) beschrieben, dass die Anzahl der entstandenen Sphären aus dem Spiralganglion 6 Stunden post mortem sogar höher war als aus frisch isoliertem Gewebe. Diese Erkenntnis werteten sie als eine Selektion auf Stammzellen. Sphärenbildende Stammzellen des Spiralganglions konnten auch 10 Tage post mortem noch isoliert werden (Senn et al. 2007). Die Anzahl der daraus differenzierten neuronalen und glialen Zellen war jedoch stark vermindert.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit basierten zu jedem Zeitpunkt auf frischem Material. Da männliche und weibliche Tiere gleichermaßen verwendet wurden, konnte das Geschlecht als Einflussfaktor für das biologische Verhalten der Zellen ausgeschlossen werden (Deasy et al. 2007).

4.2 Charakterisierung von Stammzellen und Sphären des Spiralganglions

4.2.1 Morphologische Analogie zu Sphären des Gehirns

Zum Vergleich der Sphären des Spiralganglions wurden die morphologischen Eigenschaften von Neurosphären der SVZ herangezogen. Morphologisch ähneln sich diese beiden Sphärenarten in hohem Maße. Dadurch lässt sich schließen, dass die Sphären des Spiralganglions aus Stammzellen ähnlich denen des Gehirns entstehen. Die runde Form der Sphären stellt ein charakteristisches Merkmal von Neurosphären des Gehirns dar, die im Neurosphären-Assay entstehen (Reynolds & Weiss 1992). Eine mögliche Erklärung dieses ähnlichen Aussehens könnte sein, dass embryonal sowohl das Gehirn als auch das Spiralganglion aus Teilen des Ektoderms hervorgehen (Bommas-Ebert et al. 2011) und daher eine Analogie der neuralen Stammzellen vorhanden sein könnte.

Der enge dreidimensionale Zell-Zell-Kontakt innerhalb der Sphären ermöglicht den Zellen eine unmittelbarere Zell-Zell-Interaktion, als es beim zweidimensionalen Auswachsen auf einem Substrat der Fall ist (Ren et al. 2009). Aus physikalischer Sicht bietet die Sphäre, ähnlich einer Kugel, die kleinste Oberfläche bei festgelegtem Volumen. Ausgehend davon stellt sich die Frage, weshalb keine Vergrößerung der Oberfläche angestrebt wird, um eine größere Angriffsfläche für versorgende Mediumkomponenten zu bieten. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Stammzelle innerhalb der Sphären dies als Maßnahme sieht, so ihre Stammzellnische in der Zellkultur aufrecht zu erhalten (Vik-Mo et al. 2011). Progenitorzellen können bei Wiederbesetzung der Stammzellnische zurück in den ursprünglichen Stammzellstatus gelangen (Davies & Fuller 2008). Allerdings ist es neuronalen Progenitorzellen *in vitro* nicht möglich, sich in neurale Stammzellen umzuwandeln (Doetsch et al. 2002; Louis et al. 2008). Die Perfusion der Wachstumsfaktoren zusammen mit den Zell-Zell-Interaktionen innerhalb der Sphäre scheinen den Stamm- und Vorläuferzellen ein Milieu zu schaffen, das bessere Proliferation ermöglicht.

Möglicherweise kommunizieren die Zellen in dieser kugelförmigen Anordnung effektiver miteinander. Diese Hypothese unterstreicht die Beobachtung in eigenen Experimenten, dass schwindendes Medium unter Differenzierungsbedingungen zu einer Reorganisation von bereits ausgewanderten Zellen zu einer sphäroiden Struktur führte.

4.2.2 Aufbau und ultrastrukturelle Morphologie der Sphärenzellen

Um nähere Informationen über die Zellen innerhalb der Sphären zu gewinnen, wurden der Aufbau und die Zusammensetzung der Sphären näher untersucht. Aktin-reiche Filopodien als Teil des Zytoskeletts der Zelle sind sehr bewegliche Ausstülpungen der Zelle. Durch Hin- und Herschweifen der Filopodien scheint die Zelle auf diese Weise vorteilhafte Bereiche für sich zu suchen (Dalby et al. 2004). Da innerhalb der Zellsuspension nur einzelne Zellen Filopodien aufwiesen, schien die Mikroumgebung für den übrigen Teil der Zellen geeignet zu sein. Das wiederum kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass die gewählten Kulturbedingungen für den überwiegenden Teil der Zellen ein zufriedenstellendes Niveau aufwiesen. Es lässt sich lediglich darüber spekulieren, über welchen Status Zellen verfügen, die nun Filopodien ausbilden. Wachs et al. (2003) äußerten die Vermutung, dass Zellen, die durch Trypsinierung und mechanische Dissoziation in Mitleidenschaft gezogen wurden, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren verloren haben und durch das Ausbilden von Filopodien versuchen könnten, ihre Ernährungssituation zu optimieren. Andererseits könnten es ebenfalls Stamm- oder Vorläuferzellen sein, die sich häufig mit anderen Zellen vergesellschaften, um schneller die Kugelform der Sphären generieren zu können und die präferierte Form der flotierenden Sphäre zu erreichen. Aus der Hirnforschung mit Neurosphären konnte über Zeitrafferaufnahmen bestätigt werden, dass Filopodien die Adhäsion einzelner Zellen sowie ganzer Sphären vermitteln (Mori et al. 2007; Ladiwala et al. 2012). Generell wiesen die Zellen innerhalb der Sphären bei ultrastruktureller Analyse keine offensichtliche Organisation auf. Bei Neurosphären des Gehirns zeigten sich Apoptosen vermehrt im Inneren der Sphäre und Mitosen dagegen in größerem Ausmaß in den äußeren Bereichen (Bez et al. 2003). Vermutlich ist die Größe das Kriterium für die verringerte Diffusion und Versorgung im Inneren der Sphäre (Bez et al. 2003). Da Sphären des Spiralganglions diese Größe nicht erreichten, trat keine Mangelernährung auf, sodass diese Organisation nicht sichtbar wurde.

Die Verteilung von Mitosen und Apoptosen war daher gleichmäßig. Andererseits könnte dieser nicht messbare Mangel dennoch auf einen Gradienten hindeuten, der sich von außen nach innen aufbaut. Dadurch könnten die Zellen größerer, das heißt älterer Sphären, im Inneren schlechter versorgt sein als kleinere Sphären.

Innerhalb der Sphäre waren die Zellen nicht vollständig, sondern nur punktuell über Adherens Junctions miteinander verbunden. Diese Art der Verbindung könnte eine bedeutende Rolle in der Aggregation der Zellen in der Sphäre und in der Migration aus dieser heraus spielen (Lobo et al. 2003). Die Adherens Junctions vermitteln die „Stammzell-Kondensation“, die Gruppierung der Zellen in die Sphärenform, wobei Einzelzellen sich miteinander verbinden und aneinander anlagern (Lobo et al. 2003). Da auch in den Präparaten der Spiralganglion-sphären ausschließlich Adherens Junctions gefunden werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die Verdichtung der Zellen im Rahmen der Sphärenbildung durch diese bewerkstelligt wird. Zwischen den einzelnen Zellen konnten wie bei Neurosphären des Gehirns von Ratten (Lobo et al. 2003) große interzelluläre Abstände entdeckt werden. Obwohl in der Literatur bei Neurosphären aus Ratten- und Menschengewebe zwischen elektronendichten und -transparenten Zellen differenziert werden kann (Lobo et al. 2003; Vik-Mo et al. 2011), konnten diese in den zugrunde liegenden Versuchen nicht unterschieden werden. Dies wurde bereits als eine Besonderheit von Mauszellen gewertet (Gil-Perotin et al. 2013). Elektronendichte und -transparente Zellen der Sphären ließen sich einerseits hinsichtlich Zellaufbau und Ausstattung mit Organellen unterscheiden (Lobo et al. 2003; Vik-Mo et al. 2011). Berglund et al. (1986) fanden heraus, dass Typ II-Neurone des Spiralganglions mehr Neurofilamente enthielten als Typ I-Neurone. Elektronendichte Zellen enthielten vereinzelte Filamente, weniger als elektronentransparente Zellen (Lobo et al. 2003). Solche Charakteristika, die bei Zellen von Mäusen nicht identifizierbar scheinen (Gil-Perotin et al. 2013), hätten Hinweise auf unterschiedliche Vorstufen von Zelltypen geben können, die man bereits morphologisch unterscheiden hätte können.

4.2.3 Proliferationsaktivität der Sphärenzellen

Über die ultrastrukturelle Analyse sollte herausgefunden werden, ob verschiedene Organellen auf bestimmte Zelltypen hinweisen können. Die auffallend spiralförmig gefüllten Vakuolen, die sich teilweise in Zellen fanden, könnten membranöser Inhalt als Zeichen der Autophagie sein und somit als Anhaltspunkt für die Vitalität der Zellen dienen (Gil-Perotin et al. 2013). Da einzelne Zellorganellen zur Energierückgewinnung autophagiert werden, könnte das ein Hinweis auf die endogene Aktivität innerhalb der Sphären sein. Diese Erscheinungen innerhalb der Vakuolen könnten degenerierte Mitochondrien darstellen (Hua et al. 2007). Vor allem reaktive Sauerstoffradikale führen zu erheblichem Schaden im Mitochondrium (Reddy & Beal 2005), wodurch der Organelltod herbeigeführt worden sein könnte. Eine offensichtliche Verteilung der betroffenen Zellen innerhalb der Sphären konnte nicht beobachtet werden. Sowohl im Inneren der Sphäre als auch in den äußeren Bereichen waren diese Erscheinungen vorzufinden. Es lässt sich vermuten, dass die Kulturbedingungen ausschlaggebend für diese Veränderungen sein könnten. Beim intrinsischen Weg der Apoptose könnten die geschädigten Mitochondrien Auslöser des Zelltods sein. Einzelne degenerierte Mitochondrien könnten hingegen im Rahmen des physiologischen Verbrauchs anfallen und keinerlei pathologische Veränderungen bedeuten.

Die große Menge an Ribosomen ließ erkennen, dass die Zellen innerhalb der Sphäre aktiv Proteine zu synthetisieren schienen. Dicht beieinander liegende Organellen des rauen endoplasmatischen Retikulums könnten dabei auf die Nissl-Substanz neuronaler Zelllinien hinweisen. Somit könnte diese Tatsache Anhaltspunkte für eine beginnende Reifung von Progenitorzellen innerhalb der Sphäre geben. Im Umkehrschluss könnte man diese Zellen sicher als Stammzellen ausschließen.

Die ultrastrukturelle Analyse der Zellen innerhalb der Sphären des Spiralganglions gab Hinweise darauf, dass eine endogene Aktivität der Zellen vorlag. Dies wäre ein möglicher Beweis dafür, dass es sich um proliferative Zellen handelt und somit um echte Sphären und nicht um ein willkürliches Aneinanderlagern mitotisch inaktiver Zellen. Bedacht werden muss weiterhin, dass die *In-vitro*-Kulturbedingungen Adaptationen hervorrufen könnten, die sich in den Zellorganellen niederschlagen und damit ein nicht physiologisches Abbild schaffen würden.

