

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Jörg Schipper

Der Einfluss von Wachstumsfaktoren  
auf die Interaktion von Schwannzellen und Hörnervenzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Andrina Kölle

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

Zweitgutachter: PD Dr. med. David Kremer

## **Zusammenfassung**

Der sensorineurale Hörverlust bezeichnet eine Innenohrschädigung mit einer Funktionsstörung der als Sinneszellen fungierenden Haarzellen und einer konsekutiven Schädigung der Hörnervenfasern. Das Ziel der Cochlea-Implantat-Behandlung ist die elektrische Stimulation der verbliebenen funktionsfähigen Hörnervenfasern. Entscheidend ist hierbei die Verhinderung der Degeneration von residualen Spiralganglienzellen und deren verbessertes Anwachsen an die Elektroden des Cochlea-Implantats. Schwannzellen des peripheren Nervensystems sind in der Lage, nach einer axonalen Schädigung durch die Ausschüttung neurotropher Faktoren in einem entscheidenden Maß zur nervalen Regeneration beizutragen. Über die Rolle nicht-myelinisierender Schwannzellen bei der Regeneration von Spiralganglienzellen herrscht unzureichende Kenntnis. In den vorliegenden Untersuchungen wurden Spiralganglienzell-explantate aus 3-5 Tage alten Mäusen mit den Neurotrophinen Fibroblastenwachstumsfaktor-1, Fibroblastenwachstumsfaktor-2 und Neuregulin-1 in verschiedenen Konzentrationen kultiviert und deren Einfluss auf die Glia-Neuron-Interaktion qualitativ und quantitativ untersucht. Dabei ergab sich ein repulsiver Effekt des FGF-1 sowohl auf die Länge der Neuriten als auch auf die Schwannzellausläufer. Neben der verstärkten Netzbildung der Schwannzellen untereinander fiel eine eindeutige Interaktionstendenz zu den Neuriten im Sinne einer faszikelartigen dichten Anlagerung an die Nervenfasern auf. FGF-2 bewirkte lange Neuriten und eine erhöhte Schwannzellproliferation mit kommunizierenden glialen Ausläufern. Das längste Neuritenwachstum, die größte Neuritenanzahl und eine Tendenz zu neuronalen Netzbildungen konnte unter NRG-1 Zugabe festgestellt werden. Begleitende Schwannzellen hatten ebenfalls lange Zellausläufer sowie eine starke Faszikulationstendenz. Im Hinblick auf die Glia-Neurit-Interaktion zeigte sich eine langstreckige Migration glialer Zellen, eine starke Assoziation zu Neuriten sowie eine Beteiligung an Richtungsänderungen der Nervenfasern.

In der Zusammenschau mit aktueller Literatur sind molekulare Interaktionen von Spiralganglienzellen und nicht-myelinisierenden Schwannzellen im Sinne eines repulsiven Effektes durch FGF-1 und eines starken trophischen Effektes von FGF-2 und NRG-1 wahrscheinlich. Zukünftige Therapieresultate von Patienten, die mit Cochlea-Implantaten versorgt werden, könnten durch die Kombination der Cochlea-Implantate mit der Applikation von effektiven Wachstumsfaktoren entscheidend verbessert werden.

## Summary

Sensorineural hearing loss means a damage of the inner ear leading to the disfunction of the sensory cells and a consecutive damage of the acoustic nerve fibers. The treatment with cochlear implants aims to electrically stimulate the residual acoustic nerve fibers. The prevention of neural degeneration has a crucial impact on the therapeutical success as well as the promotion of a better adhesion of the residual nerve fibers on the cochlear implant electrodes. Schwann cells of the peripheral nervous system can contribute essentially to the neural regeneration by the secretion of neurotrophic factors. To date there is insufficient knowledge of the impact of non-myelinating Schwann cells concerning the regeneration of spiral ganglion neurons.