4.2.4 Wirkung von Wachstumsfaktoren auf sphärenbildende Stammzellen

Es sollte untersucht werden, welche Wachstumsfaktoren die isolierten Zellen des Spiralganglions zur Proliferation bewegen können. Um die im Neurosphären-Assay zugegebenen Wachstumsfaktoren zu testen, wurden die Faktoren bFGF, EGF, IGF-1 und Heparansulfat einzeln oder in verschiedenen Kombinationen miteinander getestet. bFGF stellte sich im Neurosphären-Assay bei Zellen des Spiralganglions als potentester Proliferationsfaktor heraus. Obwohl HS bekannt dafür ist, die Bindungsaffinität des bFGF zum Rezeptor und damit die Proliferation zu erhöhen (Brickman et al. 1995; Ornitz & Leder 1992; Roghani et al. 1994), zeigte dieser Effekt keinen signifikanten Unterschied zum Ansatz ohne HS. EGF, bFGF und IGF-1 hatten bei neuronalen Stammzellen des Gehirns eine additive Wirkung auf die Proliferation (Arsenijevic et al. 2001; Tropepe et al. 1999), die bei den Zellen des Spiralganglions ebenfalls nicht beobachtet wurde. EGF und IGF-1 zeigten in den Versuchen mit Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions einen geringen stimulierenden Effekt auf die Sphärenbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. bFGF, bFGF mit HS und bFGF mit IGF-1 brachten signifikant weniger Sphären hervor als die Kombination aller drei Wachstumsfaktoren in Verbindung mit HS. Alle übrigen Bedingungen mit bFGF, unabhängig davon, ob HS zugegeben wurde oder nicht, offenbarten keinen signifikanten Unterschied zur Kombination aller Wachstumsfaktoren mit dem Proteoglycan.

Mit der glykolytierten Form von Cystatin C wurde ein Co-Faktor entdeckt, der auto- oder parakrin von Stammzellen sezerniert wird (Taupin et al. 2000). Dieser Co-Faktor soll für die Mitoseaktivität von bFGF verantwortlich sein (Taupin et al. 2000) und hätte auch bei den Zellen des Spiralganglions gewirkt haben können. In Kulturen von adulten Rückenmarkszellen hat ebenfalls ausschließlich bFGF ohne die Zugabe von EGF eine positive Wirkung auf die Generierung neuraler Stammzellen (Shihabuddin et al. 1997). Es bleibt die Frage bestehen, warum die Zellen des Spiralganglions nicht wie die neuronalen Stammzellen des Gehirns auf die Faktoren EGF und IGF-1 ansprechen. Möglicherweise gibt es hier Ähnlichkeiten zur Embryonalentwicklung des Telencephalons. Dabei wurde vermutet, dass Zellen, die auf FGF ansprechen, unbekannte Faktoren sezernieren, die dann eine weitere Zellpopulation herausbilden, wobei diese wiederum auf ein EGF-Signal reagiert (Tropepe et al. 1999). Hierbei waren Sphären auffallend, die hauptsächlich den EGF-Rezeptor oder überwiegend den FGF-Rezeptor aufwiesen (Tropepe et al. 1999).

Übertragen könnte dies bedeuten, dass sich die neonatalen Zellen des Spiralganglions in einer Art unreifem Stadium befinden und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren nicht exprimiert werden. Damit wäre die Reaktionslosigkeit auf die Wachstumsfaktoren zu erklären. Weshalb HS die Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions nicht beeinflusst bleibt fraglich. Über die Bindung des bFGF an den FGF-Rezeptor-I kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors durch die Rezeptor-Tyrosinkinase (Heldin 1995). Die anschließende Phosphorylierung führt zur Aktivierung des MAP-Kinase- und des PLC γ -Signalwegs (Bazan et al. 2004). Bekannte Wirkungen des bFGF sind, wie hier ebenso bestätigt wurde, die Proliferation und Beibehaltung eines undifferenzierten Phänotyps (Kalyani et al. 1997). Der Stammzellstatus bleibt dem Anschein nach über die Applikation von Wachstumsfaktoren erhalten (Doetsch et al. 2002). Auch im Tiermodell erwies sich bFGF als proliferationssteigernd und damit neurogenetisch (Wagner et al. 1999). Dies könnte eine wichtige Eigenschaft zum Schutz vor Nervenschädigung darstellen (Wagner et al. 1999). Eine leichte Tendenz ließ erkennen, dass die Verwendung von bFGF, EGF, IGF-1 und Heparansulfat in Kombination miteinander die Proliferation steigert. Diese Tatsache und die Vergleichbarkeit mit anderen Studien führten zur Entscheidung, jene Zusammenstellung den Versuchen als Standard zugrunde zu legen.

Oshima et al. (2007a) stellten unter diesen Bedingungen fest, dass an DIV 7 Sphären entstanden waren, die eine Größe von annähernd 100 μm aufwiesen. In den hier dargestellten Versuchen lag der Durchschnittswert der primären Sphären bei 108 μm , was gut mit diesen Befunden übereinstimmt. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass Sphären kontinuierlich vom ersten Kulturtag an proliferierten, an Größe, Volumen und Zellen dazugewonnen haben und anhaltend wuchsen. Dieses Verhalten ließ sich auch nach Propagation in der sekundären und tertiären Sphärengeneration beobachten.

4.2.5 Selbsterneuerung von Stammzellen

4.2.5.1 Propagation von Sphären

Um zu beweisen, dass es sich bei den entstandenen flotierenden dreidimensionalen Zellkugeln tatsächlich um Sphären handelt, mussten sie der Selbsterneuerung unterliegen, das heißt propagierbar sein.

Das Ersetzen von Trypsin zur Propagation durch einen Enzym-Mix wie Accutase, der mit dem hier verwendeten Accumax vergleichbar ist, erzielt bei der Sphärenbildung eine höhere Überlebensfähigkeit sowie eine schnelle Revitalisierung nach der Dissoziation der Zellen (Wachs et al. 2003). Zu Beginn des Neurosphären-Assays sind mehrere Sphären vorhanden, die ebenfalls aus Vorläuferzellen hervorgegangen sein könnten. Erst im Laufe mehrerer Passagen erfolgt die Selektion auf Neurosphären, die aus Stammzellen hervorgehen (Louis et al. 2008). Da hohle Sphären nicht über die dritte Passage hinweg propagierbar sind (Oshima et al. 2007a; Senn et al. 2007), fehlt ihnen die Eigenschaft zur Selbsterneuerung. Hohle Sphären wurden daher nicht näher charakterisiert oder für die vorliegenden Versuche benutzt. Somit lässt sich schlussfolgern, dass nur bei soliden Sphären von echten Sphären gesprochen werden kann. Circa 98% der Sphären des Spiralganglions sind solide (Oshima et al. 2007a), hohle Sphären stellen daher einen vernachlässigbaren Anteil dar.

Standardmäßig werden Neurosphären des Gehirns nach spätestens 7 DIV passagiert, da sich über diesen Zeitpunkt hinaus die metabolische Aktivität und die Proliferation reduziert (Xiong et al. 2011). Bei den Sphären des Spiralganglions konnte in eigenen Experimenten beobachtet werden, dass Sphären über 7 DIV hinweg vereinzelt sehr dichte, kleine Zellen enthielten, die sehr wahrscheinlich auf apoptotische Zellen hinwiesen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Sphären des Spiralganglions nach spätestens 7 DIV propagiert. Bei Sphären des Spiralganglions ist die Propagation bis hin zur 6. beziehungsweise 7. Generation in der Literatur bereits beschrieben (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a). Durch die Propagation erfolgt eine starke Selektion innerhalb der Zellpopulation, da nach Dissoziation der Neurosphären eine Vielzahl der ausgesäten Zellen stirbt (Reynolds & Rietze 2005). Beim Propagieren der Neurosphären des Spiralganglions stellte sich in eigenen Versuchen heraus, dass zu starke Trituration die Sphärenbildung und Proliferation stark hemmt. Zellen schienen dabei stark in Mitleidenschaft gezogen zu werden bis hin zum Zelltod. Aus diesem Grund raten Oshima et al. (2009) dazu, keine vollständige Dissoziation der Sphären durchzuführen, sondern einzelne kleine Zellklümpchen in Kauf zu nehmen. Es gibt zudem die Forderung, häufiger als zwei- oder dreimal passagierete Neurosphären in Versuchen einzusetzen, um das Kriterium der Selbsterneuerung zu gewährleisten (Louis et al. 2008; Reynolds & Rietze 2005; Reynolds & Weiss 1992).

Da Sphären innerhalb des Neurosphären-Assays ebenfalls aus Vorläuferzellen hervorgegangen sein könnten (Louis et al. 2008), wäre es falsch, anhand der Frequenz der Sphärenbildung auf die Anzahl der Stammzellen zu schließen (Reynolds & Rietze 2005). Darüber hinaus existieren Untersuchungen, im Rahmen derer festgestellt wurde, dass sich durch wiederholtes Passagieren die Eigenschaften der Zellen verändern. Epigenetische oder genetische Instabilität sowie vermindertes Differenzierungspotential scheinen als Konsequenz der Langzeitkultur von Sphären aufzutreten (Morshead et al. 2002; Vukicevic et al. 2010). Diese Erkenntnis unterstreicht die Forderung nach Verwendung kurzzeitig kultivierter Neurosphären, um mögliche Änderungen der Eigenschaften zu verhindern (Morshead et al. 2002; Vukicevic et al. 2010).

In den dargestellten Experimenten konnte die Propagation der Sphären des Spiralganglions demonstriert werden, die auf die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als wichtige Eigenschaft von Stammzellen hindeutet. Anschließend sollte beurteilt werden, wie hoch die mitotische Aktivität der Zellen innerhalb der Sphäre ist und welche Zellen den Stamm- und Progenitorzellmarker Nestin exprimierten.

4.2.5.2 Markerexpression von Stammzellen

Da sich Stammzellen nicht über zuverlässige, eindeutige Zellmarker identifizieren lassen, bedient man sich anderer Marker, die mit den Eigenschaften von Stammzellen direkt assoziiert erscheinen. Daher wurden in den vorliegenden Versuchen BrdU, Ki-67 und Nestin zur genaueren Charakterisierung der Sphären gewählt. Verschiedene Arbeitsgruppen hatten bereits zu einem früheren Zeitpunkt BrdU und Nestin bei Untersuchungen von Sphären des Spiralganglions verwendet (Oshima et al. 2007a; Rask-Andersen et al. 2005; Zhang et al. 2011), jedoch lediglich um zu zeigen, dass diese Marker exprimiert wurden. In den hier vorgestellten Versuchen sollte der Anteil der positiven Zellen quantifiziert und im Verlauf der Propagation beobachtet und quantifiziert werden. Um die Proliferationsrate innerhalb der Sphären zu bewerten, wurde ein BrdU-Assay angewendet, der als Indikator diente, welche Zellen DNA im Zuge der Mitose neu synthetisiert hatten. In der ersten Generation hatten circa dreiviertel aller Sphärenzellen BrdU inkorporiert, das heißt die Teilung durchlaufen. In den folgenden Generationen nahm dieser Anteil kontinuierlich ab. Als zu dissoziierten Zellen des Corti-Organs an DIV 1 für 24 Stunden BrdU hinzugefügt wurde, inkorporierten circa 30% der Zellen BrdU (Malgrange et al. 2002).

In diesem Fall war nur ein Teil der Zellen proliferativ, der übrige Teil sistierte. Bei den Zellen des Spiralganglions wurde über 72 Stunden hinweg BrdU hinzugefügt und auch hierbei blieb ein Teil der Zellen mitotisch inaktiv.

Da Ki-67 keine ruhenden Zellen, solche, die sich in der G₀-Phase befinden, detektiert, war der Anteil der Ki-67-positiven Zellen innerhalb der Sphäre im Vergleich zu BrdU geringer. Mit steigender Anzahl der Passagierdurchgänge kam es zu einer Reduktion des Anteils der Ki-67-positiven, aktiv proliferierenden Zellen. Durch die Fähigkeit der asymmetrischen Teilung neuraler Stammzellen (Morshead et al. 1998) bleibt das mitotische Potential erhalten. Zwar scheinen sich Stammzellen generell langsamer zu teilen als die übrigen Zellen, diese Teilungsrate ist jedoch keine obligatorische Eigenschaft (Morrison et al. 1997). Einerseits zeigten die BrdU- und Ki-67-Färbungen, dass die Zellen innerhalb der Sphären nach Propagation weiterhin proliferierten, was eine wesentliche Eigenschaft von Stammzellen darstellt, andererseits nahm der Anteil proliferierender Zellen ab.

Nestin als Protein des Intermediärfilaments des Zytoskeletts wird sowohl von Stammzellen als auch von Vorläuferzellen exprimiert (Lendahl et al. 1990) und wurde daher zur Markierung dieser Zellen benutzt. Da in den vorliegenden Versuchen die Anzahl der Nestin-positiven Zellen mit steigender Generation abnahm, lässt sich mutmaßen, dass der Anteil der Stamm- und Vorläuferzellen sinkt. Dieses Erkenntnis liefert eine Erklärung dafür, dass Sphären des Spiralganglions lediglich bis zur 6. (Di Santo et al. 2013) oder 7. Passage (Oshima et al. 2007a) überlebensfähig sind. Gründe hierfür könnten in der enzymatischen Dissoziation im Zuge der Propagation liegen, die die Zellen zunehmend schädigt (Engstrom et al. 2002). Andererseits war es Oshima et al. (2007a) nicht möglich, Sphären aus den Spiralganglien junger Mäuse zu gewinnen, die 42 Tage alt waren. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions nur in den ersten Lebenstagen vorhanden sind, eine begrenzte Vitalität haben oder differenzieren. Daher könnte dies bei Säugetieren einen wesentlichen Faktor im Unvermögen zur Regeneration im Innenohr *in vivo* darstellen. Zellen mit Eigenschaften von Stammzellen in Kulturen adulter humaner Hörnerven könnten übriggebliebene Stammzellen darstellen, die aber weniger proliferieren (Martinez-Monedero & Edge 2007). Die oben genannten Ergebnisse stehen im Konsens mit kultivierten Sphären des Cochlea-Epithels.

Dabei konnte kürzlich beobachtet werden, dass auch nach Propagation die Eigenschaften als Stamm- und Vorläuferzellen beibehalten werden, wenn auch in abnehmender Weise (Lou et al. 2013). Obwohl Sphären des Spiralganglions lichtmikroskopisch in der primären, sekundären und tertiären Generation morphologisch identisch erschienen, zeigten die Zellen dennoch erhebliche Unterschiede im Expressionsmuster. Primäre Sphären proliferierten stärker und exprimierten quantitativ mehr Nestin. Eine Vielzahl der Sphären in primärer Kultur stammt nicht von Stammzellen ab (Reynolds & Rietze 2005). Da durch die Propagation eine Selektion auf Stammzellen stattfindet, könnte die Abnahme der Nestin-Expression auf eine zunehmende Differenzierung der Progenitorzellen hindeuten. Vorläuferzellen könnten dabei zwar noch zur Sphärenbildung fähig sein, aber weniger proliferieren aufgrund ihres weiteren Entwicklungsstadiums.

4.2.6 Klonalität in verschiedenen Assays

Ein wesentlicher Kritikpunkt des Neurosphären-Assays stellt der unzureichende klonale Ursprung der Neurosphären dar (Coles-Takabe et al. 2008; Jessberger et al. 2007; Singec et al. 2006). Durch die relativ hohe Zelldichte findet vermehrt Aggregation statt. Daher schlagen Autoren, wie beispielsweise Kukekov et al. (1999) den Gebrauch der Nomenklatur „Kolonien“ anstelle von Neurosphären vor, da Sphären definitionsgemäß aus einer Einzelzelle hervorgegangen sein sollten. Neurosphären sind sehr motile Strukturen, die selbst bei niedrigen Zelldichten passive Lokomotion zeigen (Coles-Takabe et al. 2008). Die Betrachtung der Kulturen durch den Experimentator und die damit verbundene Bewegung der Zellen verstärken diese Fusion (Coles-Takabe et al. 2008). Mittels Zeitraffermikroskopie konnte gezeigt werden, dass bei Neurosphären aus Hirnstammzellen eine Zeitspanne von wenigen Sekunden und der Abstand weniger Mikrometer eine irreversible Adhäsion bewirken (Ladiwala et al. 2012). Bei Sphären des Spiralganglions wurde ebenfalls beobachtet, dass sie durch amöboide Fortbewegung äußerst motil erschienen (Rask-Andersen et al. 2005). Dies gibt bereits erste Hinweise auf die Tendenz zur Aggregation. Ungeachtet dessen, ob einzelne Zellen oder Sphären miteinander aggregierten, waren häufig Filopodien auf der Oberfläche für diese Fusion verantwortlich (Ladiwala et al. 2012). Die Fusion schien dabei losgelöst von der Zelldichte, der Verwendung primärer oder passagierter Sphären oder anderer Kulturbedingungen zu sein (Pastrana et al. 2011).

Andere Studien zeigten, dass bei steigender Zelldichte und der daraus resultierenden höheren Sezernierung von Faktoren durch Zellen die Proliferation gesteigert wird (Tropepe et al. 1999). Eine hohe Zelldichte scheint die Proliferation durch Nutzung dieser Effekte zu fördern, besser als wenige, stark verstreute Zellen. Bei Stammzellen des Gehirns konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl hohe Zelldichten, die Bewegung der Platten und die Verwendung sekundärer statt primärer Sphären die Entstehung chimärer Sphären begünstigt (Mori et al. 2006; Coles-Takabe et al. 2008). Bereits nach 24 Stunden zeigte sich eine erste Aggregation (Jessberger et al. 2007). In den zugrunde liegenden Versuchen mit Sphären des Spiralganglions konnte gezeigt werden, dass selbst eine sehr geringe Zelldichte von 0,5 Zellen/ μ l die Aggregation der Sphären nicht vollständig verhindert. Bei geringen Zelldichten war der Anteil der chimären Sphären im Vergleich zu höheren Zelldichten dennoch geringer. Zudem konnte ein Unterschied zwischen den Generationen festgestellt werden. Primäre Sphären neigten deutlich seltener zu Fusion als sekundäre Sphären. Auch die Kultivierungsdauer stellte sich als wesentlicher Parameter der Aggregation heraus. Bei geringen Zelldichten zeigte sich in der primären Generation eine höhere Anzahl an klonalen Sphären an DIV 3 als an DIV 7. Selbst nachdem Sphären lediglich über Nacht in einer Kulturschale zusammen kultiviert wurden, zeigte sich eine beachtliche Konglomeration. Die exakte Festlegung einer klonalen Zelldichte, das heißt einer Zelldichte, die keinerlei chimäre Sphären hervorbringt, ist somit von vielerlei Faktoren abhängig und äußerst schwierig. Vergleicht man die hier erzielten Ergebnisse mit Untersuchungen der Klonalität bei Neurosphären des Gehirns (Coles-Takabe et al. 2008; Chaddah et al. 2012) ist auffallend, dass die Sphären des Spiralganglions scheinbar häufiger zur Chimärenbildung neigen. Allerdings muss bedacht werden, dass teilweise keine exakten Kriterien in der Beschreibung der Versuche genannt wurden, ab welcher Größe Kolonien als Sphären gezählt wurden und ab wann eine Sphäre als chimär galt (Chaddah et al. 2012). In den zugrunde liegenden Versuchen wurde sowohl die Größe der Sphären mit 40 μ m festgelegt als auch das Kriterium für Chimärismus genau definiert. Eine Sphäre galt als nicht klonal, das heißt chimär, sobald eine einzige Zelle darin oder daran in abweichender Form fluoreszierte als der übrige Teil der Sphärenzellen. Diese strikte Festlegung brachte mit sich, dass eine sonst klonal entstandene Sphäre, die ausschließlich ein einziges Fluorophor exprimierte, durch Anlagern einer anders fluoreszierenden Zelle zu einer Chimäre wurde.

Doch selbst die unterschiedliche Kennzeichnung zweier Marker könnte die Häufigkeit der Konglomeration noch unterschätzen, da sowohl ausschließlich GFP-positive Sphären einzelne GFP-Zellen beinhalten könnten als auch DsRed-Sphären angeheftete DsRed-Zellen (Singec et al. 2006).

Mori et al. (2006) zeigten, dass bis zu 36 Stunden nach Kultivierungsstart einer Einzelzellsuspension fast ausschließlich Einzelzellen entweder mit anderen Einzelzellen oder mit Aggregaten fusionierten. Danach kam es vermehrt zur Aggregation ganzer Zellkolonien. Ein Modell der Neurosphärenentstehung besagt, dass sich zwar einzelne Zellen teilen und klonal wachsen, aber über Zell-Zell-Interaktionen während der Aggregation Signale freigesetzt werden, die wiederum zur Mitose anregen (Mori et al. 2006). Somit scheint die Neurosphäre sowohl durch Teilung selbst als auch durch die freigesetzten Signale nach Konglomeration zum Wachstum angeregt zu werden (Mori et al. 2006). Natürlich wäre eine geringe Zelldichte für die Entstehung klonaler Sphären notwendig, wenn auch weitaus weniger effektiv.