In the present study we cultivated spiral ganglion cell explants of 3-5 days old mice with the neurotrophins fibroblast growth factor 1, fibroblast growth factor 2 and neuregulin 1 in different concentrations and examined their impact on the glia-neuron-interaction in a quantitative and in a qualitative respect. We showed a repulsive effect of the fibroblast growth factor 1 on the neurites lengths and on the length of the Schwann cell processes. Moreover, an increased tendency of the Schwann cells in building cellular networks was seen as well as a tight attachment to the nerve fibers. Fibroblast growth factor 2 induced a long outgrow of the neurites and an increased Schwann cell proliferation with communicating glial processes. The longest outgrow and the highest amount of the nerve fibers was detected after the cultivation with neuregulin 1. This neurotrophin seems to induce an extensive migration of the glial cells with a high association to the nerve fibers and the potency to direct outgrowing axons.

With respect to current literature it seems likely that molecular interactions between spiral ganglion cells and non-myelinating Schwann cells exist in terms of a repulsive effect of fibroblast growth factor 1 and highly trophic effects of fibroblast growth factor 2 and neuregulin 1. Future therapeutic results of patients treated with Cochlear implants could be improved by the additional application of effective neurotrophic factors to standard therapeutic procedures.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

BDNF *brain derived neurotrophic factor*

BERA *brainstem evoked response audiometry*

CAM *cell adhesion molecules*

CI Cochlea-Implantat

CNTF *ciliary neurotrophic factor*

DMEM *Dulbecco's modified Eagles medium*

DNA *deoxyribonucleic acid*

D-PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung

EGF *epidermal growth factor*

EGFR *epidermal growth factor receptor*

ErbB2-4 Akronym für „*avian erythroblastosis virus B oncogene*“

FGF *fibroblast growth factor*

aFGF *acidic fibroblast growth factor*

bFGF *basic fibroblast growth factor*

FGFR1-4 *fibroblast growth factor receptor*

GDNF *glial cell line-derived neurotrophic factor*

HSPG Heparansulfatproteoglykane

IgG Immunglobulin G

kDa Kilodalton

LANUV Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen

mRNA *messenger ribonucleic acid*

Nestin Akronym für *neuroectodermal stem cell marker*

NGF *nerve growth factor*

NRG1 Neuregulin-1 (NRG-1)

NT-3, -4, -5 Neurotrophin-3,-4 und -5

NTR Neurotrophinrezeptor

PFA Paraformaldehyd

Sox2 *sex determining region Y box 2*

S100b *S calcium binding protein B*

TEOAE Transitorisch evozierte otoakustische Emissionen

TGF $\beta$  *transforming growth factor  $\beta$*

TNF Tumornekrosefaktor

Trk A, B, C *tropomyosin-related kinase*

ZETT zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Summary.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Anatomie und Physiologie des Ohres.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Anatomie des menschlichen Ohres .....	1
1.1.2 Physiologie des Hörens .....	2
<b>1.2 Nervale De- und Regeneration im peripheren Nervensystem .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Nicht-myelinisierende Schwannzellen .....	5
1.2.2 Anterograde und retrograde Degeneration von Nervenzellen.....	6
1.2.3 Nervale Regenerationsmechanismen.....	8
<b>1.3 Sensorineuraler Hörverlust und seine Therapieansätze .....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Sensorineuraler Hörverlust.....	10
1.3.2 Indikationen für Cochlea-Implantate.....	12
1.3.3 Einflussfaktoren einer erfolgreichen Hörrehabilitation.....	14
<b>1.4 Neurotrophe Faktoren und ihre Funktionen .....</b>	<b>15</b>
1.4.1 Überblick und Bedeutung im Innenohr .....	15
1.4.2 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 im Innenohr.....	16
1.4.3 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 im Innenohr.....	17
1.4.4 Bedeutung von Neuregulin-1 im Innenohr.....	19
<b>1.5 Neurotrophine und Schwannzellen .....</b>	<b>20</b>
1.5.1 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 für das Schwannzellwachstum..	20
1.5.2 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 für das Schwannzellwachstum..	20
1.5.3 Bedeutung von Neuregulin-1 für das Schwannzellwachstum.....	21
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Geräte .....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Beschichtungen .....	24
2.1.4 Chemikalien .....	24
2.1.5 Puffer und Nährmedien .....	24
2.1.6 Antikörper .....	25
2.1.7 Neurotrophe Faktoren.....	25
2.1.8 Tiermodell .....	26