Die Aussaat niedriger Zelldichten in semisoliden Medien bietet eine gute Möglichkeit, um eine geringe Anzahl von Sphären zu erhalten. Hierbei kann nie völlig sichergestellt werden, dass die entstandenen Sphären vollständig klonalen Ursprungs sind. Zellen könnten direkt nebeneinander zum Liegen kommen und allmählich fusionieren. Durch die Aussaat von Einzelzellen zu Beginn, die geringe Zelldichte sowie die Unterbindung von Zellmigration innerhalb des semisoliden Mediums wird die Aggregation jedoch relativ unwahrscheinlich und die Sphären werden überwiegend klonalen Ursprungs sein (Kukekov et al. 1999; Louis et al. 2008). Weiterhin stellt die Propagation der Sphären im semisoliden Medium eine Herausforderung für den Experimentator dar. Im kollagenhaltigen Medium entstandene Kolonien werden über feine Scheren herausgeschnitten, enzymatisch gelöst und über die mechanische Trituration vereinzelt. Die Größe der Kolonien, die meist nur mikroskopisch erkennbar sind, die Art der Instrumente und die Feinmotorik des Ausführenden tragen wesentlich zum Erfolg dieser Methode bei. Diese Methode bietet den Vorteil, die Anzahl der Stammzellen ermitteln zu können (Louis et al. 2008). Der Kollagen-basierte Assay erlaubt es, anhand der Größe von Neurosphären, Rückschlüsse auf den Ursprung der Sphären zu ziehen. Für neurale Stammzellen des Gehirns konnte eine Mindestgröße der Sphären festgelegt werden, die sich anhand von mindestens sieben Passagierdurchläufen und dem Differenzierungspotential als verlässliches Kriterium herausgestellt hatte (Louis et al. 2008).

Sehr große Kolonien stammten dabei von Stammzellen ab, kleinere Kolonien gingen auf Progenitorzellen zurück. Da die Vorläuferzellen über ein limitiertes Proliferationspotential verfügten, erreichten sie nicht die Größe von Sphären, die aus Stammzellen entstanden (Louis et al. 2008). Für die Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions ist es notwendig, diese Merkmale in zukünftigen Studien noch genau zu definieren. Die Größenunterschiede der entstandenen Sphären geben erste Hinweise darauf, dass das hohe Proliferationspotential als Eigenschaft von Stammzellen gewertet werden könnte. Dabei muss bedacht werden, dass die Größe der Sphären nicht allein vom Potential der Zelle selbst abhängig ist, sondern auch eine Reaktionsfähigkeit auf Wachstumsfaktoren darstellen könnte. Zudem könnten Stammzellen weniger teilungsaktiv sein und somit nicht die Möglichkeit besitzen, große Kolonien zu bilden (Pastrana et al. 2011).

Der einzig zuverlässige Nachweis von Klonalität stellt die Aussaat einer Einzelzelle pro Well dar (Engstrom et al. 2002; Mori et al. 2006; Singec et al. 2006). Im Einzelzell-Assay sind die sich entwickelnden Sphären obligat klonal, da eine einzelne Zelle völlig isoliert kultiviert wird. Einzelne Stammzellen des Spiralganglions zeigten in völliger Isolation die Fähigkeit zur Sphärenbildung. Diese Eigenschaft ließ sich sowohl bei primären als auch bei sekundären Sphären bestätigen. Durch die Anwendung des Einzelzell-Assays konnte bewiesen werden, dass Neurosphären des Spiralganglions klonal wachsen konnten. Auffällig war, dass die nach DIV 14 gebildeten Sphären unterschiedliche Durchmesser auswiesen. Dies könnte ein weiterer Anhaltspunkt dafür sein, dass die Sphären des Spiralganglions teilweise aus Vorläufer- oder Stammzelle entstanden sind und über die Größe der Sphären am Ende der Inkubation unterschieden werden könnten.

Wenngleich parakrine Effekte die Zellen zur Proliferation stimulieren können, sind diese *in vitro* offensichtlich nur fakultativ notwendig. Die Wachstumsfaktoren im Medium schienen die stimulierenden Effekte anderer Zellen partiell ersetzen zu können. Somit konnte bewiesen werden, dass die Stamm- und Vorläuferzellen des Spiralganglions zu klonalem Wachstum befähigt sind. Aus der Frequenz der Neurosphärenbildung im Einzelzell-Assay Rückschlüsse auf die Zahl der Stammzellen zu ziehen wäre allerdings falsch. Durch das Fehlen parakriner Effekte könnte das Potential von Stammzellen zur Sphärenbildung negativ beeinträchtigt sein.

Oshima et al. (2007a) postulierten, dass innerhalb der Zellsuspension, die aus dem Spiralganglion im Alter der hier verwendeten Versuchstiere gewonnen wird etwa jede 103. bis 170. Zelle eine Sphäre bildet und zog damit Rückschlüsse auf das Potential der Zellen zur Sphärenbildung. Andere Forscher warnen allerdings davor, dass nicht jede Neurosphäre auf eine Stammzelle zurückzuführen ist, da gezeigt werden konnte, dass die Mehrzahl der Sphären nicht von Stammzellen abstammt, sondern von Progenitorzellen (Reynolds & Ritzke 2005). Da die Entstehung von Sphären innerhalb des Einzelzell-Assays ein seltenes Ereignis darstellt, ist diese Methode wenig geeignet, um an den Sphären forschen zu können. Obwohl die entstandenen Sphären durch ihre Reinheit gute Studienobjekte darstellen, ist deren Genese vielmehr ein seltenes Ereignis. Die Platzierung von Einzelzellen in Wells über Cell-Sorting, ohne vorherige Markierung der Zellen, führte in eigenen Versuchen zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Teilweise kontaminierten die Platten und zudem fand kein Wachstum statt. Vermutlich waren die Dauer der Prozedur und die schlechten Umgebungsbedingungen währenddessen Faktoren, die zur Schädigung und Beeinträchtigung der Zellen führten.

Trotz kritischer Aspekte ist der Neurosphären-Assay eine gute Methode zur Isolierung und Propagation neuraler Stammzellen (Reynolds & Rietze 2005). Die Generierung einer Vielzahl von Sphären ist damit sehr gut möglich, wenn gleich eine Aggregation nie sicher ausgeschlossen werden kann und damit die Klonalität der entstandenen Sphären in Frage gestellt werden muss.

4.2.7 Multipotenz von Stammzellen

Nachdem bereits die Selbsterneuerung der Sphären des Spiralganglions gezeigt und die Proliferation über Generationen hinweg anhand von Markern nachvollzogen wurde, folgte eine Untersuchung der Multipotenz der Zellen. Über die neuronalen Marker TUJ und MAP2 sowie den Gliazellmarker GFAP konnte die Differenzierung in reife Zelltypen bestätigt werden.

Der Entzug von Wachstumsfaktoren und die Migration der Zellen aus dem Verband der Sphäre heraus induziert die Differenzierung in reife Zelltypen (Reynolds und Weiss 1992). Diese Form des Auswanderns kann mit der sogenannten „Chain migration“ verglichen werden (Lobo et al. 2003). Die „Chain migration“ beschreibt die Wanderung der dicht aneinander gelegenen, langgestreckten Neuroblasten von der SVZ zum Bulbus olfactorius entlang einer genau definierten Bahn, dem rostralen Wanderungsstrom (Lois et al. 1996).

Da die Neuroblasten nicht durch Fasern von Zellen gelenkt werden und kein leitendes Gerüst vorhanden ist, kann diese Migration mit der Auswanderung der Zellen aus der Sphäre heraus verglichen werden (Lobo et al. 2003). Während der Differenzierung in sensorische Neurone durchlaufen die Stammzellen die verschiedenen Stufen embryonaler Vorläuferzellen im Verlauf der Entwicklung des Innenohrs (Martinez-Monedero et al. 2008). Beim Auswachsen zu einem Monolayer kann das Zentrum der ursprünglichen Sphäre auch nach Flachwerden aus mehreren Schichten bestehen (Bez et al. 2003).

Aufgrund vorausgegangener Studien wurden BDNF und NT-3 in Kombination miteinander verwendet, um die Differenzierung in Neurone zu unterstützen (Oshima et al. 2007b). Dem therapeutischen Einsatz dieser Neurotrophine, die die Zellproliferation, die Differenzierung und das Überleben der Neurone fördern (Huang & Reichardt 2003), stehen dennoch Bedenken gegenüber. Da der Trk-Signalweg bei der Tumorentstehung ebenfalls eine bedeutende Rolle einnimmt, müsste dies in die Erwägungen der klinischen Anwendung einbezogen werden (Nakagawara 2001). Allerdings steht diesen Zweifeln gegenüber, dass differenzierte Zellen nicht weiter proliferieren und daher die Tumorbildung sehr unwahrscheinlich würde.

Als neuronenspezifisches β -III Protein von Mikrotubuli (Lee et al. 1990) wurde TUJ von mehreren Forschergruppen als Marker für Neurone in Differenzierungskulturen von Sphären des Spiralganglions verwendet (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007a; Rask-Andersen et al. 2005; Senn et al. 2007; Zhang et al. 2011). Zusätzlich zu TUJ wurde in den dargestellten Versuchen MAP2 als neuronaler Marker verwendet. MAP2 ist als Mikrotubulus assoziiertes Protein ebenfalls Teil des neuronalen Zytoskeletts (Sloboda et al. 1975) und wurde daher als neuer neuronaler Marker für die differenzierten Sphärenzellen des Spiralganglions beschrieben und quantifiziert. Entgegen der erwarteten Färbung, war das MAP2-Signal in den dendritischen Fortsätzen nicht wahrnehmbar, sondern lediglich im Perikaryon, was bereits von Rak et al. (2011) als Abweichung beschrieben wurde.

Die Vergleichbarkeit mit anderen Studien ist nur eingeschränkt möglich. In jenen Studien mit Versuchen zur Differenzierung von Sphären des Spiralganglions wurde die genaue Anzahl der ausplattierten Sphären oder die Größe beziehungsweise Zellzahl des ausgezählten Feldes nicht benannt (Senn et al. 2007; Rask-Andersen et al. 2005). Zudem wurden MAP2-positive Zellen und nicht TUJ-positive Zellen quantifiziert.

Da in den vorliegenden Versuchen alle Zellen eines Wells ausgewertet wurden und nicht lediglich wenige zufällig gewählte Felder (Di Santo et al. 2013; Oshima et al. 2007b), können die vorliegenden Daten als exakter betrachtet werden. Somit können subjektive Entscheidungen des Experimentators bei der Wahl zufälliger Areale gänzlich ausgeschlossen werden und machen die Auszählung objektiver. Rask-Andersen et al. (2005), Senn et al. (2007) und Di Santo et al. (2013) gaben ebenfalls nicht an, ob alle TUJ-positiven Zellen gezählt wurden oder wie bei Oshima et al. (2007b) nur diejenigen TUJ-positiven Zellen, die eine neuronale Morphologie aufwiesen. Abweichungen der Zahlen der gefundenen neuron- und gliaähnlichen Zellen in den genannten Studien im Vergleich zu den hier dargelegten Versuchen erscheinen daher plausibel. Übereinstimmend mit vorherigen Studien zeigte die Mehrzahl der Zellen in Differenzierungskulturen weder ein GFAP-positives noch ein MAP2- bzw. TUJ-positives Signal (Oshima et al. 2007b).

MOSP als Oligodendrozyten-spezifischer Marker konnte bei den Zellen des Spiralganglions nicht nachgewiesen werden. Da Oligodendrozyten im ZNS lokalisiert sind und das Innenohr zum peripheren Nervensystem zählt, scheint diese Tatsache nachvollziehbar. Daher erscheint es plausibel, dass kein Oligodendrozyten-spezifisches Signal in differenzierten Sphärenzellen des peripheren, nicht zentralen Teil dieses Nervengewebes entdeckt werden konnte. Zellen des Spiralganglions scheinen somit in Zellen ihres Ursprungsgewebes und nicht in alle Typen der glialen Linie differenzieren zu können. Senn et al. (2007) beschrieben bereits, dass die Multipotenz von Zellen des Spiralganglions *in vitro* eingeschränkt sei, was durch die hier dargestellten Versuche unterstrichen wird. GFAP ist zwar eher ein klassischer Marker der Astrozyten des ZNS, wird jedoch auch von Schwann- und Satellitenzellen im neonatalen Innenohr exprimiert (Rio et al. 2002). Die in Kultur entstandenen Schwannzellen tragen durch ihre ernährende Funktion zum Überleben der kultivierten Spiralganglionneurone bei (Hansen et al. 2001) und sind daher wichtige Komponenten der Differenzierungskulturen.

Bei differenzierten Sphären des Spiralganglions aus adulten Meerschweinchen konnten bereits BrdU-GFAP- und BrdU-TUJ-doppelt-positive Zellen nachgewiesen werden (Rask-Andersen et al. 2005). Dieses Phänomen der Neubildung von nerven- und gliazellähnlichen Zellen konnte in den vorgelegten Versuchen erstmals auch für Zellen des Spiralganglions neonataler Mäuse nachgewiesen werden.

Somit wurde der Beweis geliefert, dass die neuronen- und gliaähnlichen Zellen nach vorheriger Proliferation von Zellen hervorgegangen und damit neu entstanden waren. Phänotypisch schienen die durch Mitose entstandenen Zellen daher Neurone und Gliazellen zu sein.

Einerseits gab die Darstellung der Proteinexpression mittels Immunhistochemie Hinweise darauf, dass die entstandenen Zellen von maturer Zellstruktur waren. Andererseits deutete die Morphologie in elektronenmikroskopischen Bildern auf Nerven- und Gliazellen hin. Dabei lagen neuronähnliche Zellen häufig in direktem Kontakt zu gliazellähnlichen Zellen, die auch *in vivo* äußerst enge Verbindungen miteinander eingehen. Zudem konnten interneuronale Zell-Zell-Verbindungen, wie beispielsweise dendro-dendritische oder axo-somatische beziehungsweise dendro-somatische Kontakte, detektiert werden. Diese lassen sich ebenfalls *in vivo* als Synapsen zwischen Neuronen wiederfinden. Vorwiegend wurden bipolare Nervenzellen entdeckt, die *in vivo* hauptsächlich im Innenohr wiederzufinden sind (Engström & Sjöstrand 1954). Dabei dockt der periphere Dendrit an den Haarzellen an, der zweite Ausläufer verläuft nach zentral.

Differenzierte Innenohrstammzellen exprimieren sowohl neuronale Marker und zeigten ebenfalls elektrophysiologische Aktivität (Martinez-Monedero et al. 2008). Die Tatsache, dass aus Sphärenzellen Neurone entstehen können, die elektrophysiologisch aktiv sind, wecken therapeutische Hoffnungen, die Stammzellen *in vivo* zur Differenzierung und zur Erneuerung geschädigter oder abgestorbener Neurone anregen zu können.

4.3 Ausblick

Mit der Möglichkeit, Stammzellen des Spiralganglions *in vitro* isolieren und in Neurone differenzieren zu können, werden neue Wege der pharmakologischen Forschung eröffnet. Denkbar erscheinen Tests neuer Medikamente, die Signalwege beeinflussen und die Entstehung neuer Nervenzellen in Gang bringen. Therapien, basierend auf der Transplantation von Stammzellen, könnten möglicherweise degenerierte Neurone erneuern oder zumindest die verbliebenen Neurone erhalten, was gerade im Hinblick auf Cochlea-Implantate von immenser Bedeutung wäre. Eine mögliche Gefahr der Implantation pluripotenter embryonaler Stammzellen wäre die Induktion der Tumorbildung (Thinyane et al. 2005). Daher wird die biologische Sicherheit transplanteder Zellen und damit deren Therapiemöglichkeiten in Frage gestellt.

Das Potential der Tumorigenität scheint mit dem Potential der implantierten Zellen assoziiert zu sein, da differenzierte Zellen weniger tumorigen erscheinen als pluripotente embryonale Stammzellen (Fukuda et al. 2006). Somit bilden gewebsspezifische multipotente Stammzellen weitaus seltener Teratome (Placzek et al. 2009). Da die Stamm- und Progenitorzellen des Spiralganglions bei einer Transplantation gewebsspezifisch eingesetzt würden und multipotente neurale Vorläufer darstellen, machen diese Faktoren eine unkontrollierte Wucherung sehr unwahrscheinlich.

Beim Versuch der Transplantation liegt die erste zu überwindende Hürde in der schweren Zugänglichkeit der Cochlea in ihrer Kapsel. Würde die Transplantation von Stammzellen ins Innenohr funktionieren, müssten sich die Zellen über den gesamten Raum der Scala media verteilen, überlebensfähig bleiben und zu ihrem definierten Ziel hin auswachsen können. Das gerichtete Wachstum wäre von einer Reihe von Signalmolekülen abhängig, um die Signale der Haarzellen verarbeiten und weiterleiten zu können. Neurone, die sich aus Stammzellen entwickelt hatten, wiesen bei Untersuchungen an Tiermodellen im Innenohr die Fähigkeit zu gerichtetem Wachstum hin zu den Haarzellen des Corti-Organ auf (Corrales et al. 2006).

Forschungsprojekte, die auf Bedingungen des gerichteten Wachstums fokussieren, sind im Hinblick auf Cochlea-Implantationen von großer Bedeutung, da hierüber Neuritenwachstum zu den stimulierenden Elektroden erreicht werden könnte. Dabei könnten Neurotrophine, wie BDNF und NT-3 appliziert werden, da diese als Lockstoffe zum Auswachsen von Neuriten dienen (Pirvola et al. 1992). Doch auch ohne die Cochlea-Implantation wäre eine Stimulation von Vorläuferzellen durch Neurotrophine zur neuronalen Erhaltung bei schwerhörigen Menschen denkbar (Rask-Andersen et al. 2005).

Weiterhin wäre es überaus wichtig, zusätzliche Experimente durchzuführen, um zwischen Stamm- und Vorläuferzellen differenzieren zu können. Hochinteressant erscheint dabei, wie hoch der tatsächliche Anteil der Stammzellen im neonatalen Innenohr ausfällt und wie viele Progenitorzellen vorhanden sind. Denn letztendlich wären eher Stammzellen Mittel der Wahl für Transplantationsversuche. Einerseits könnten hierzu weitere Proteinmarker herangezogen werden, die mit Stammzellen assoziiert erscheinen, wie z.B. CD143. Da Nestin nicht zwischen Stamm- und Vorläuferzellen unterscheidet, wäre die Untersuchung weiterer Marker sinnvoll.

Andererseits könnten über die Verwendung des Kollagen-Assays Kriterien festgelegt werden, die zwischen Progenitor- und Stammzellen des Spiralganglions unterscheiden, wie dies bereits für Stamm- und Vorläuferzellen des Gehirns möglich ist (Louis et al. 2008).

Die Entwicklung von Methoden, die auf die Aufreinigung des murinen Spiralganglions fokussieren, wäre zudem überaus sinnvoll. Denn bislang ist es bei Mäusen nicht möglich die Neurone des Spiralganglions ohne den ihnen anhaftenden Modiolus zu isolieren. Damit sind neben neuronalen Zellen stets Osteoblasten und Osteozyten enthalten, die die gewünschte Stammzellsuspension verunreinigen. Doch Stammzellen können nicht ausschließlich *in vitro* analysiert und studiert werden (Pastrana et al. 2011), weshalb *In-vivo*-Versuche unumgänglich sein werden.

Da der Weg zum therapeutischen Einsatz von Stammzellen noch viele Hürden beinhaltet, wird es vermutlich noch Jahrzehnte bis zu deren Einsatz dauern (Oshima et al. 2010). Solange werden Cochlea-Implantate weiterhin der Goldstandard zur Behandlung von Schwerhörigkeit bleiben. Auch bei dieser Technik gibt es kontinuierlich Fortschritte und Weiterentwicklungen auf dem Weg zum bestmöglichen Behandlungserfolg. Spiralganglionneurone werden beispielsweise durch die Bildung fibrösen Gewebes geschädigt, das aufgrund einer Entzündungsreaktion entsteht (Shepherd et al. 1983). Daher ist die schonende, aseptische Operationsmethode mit hoher Materialverträglichkeit von enormer Bedeutung und verdeutlicht von wie vielen Faktoren der Erfolg einer Implantation beeinflusst werden kann.

5 Zusammenfassung

Über die Mikrodissektion des Spiralganglions und die Kultivierung der Zellen konnten sphärenbildende Stamm- und Vorläuferzellen isoliert werden. Diese Neurosphären wurden anhand ihrer Morphologie, der Proliferationsaktivität und Expression von Nestin bis zur tertiären Generation näher charakterisiert. Morphologisch zeigten sich innerhalb der Sphären kaum Unterschiede. Anhand der Proliferation und Expression von BrdU und Ki-67 stellte sich heraus, dass Sphären bis hin zur tertiären Generation mitotisch aktiv sind und den Stamm- und Progenitorzellmarker Nestin exprimieren.

Des Weiteren waren einzelne Stammzellen des Spiralganglions zu klonalem Sphärenwachstum in der Lage. Einen enormen Einfluss auf die Klonalität von Sphären hatten der Versuchsaufbau sowie der Experimentator. Durch Bewegung der Platten, hohe Zelldichte, lange Kultivierungsdauer und Verwendung sekundärer anstelle primärer Sphären konnte das klonale Wachstum von Sphären negativ beeinflusst werden. Über die Einschränkung der Beweglichkeit von Zellen und der Unterbindung von Konglomeration in Form semisolider Medien konnte diese Anfälligkeit für Chimärismus stark reduziert werden. Selbst bei Platzierung einer Einzelzelle pro Well zeigten die Zellen des Spiralganglions in vollständiger Isolation zu anderen Zellen die Fähigkeit der Sphärenbildung. Zell-Zell-Interaktionen schienen daher kein obligater Parameter für die Generierung klonaler Sphären zu sein.