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.2.1	Beschichtung der gekammerten Zellkulturschalen .....	26
2.2.2	Ansatz der Zellkultur.....	27
2.2.3	Mikrochirurgische Präparation.....	28
2.2.4	Kultivierung von Spiralganglienzellen.....	28
2.2.5	Fixierung und Immunfluoreszenz .....	29
2.2.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	30
2.2.7	Vermessung der Spiralganglienneuriten.....	31
2.2.8	Qualitative Auswertung.....	32
2.2.9	Auswertung und statistische Tests .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Wachstum von Spiralganglienzellen unter Kulturbedingungen</b> .....	<b>33</b>
3.1.1	Anzahl der Tiere und Präparate.....	33
3.1.2	Allgemeine Zellmorphologie .....	33
<b>3.2</b>	<b>Qualitative Analyse des Wachstumsverhaltens von Spiralganglienzellen und Gliazellen</b> .....	<b>35</b>
3.2.1	Dichte Schwannzellvernetzung und kurze Neuriten unter dem Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 .....	35
3.2.2	Reduziertes Gliazellwachstum bei verlängertem Neuritenwachstum unter dem Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 .....	38
3.2.3	Erhöhte Gliazellmigration und vernetztes Neuritenwachstum unter dem Einfluss von Neuregulin-1 .....	42
<b>3.3</b>	<b>Quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens der Neuriten</b> .....	<b>48</b>
3.3.1	Längenwachstum der Spiralganglienneuriten .....	48
3.3.2	Mittelwertvergleiche innerhalb der Gruppen .....	49
<b>3.4</b>	<b>Quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens der nicht-myelinisierenden Schwannzellen</b> .....	<b>53</b>
3.4.1	Länge einzelner Zellausläufer nicht-myelinisierender Schwannzellen .....	53
3.4.2	Anzahl der Zellausläufer nicht-myelinisierender Schwannzellen .....	54
3.4.3	Abstand der Zellkörper nicht-myelinisierender Schwannzellen .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 auf die Interaktion zwischen Spiralganglienzellen und Gliazellen</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 auf die Interaktion zwischen Spiralganglienzellen und Gliazellen</b> .....	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von Neuregulin-1 auf die Interaktion zwischen Spiralganglienzellen und Gliazellen</b> .....	<b>61</b>

4.4	Weitere Einflussfaktoren auf das Wachstum von Neuriten und nicht-myelinisierenden Schwannzellen .....	65
4.5	Risiken durch die Applikation von Neurotrophinen .....	67
4.6	Perspektiven für die klinische Anwendung neurotropher Faktoren und Limitationen angewandter Methoden.....	68
4.7	Schlussfolgerungen .....	72
5	Literaturverzeichnis .....	74
6	Anhang.....	96
6.1	Abbildungsverzeichnis .....	96
6.2	Tabellenverzeichnis .....	98