Neuronale und gliale Zellen differenzierten aus aktiv durch Teilung entstandenen neuen Zellen und wurden über Marker detektiert. Diese Multipotenz ist eine weitere wichtige Eigenschaft von Stammzellen. Die Morphologie dieser Zellen gab weitere wichtige Hinweise darauf, dass Neurone und Gliazellen aus Sphärenzellen entstehen können.

Die dargelegten Versuche zeigen, dass das neonatale Spiralganglion Stammzellen enthält, die die definierenden Eigenschaften von Stammzellen aufweisen (McKay 1997). Sie verfügen über ein hohes proliferatives Potential, sind zur Selbsterneuerung fähig und können in reife Zelltypen des Innenohrs ausdifferenzieren. Diese Charakteristika zeigen, dass im neonatalen Spiralganglion die Fähigkeit zur Regeneration durch Stammzellen vorhanden sein könnte. Mit der Möglichkeit, diese Zellen zu isolieren und zu differenzieren, werden neue therapeutische Wege eröffnet.

6 Summary

Sphere-forming stem- and progenitor cells could be isolated by microdissection of the spiral ganglion and cultivation of these cells. The neurospheres were characterized based on morphology, proliferation and expression of nestin until the third generation. Morphologically hardly any difference could be detected. Proliferation and expression of Ki-67 and BrdU revealed that spheres are not just mitotically active until the third generation but also express the stem- and progenitor cell marker nestin.

Moreover, solely stem cells of the spiral ganglion were able to grow clonally. A huge influence on clonality of spheres had the experimental conception as well as the experimenter. Motion of the plates, high cell density, long cultivation duration but also the usage of secondary instead of primary spheres had a negative impact on the clonal growth of spheres. Restricted motility of cells and the restraint of conglomeration, using semisolid media, resulted in less chimerism. Even if just a single cell was placed per well, cells of the spiral ganglion did not lose the ability for sphere formation. Cell-cell-interaction did not seem to be an obligated parameter for the creation of clonal spheres.

Neuronal and glial cells differentiated from mitotically active, newly emerged cells, these were detected with markers. This multipotency is another main feature of stem cells. The morphology of these cells indicated that neurons and glial cells can be generated from sphere cells.

Presented experiments showed that the neonatal spiral ganglion contains stem cells, displaying defining features of stem cells (McKay 1997). They possess a high proliferative potential, the capacity for self-renewal and they can differentiate into mature cells of the inner ear. These characteristics reveal that the neonatal spiral ganglion potentially could have the ability for the regeneration by stem cells. The opportunity to isolate and differentiate those cells will open new therapeutic ways.

7 Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Veronika Gramling

8 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Form folgender Veröffentlichungen publiziert:

Diensthuber M., **Zecha V.**, Wagenblast J., Arnhold S., Edge AS., Stöver T. Spiral ganglion stem cells can be propagated and differentiated into neurons and glia. Biores Open Access. 2014 Jun 1;3(3):88-97.

Diensthuber M., **Zecha V.**, Wagenblast J., Arnhold S., Stöver T. Clonal colony formation from spiral ganglion stem cells. Neuroreport. 2014 Oct 1;25(14):1129-35.

Teile dieser Arbeit wurden in Form folgender Vorträge präsentiert:

Diensthuber Marc, **Zecha Veronika**, Stöver Timo, Edge Albert. Stammzellen des Spiralganglions sind eine selbsterneuernde Quelle für Neuronen mit dem Potential zur Reinnervation des Corti-Organs. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 83. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Mainz, 16.-20.05.2012. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2012.

Stöver Timo, **Zecha Veronika**, Arnhold Stefan, Diensthuber Marc. Experimentelle Untersuchungen zur Isolierung von Stammzellen aus dem neonatalen Spiralganglion. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Nürnberg, 08.-12.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013.

Diensthuber Marc, **Zecha Veronika**, Arnhold Stefan, Stöver Timo. Evaluation des Neurosphären-Assay als eine Technik zur Isolierung klonaler Stammzellkolonien aus dem Spiralganglion. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Nürnberg, 08.-12.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013.

Diensthuber Marc, **Zecha Veronika**, Arnhold Stefan, Edge Albert, Stöver Timo. Stammzeleigenschaften von Sphären des Spiralganglions nach Propagation. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 85. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Dortmund, 28.05.-01.06.2014. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2014.

Marc Diensthuber, **Veronika Zecha**, Stefan Arnhold, Timo Stöver. Effiziente Isolierung klonaler Stammzellsphären des Spiralganglions durch Anwendung semi-solider Assays. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Berlin, 13.-16.05.2015. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015.

Teile dieser Arbeit wurden in Form folgender Poster präsentiert:

Marc Diensthuber, **Veronika Zecha**, Janina Steck, Christina Dötsch, Albert Edge, Timo Stöver. Differentiation Of Spiral Ganglion-Derived Stem Cells Into Neurons Capable Of Reinnervating The Organ Of Corti. 18th Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy (DG-GT), Perspective Conference of the Stiftung Hämotherapie-Forschung on the Role of Haemotherapy and Transfusion Medicine, 1st Symposium of the LOEWE Center for Cell and Gene Therapy Frankfurt (CGT) 2012.

Veronika Zecha, Stefan Arnhold, Timo Stöver, Marc Diensthuber. Isolierung, Charakterisierung und Differenzierung von Stammzellen des Spiralganglions. Dies academicus des Fachbereichs Medizin der Uniklinik Frankfurt am Main 2013.

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Hilfe verschiedener Personen nicht möglich gewesen, wofür ich mich an dieser Stelle bei Ihnen bedanken möchte.

Zunächst möchte ich Priv. Doz. Dr. Dr. M. Diensthuber für die Themenstellung, Betreuung und Finanzierung des Projekts sowie für die Unterstützung bei der Konzeption und für die Besprechung der Experimente Dank aussprechen. Prof. Dr. Dr. S. Arnhold gilt ebenfalls besonderer Dank für die Übernahme der Doktorarbeit als Erstgutachter, stets nützliche Tipps, Ermöglichung von Zusatzversuchen und väterliche Ratschläge, die mir meine Ängste nahmen. Für die Überlassung des Themas, die Annahme als Doktorandin und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich Prof. Dr. T. Stöver herzlichen Dank sagen. Außerdem möchte ich Dr. S. Stein, M. Ruppel, Dr. H. Ackermann, A. Gössl, S. Kettner, A. Müller und C. Dötsch Dank äußern, die mir bei meinen Versuchen oder der Auswertung bestens geholfen haben. C. Geißler, A. Schubert und C. Dötsch danke ich für die bereichernden Interaktionen.

Spezieller Dank sei meinen beiden Brüdern, die mir in vielerlei Hinsicht hilfreich zur Seite standen. Meinen Eltern, insbesondere meiner Mama, und besonders meinem Mann möchte ich von ganzem Herzen danken. Sie haben mich uneingeschränkt in allen Bereichen unterstützt, mich immer motiviert, fortwirkend Verständnis aufgebracht, mir eine Oase der Geborgenheit geschaffen und mich mit bedingungsloser Liebe überschüttet.

10 Literaturverzeichnis

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509), 1127-1128.

Arsenijevic, Y., Weiss, S., Schneider, B., & Aebischer, P. (2001). Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7194-7202.

Azari, H., Louis, S. A., Sharififar, S., Vedam-Mai, V., & Reynolds, B. A. (2011). Neural-colony forming cell assay: an assay to discriminate bona fide neural stem cells from neural progenitor cells. *Journal of visualized experiments: JoVE*(49).

Baumgärtner, W., & Gruber, A. D. (2011). *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag.

Bazan, E., Alonso, F. J., Redondo, C., Lopez-Toledano, M. A., Alfaro, J. M., Reimers, D., Herranz, A. S., Paíno, C. L., Serrano, A. B., Cobacho, N., Caso, E., Lobo, M. V. (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol*, 19(4), 1261-1275.

Beier, H. M. (2002). Zur Forschung an menschlichen embryonalen Stammzellen und Embryonen. *Reproduktionsmedizin*, 18(1), 25-31.

Berglund, A. M., Ryugo, D. K. (1986). A monoclonal antibody labels type II neurons of the spiral ganglion. *Brain research*, 383(1-2), 327-332.

Berglund, A. M., Ryugo, D. K. (1987). Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *The Journal of comparative neurology*, 255(4), 560-570.

Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R. F., Pagano S. F., Parati E. A. (2003). Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. [Comparative Study]. *Brain research*, 993(1-2), 18-29.

Bommas-Ebert, U., Teubner, P., Voß, R. (2011). *Kurzlehrbuch Anatomie: und Embryologie* (3 ed.). Stuttgart: Thieme

Brickman, Y. G., Ford, M. D., Small, D. H., Bartlett, P. F., Nurcombe, V. (1995). Heparan sulfates mediate the binding of basic fibroblast growth factor to a specific receptor on neural precursor cells. *The Journal of biological chemistry*, 270(42), 24941-24948.

Chaddah, R., Arntfield, M., Runciman, S., Clarke, L., van der Kooy, D. (2012). Clonal neural stem cells from human embryonic stem cell colonies. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(23), 7771-7781.

Chang, G. Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), 12107-12119.

Coles-Takabe, B. L., Brain, I., Purpura, K. A., Karpowicz, P., Zandstra, P. W., Morshead, C. M., van der Kooy, D. (2008). Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies. *Stem Cells*, 26(11), 2938-2944.

Corrales, C. E., Pan, L., Li, H., Liberman, M. C., Heller, S., Edge, A. S. (2006). Engraftment and differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells in the cochlear nerve trunk: growth of processes into the organ of Corti. *Journal of neurobiology*, 66(13), 1489-1500.

Dalby, M. J., Gadegaard, N., Riehle, M. O., Wilkinson, C. D., Curtis, A. S. (2004). Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(10), 2005-2015.

Davies, E. L., Fuller, M. T. (2008). Regulation of self-renewal and differentiation in adult stem cell lineages: lessons from the *Drosophila* male germ line. [Review]. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, 137-145.

Deasy, B. M., Lu, A., Tebbets, J. C., Feduska, J. M., Schugar, R. C., Pollett, J. B., et al. (2007). A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *The Journal of cell biology*, 177(1), 73-86.

Deleyrolle, L. P., Reynolds, B. A. (2009). Isolation, expansion, and differentiation of adult Mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. [Review]. *Methods in molecular biology*, 549, 91-101.

Di Santo, S., Mina, A., Ducray, A., Widmer, H. R., Senn, P. (2013). Creatine supports propagation and promotes neuronal differentiation of inner ear progenitor cells. *Neuroreport*. 2014 May 7;25(7):446-51.

Diensthuber, M., Oshima, K., Heller, S. (2009). Stem/progenitor cells derived from the cochlear sensory epithelium give rise to spheres with distinct morphologies and features. *J Assoc Res Otolaryngol*, 10(2), 173-190.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36(6), 1021-1034.

Engstrom, C. M., Demers, D., Dooner, M., McAuliffe, C., Benoit, B. O., Stencel, K., Joly, M., Hulspas, R., Reilly, J. L., Savarese, T., Recht, L. D., Ross, A. H., Quesenberry, P.J. (2002). A method for clonal analysis of epidermal growth factor-responsive neural progenitors. *Journal of neuroscience methods*, 117(2), 111-121.

Engstrom, H., Sjostrand, F. S. (1954). The structure and innervation of the cochlear hair cells. *Acta oto-laryngologica*, 44(5-6), 490-501.

Ernfors, P., Merlio, J. P., Persson, H. (1992). Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *The European journal of neuroscience*, 4(11), 1140-1158.

Fritsch, B., Farinas, I., Reichardt, L. F. (1997). Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(16), 6213-6225.

Fukuda, H., Takahashi, J., Watanabe, K., Hayashi, H., Morizane, A., Koyanagi, M., Sasai, Y., Hashimoto, N. (2006). Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem cells*, 24(3), 763-771.

Gage, F. H., Ray, J., Fisher, L. J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annual review of neuroscience*, 18, 159-192.

Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., Flad, H. D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, 138(4), 867-873.

Gil-Perotin, S., Duran-Moreno, M., Cebrian-Silla, A., Ramirez, M., Garcia-Belda, P., Garcia-Verdugo, J. M. (2013). Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anatomical record*, 296(9), 1435-1452.

Glavaski-Joksimovic, A., Thonabulsombat, C., Wendt, M., Eriksson, M., Ma, H., Olivius, P. (2009). Morphological differentiation of tau-green fluorescent protein embryonic stem cells into neurons after co-culture with auditory brain stem slices. *Neuroscience*, 162(2), 472-481.

Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D. J., Roisen, F., Nickel, D. D., Vescovi, A. L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 1091-1100.

Hafidi, A. (1998). Peripherin-like immunoreactivity in type II spiral ganglion cell body and projections. *Brain research*, 805(1-2), 181-190.

Hafidi, A., Fellous, A., Ferhat, L., Romand, M. R., Romand, R. (1992). Developmental differentiation of MAP2 expression in the central versus the peripheral and efferent projections of the inner ear. *The Journal of comparative neurology*, 323(3), 423-431.

Hansen, M. R., Vijapurkar, U., Koland, J. G., Green, S. H. (2001). Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. *Hearing research*, 161(1-2), 87-98.

Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80(2), 213-223.

Hick, C., Hick, A. (2000). *Physiologie*. München: Urban und Fischer Verlag.

Hinojosa, R., Riggs, L. C., Strauss, M., Matz, G. J. (1995). Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. *Am J Otol*, 16(6), 731-740.

Hockfield, S., McKay, R. D. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 5(12), 3310-3328.

Hua, X., Lei, M., Zhang, Y., Ding, J., Han, Q., Hu, G., Xiao, M. (2007). Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life sciences*, 80(20), 1897-1905.

Huang, E. J., Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 72, 609-642.

Incesulu, A., & Nadol, J. B., Jr. (1998). Correlation of acoustic threshold measures and spiral ganglion cell survival in severe to profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 107(11 Pt 1), 906-911.

Jessberger, S., Clemenson, G. D., Jr., Gage, F. H. (2007). Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells. *Stem Cells*, 25(4), 871-874.

Johnson, D. E., Williams, L. T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*, 60, 1-41.

Kalyani, A., Hobson, K., Rao, M. S. (1997). Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Developmental biology*, 186(2), 202-223.

Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T., Okano, H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*, 22(1-2), 139-153.

Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., Gage, F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(15), 5820-5829.

Kujawa, S. G., Liberman, M. C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(45), 14077-14085.

Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L. B., O'Brien, T. F., Kusakabe, M., Steindler, D. A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Experimental neurology*, 156(2), 333-344.

Ladiwala, U., Basu, H., Mathur, D. (2012). Assembling neurospheres: dynamics of neural progenitor/stem cell aggregation probed using an optical trap. *PloS one*, 7(6), e38613.

Lee, M. K., Tuttle, J. B., Rebhun, L. I., Cleveland, D. W., Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell motility and the cytoskeleton*, 17(2), 118-132.

Lefebvre, P. P., Malgrange, B., Staecker, H., Moghadass, M., Van de Water, T. R., Moonen, G. (1994). Neurotrophins affect survival and neuritogenesis by adult injured auditory neurons in vitro. *Neuroreport*, 5(8), 865-868.

Lendahl, U., Zimmerman, L. B., McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585-595.

Li, H., Liu, H., Heller, S. (2003). Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nature medicine*, 9(10), 1293-1299.

Liberman, M. C. (1980). Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hearing research*, 3(1), 45-63.

Lobo, M. V., Alonso, F. J., Redondo, C., Lopez-Toledano, M. A., Caso, E., Herranz, A. S., Paíno, C. L., Reimers, D., Bazán, E. (2003). Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 51(1), 89-103.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2074-2077.

Lou, X. X., Nakagawa, T., Ohnishi, H., Nishimura, K., Ito, J. (2013). Otospheres derived from neonatal mouse cochleae retain the progenitor cell phenotype after ex vivo expansions. *Neuroscience letters*, 534, 18-23.

Louis, S. A., Rietze, R. L., Deleyrolle, L., Wagey, R. E., Thomas, T. E., Eaves, A. C., Reynolds, B. A. (2008). Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem cells*, 26(4), 988-996.

Malgrange, B., Belachew, S., Thiry, M., Nguyen, L., Rogister, B., Alvarez, M. L., Rigo, J. M., Van De Water, T. R., Moonen, G., Lefebvre, P.P. (2002). Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mechanisms of development*, 112(1-2), 79-88.

Martinez-Monedero, R., Edge, A. S. (2007). Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. *Int J Dev Biol*, 51(6-7), 655-661.

Martinez-Monedero, R., Yi, E., Oshima, K., Glowatzki, E., Edge, A. S. (2008). Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Developmental neurobiology*, 68(5), 669-684.

McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276(5309), 66-71.

Mirzadeh, Z., Doetsch, F., Sawamoto, K., Wichterle, H., Alvarez-Buylla, A. (2010). The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *Journal of visualized experiments : JoVE*(39).

Mori, H., Fujitani, T., Kanemura, Y., Kino-Oka, M., Taya, M. (2007). Observational examination of aggregation and migration during early phase of neurosphere culture of mouse neural stem cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(3), 231-234.

Mori, H., Ninomiya, K., Kino-oka, M., Shofuda, T., Islam, M. O., Yamasaki, M., Okano, H., Taya, M., Kanemura, Y. (2006). Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *Journal of neuroscience research*, 84(8), 1682-1691.

Morrison, S. J., Shah, N. M., Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88(3), 287-298.

Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N., van der Kooy, D. (2002). Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature medicine*, 8(3), 268-273.

Morshead, C. M., Craig, C. G., van der Kooy, D. (1998). In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development*, 125(12), 2251-2261.

Mou, K., Adamson, C. L., Davis, R. L. (1998). Time-dependence and cell-type specificity of synergistic neurotrophin actions on spiral ganglion neurons. *The Journal of comparative neurology*, 402(1), 129-139.

Nakagawara, A. (2001). Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*, 169(2), 107-114.

Nevison, B., Laszig, R., Sollmann, W. P., Lenarz, T., Sterkers, O., Ramsden, R., Fraysse, B., Manrique, M., Rask-Andersen, H., Garcia-Ibanez, E., Colletti, V., von Wallenberg, E. (2002). Results from a European clinical investigation of the Nucleus multichannel auditory brainstem implant. *Ear Hear*, 23(3), 170-183.

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1992). Anatomie der Haustiere: Band IV Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen (3rd ed.). Berlin: Paul Parey Verlag.

Nour, M., Quiambao, A. B., Al-Ubaidi, M. R., Naash, M. I. (2004). Absence of functional and structural abnormalities associated with expression of EGFP in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(1), 15-22.

Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters*, 407(3), 313-319.

Ornitz, D. M., Leder, P. (1992). Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *The Journal of biological chemistry*, 267(23), 16305-16311.

Oshima, K., Grimm, C. M., Corrales, C. E., Senn, P., Martinez Monedero, R., Geleoc, G. S., Edge, A., Holt, J. R., Heller, S. (2007a). Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 8(1), 18-31.

Oshima, K., Senn, P., Heller, S. (2009). Isolation of sphere-forming stem cells from the mouse inner ear. *Methods in molecular biology*, 493, 141-162.

Oshima, K., Suchert, S., Blevins, N. H., Heller, S. (2010). Curing hearing loss: Patient expectations, health care practitioners, and basic science. *J Commun Disord*, 43(4), 311-318.

Oshima, K., Teo, D. T., Senn, P., Starlinger, V., Heller, S. (2007b). LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells. *BMC Dev Biol*, 7, 112.

Otte, J., Schunknecht, H. F., Kerr, A. G. (1978). Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation. *Laryngoscope*, 88(8 Pt 1), 1231-1246.

Pastrana, E., Silva-Vargas, V., Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell*, 8(5), 486-498.

Pirvola, U., Ylikoski, J., Palgi, J., Lehtonen, E., Arumae, U., Saarma, M. (1992). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9915-9919.

Placzek, M. R., Chung, I. M., Macedo, H. M., Ismail, S., Mortera Blanco, T., Lim, M., Cha, J. M., Fauzi, I., Kang, Y. (2009). Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface*, 6(32), 209-232.

Portillo, F., Nelson, R. A., Brackmann, D. E., Hitzelberger, W. E., Shannon, R. V., Waring, M. D., Moore, J. K. (1993). Auditory brain stem implant: electrical stimulation of the human cochlear nucleus. *Adv Otorhinolaryngol*, 48, 248-252.

Probst, R., Grevers, G., Iro, H. (2008). *Hals- Nasen- Ohrenheilkunde* (3rd ed.). Stuttgart: Thieme.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A., Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*, 28(1), 69-80.

Rak, K., Volker, J., Frenz, S., Scherzad, A., Schendzielorz, P., Radeloff, A., Jablonka, S., Hagen, R., Mlynski, R. (2014a). Effects of the neurotrophic factors BDNF, NT-3, and FGF2 on dissociated neurons of the cochlear nucleus. *Neuroreport*, 25(12), 960-964.

Rak, K., Volker, J., Jurgens, L., Scherzad, A., Schendzielorz, P., Radeloff, A., Jablonka, S., Mlynski, R., Hagen, R. (2014b). Neurotrophic effects of taurine on spiral ganglion neurons in vitro. *Neuroreport*, 25(16), 1250-1254.

Rak, K., Wasielewski, N. V., Radeloff, A., Volkens, J., Scherzed, A., Jablonka, S., Hagen, R., Mlynski, R. (2011). Isolation and characterization of neural stem cells from the neonatal rat cochlear nucleus. *Cell and tissue research*, 343(3), 499-508.

Rask-Andersen, H., Bostrom, M., Gerdin, B., Kinnefors, A., Nyberg, G., Engstrand, T., Miller, J. M., Lindholm, D. (2005). Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hearing research*, 203(1-2), 180-191.

Reddy, P. H., Beal, M. F. (2005). Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev*, 49(3), 618-632.

Ren, Y. J., Zhang, H., Huang, H., Wang, X. M., Zhou, Z. Y., Cui, F. Z., An, Y. H. (2009). In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups. *Biomaterials*, 30(6), 1036-1044.

Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 19(12), 1134-1140.

Reynolds, B. A., Rietze, R. L. (2005). Neural stem cells and neurospheres-re-evaluating the relationship. *Nature methods*, 2(5), 333-336.

Reynolds, B. A., Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707-1710.

Reynolds, B. A., Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental biology*, 175(1), 1-13.

Rio, C., Dikkes, P., Liberman, M. C., Corfas, G. (2002). Glial fibrillary acidic protein expression and promoter activity in the inner ear of developing and adult mice. *The Journal of comparative neurology*, 442(2), 156-162.

Roghani, M., Mansukhani, A., Dell'Era, P., Bellosta, P., Basilico, C., Rifkin, D. B., Moscatelli, D. (1994). Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *The Journal of biological chemistry*, 269(6), 3976-3984.

Rosenbluth, J. (1962). The fine structure of acoustic ganglia in the rat. *The Journal of cell biology*, 12, 329-359.

- Sell, S. (2013). *Stem Cells Handbook*. New York: Springer Verlag
- Senn, P., Oshima, K., Teo, D., Grimm, C., Heller, S. (2007). Robust postmortem survival of murine vestibular and cochlear stem cells. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 8(2), 194-204.
- Shepherd, R. K., Clark, G. M., Black, R. C. (1983). Chronic electrical stimulation of the auditory nerve in cats. Physiological and histopathological results. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 399, 19-31.
- Shihabuddin, L. S., Ray, J., Gage, F. H. (1997). FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Experimental neurology*, 148(2), 577-586.
- Shinohara, T., Bredberg, G., Ulfendahl, M., Pyykko, I., Olivius, N. P., Kaksonen, R., Lindström, B., Altschuler, R., Miller, J. M. (2002). Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1657-1660.
- Singec, I., Knoth, R., Meyer, R. P., Maciaczyk, J., Volk, B., Nikkhah, G., Frotscher, M., Snyder, E. Y. (2006). Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods*, 3(10), 801-806.
- Slattery, E. L., Oshima, K., Heller, S., Warchol, M. E. (2014). Cisplatin exposure damages resident stem cells of the mammalian inner ear. *Dev Dyn*, 243(10), 1328-1337.
- Sloboda, R. D., Rudolph, S. A., Rosenbaum, J. L., Greengard, P. (1975). Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 177-181.
- Spoendlin, H. (1971). Degeneration behaviour of the cochlear nerve. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*, 200(4), 275-291.
- Spoendlin, H. (1984). Factors inducing retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*, 112, 76-82.

Stankovic, K., Rio, C., Xia, A., Sugawara, M., Adams, J. C., Liberman, M. C., Corfas, G. (2004). Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(40), 8651-8661.

Statistisches Bundesamt: Statistik der schwerbehinderten Menschen 2013 vom 05.12.2014 unter:

https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/BehinderteMenschen/SozialSchwerbehinderteKB5227101139004.pdf?__blob=publicationFile

[Stand 27.04.2015]

Suslov, O. N., Kukekov, V. G., Ignatova, T. N., Steindler, D. A. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14506-14511.

Taupin, P., Ray, J., Fischer, W. H., Suhr, S. T., Hakansson, K., Grubb, A., Gage, F. H. (2000). FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*, 28(2), 385-397.

Thinyane, K., Baier, P. C., Schindehutte, J., Mansouri, A., Paulus, W., Trenkwalder, C., Flügge, G., Fuchs, E. (2005). Fate of pre-differentiated mouse embryonic stem cells transplanted in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats: histological characterization of the grafted cells. *Brain research*, 1045(1-2), 80-87.

Tropepe, V., Sibilina, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F., van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental biology*, 208(1), 166-188.

Vik-Mo, E. O., Sandberg, C., Joel, M., Stangeland, B., Watanabe, Y., Mackay-Sim, A., Moe, M.C., Murrell, W., Langmoen, I.A. (2011). A comparative study of the structural organization of spheres derived from the adult human subventricular zone and glioblastoma biopsies. *Experimental cell research*, 317(7), 1049-1059.

Vintersten, K., Monetti, C., Gertsenstein, M., Zhang, P., Laszlo, L., Biechele, S., Nagy, A. (2004). Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis*, 40(4), 241-246.

Volkenstein, S., Oshima, K., Sinkkonen, S. T., Corrales, C. E., Most, S. P., Chai, R., Jan, T. A., van Amerongen, R., Cheng, A. G., Heller S. (2013). Transient, afferent input-dependent, postnatal niche for neural progenitor cells in the cochlear nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), 14456-14461.

Vukicevic, V., Jauch, A., Dinger, T. C., Gebauer, L., Hornich, V., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., Müller, A. M. (2010). Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mech Ageing Dev*, 131(2), 124-132.

Wachs, F. P., Couillard-Despres, S., Engelhardt, M., Wilhelm, D., Ploetz, S., Vroemen, M., Kaesbauer, J. (2003). High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. *Lab Invest*, 83(7), 949-962.

Wagner, J. P., Black, I. B., DiCicco-Bloom, E. (1999). Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 6006-6016.

Wilson, B. S., Dorman, M. F. (2008). Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hearing research*, 242(1-2), 3-21.

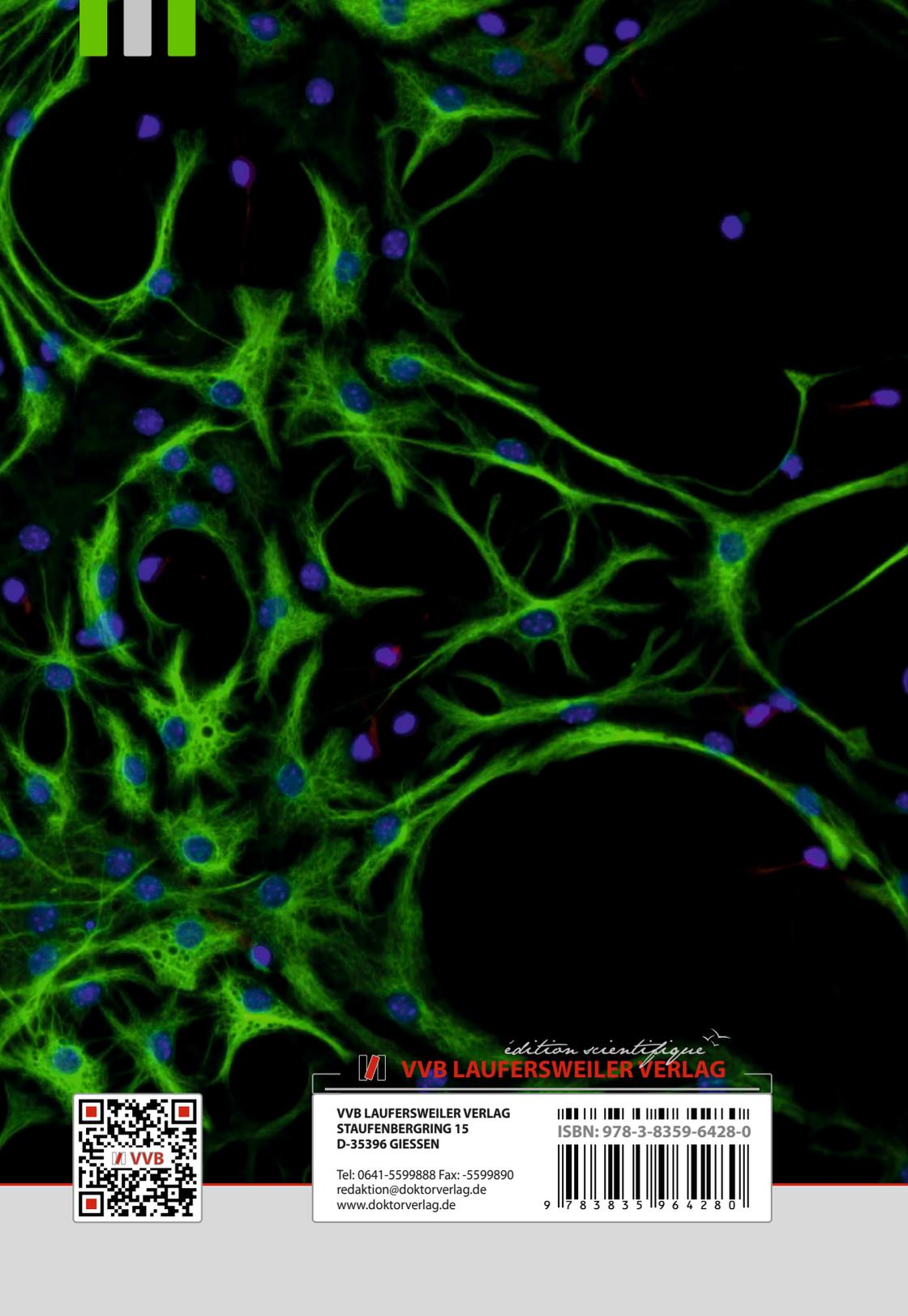
Wise, A. K., Richardson, R., Hardman, J., Clark, G., O'Leary, S. (2005). Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *The Journal of comparative neurology*, 487(2), 147-165.

World Health Organization: Deafness and Hearing loss in Fact Sheet No 300 (March 2015) unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/> [Stand: 27.04.2015]

Xiong, F., Gao, H., Zhen, Y., Chen, X., Lin, W., Shen, J., Yan, Y., Wang, X., Liu, M., Gao, Y. (2011). Optimal time for passaging neurospheres based on primary neural stem cell cultures. *Cytotechnology*, 63(6), 621-631.

Zhang, L., Jiang, H., Hu, Z. (2011). Concentration-dependent effect of nerve growth factor on cell fate determination of neural progenitors. *Stem cells and development*, 20(10), 1723-1731.

Zhang, P. Z., He, Y., Jiang, X. W., Chen, F. Q., Chen, Y., Shi, L., Chen, J., Chen, X., Li, X., Xue, T., Wang, Y., Mi, W.J., Qiu, J.H. (2013). Stem cell transplantation via the cochlear lateral wall for replacement of degenerated spiral ganglion neurons. *Hearing research*, 298, 1-9.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6428-0