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Physiologie des Ohres

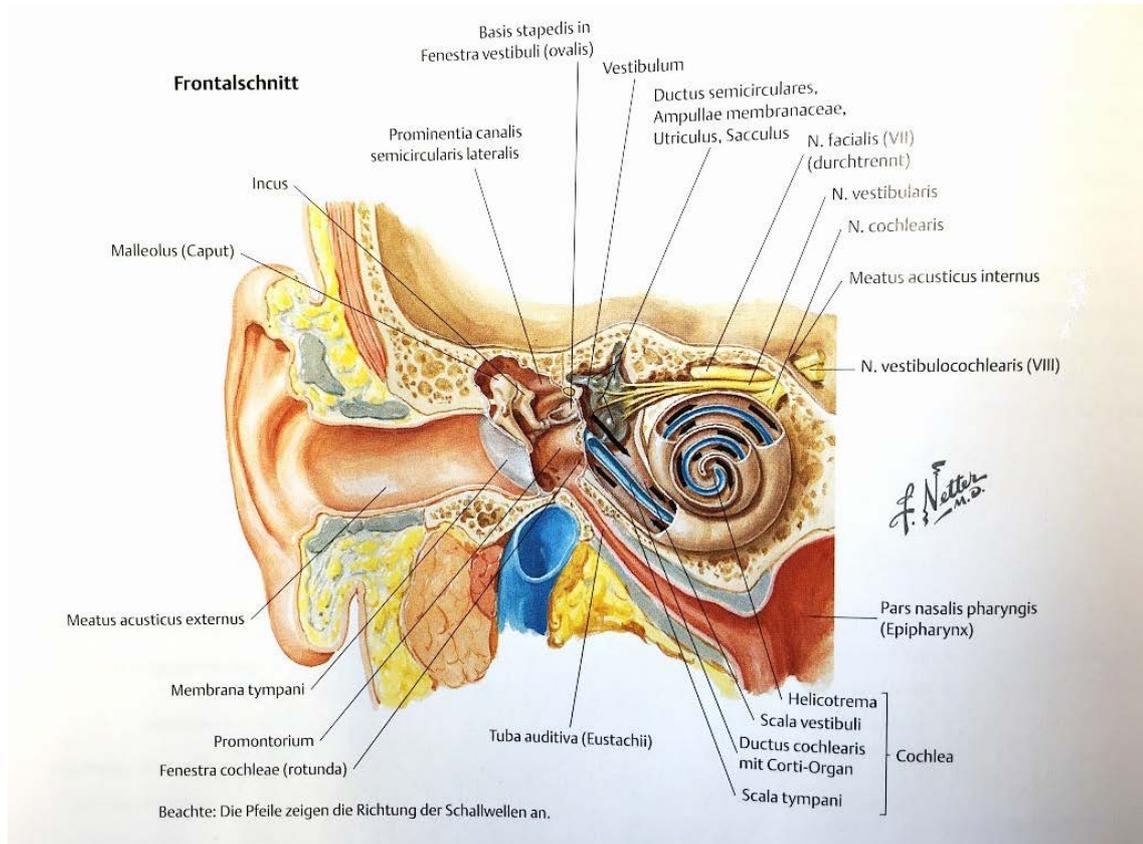
### 1.1.1 Anatomie des menschlichen Ohres

Der anatomische Aufbau des menschlichen Hörorgans gliedert sich in das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Schallwellen in Form von Druckschwankungen in der Luft werden über die Ohrmuschel (*Auricula*) und den luftgefüllten äußeren Gehörgang (*Meatus acusticus externus*) aufgenommen und zu einer membranösen Wand, dem Trommelfell (*Membrana tympani*), geleitet (Abb. 1.1). Ankommende Schallwellen führen zu Schwingungen des Trommelfells, welches die Bewegungen auf die Gehörknöchelchenkette des im Os temporale gelegenen und luftgefüllten Mittelohres (*Cavum tympani*) überträgt. Zu den Gehörknöchelchen zählen von lateral nach medial der Hammer (*Malleus*), der Amboss (*Incus*) und der Steigbügel (*Stapes*), welche die durch Schallwellen ausgelösten Bewegungen des Trommelfells verstärken und über das ovale Fenster in das flüssigkeitsgefüllte Innenohr übertragen (Abb. 1.1).

Der Aufbau des Innenohres wird in einen knöchernen (*Labyrinthus osseus*) und einen häutigen (*Labyrinthus membranaceus*) Anteil unterteilt, welcher das eigentliche Hör- und Gleichgewichtsorgan enthält. Das Hörorgan besteht aus der knöchernen Schnecke (*Cochlea*) (Abb.1.1), die den 2,5-fach gewundenen spiraligen Schneckenkanal (*Canalis spiralis cochleae*) enthält. Der sogenannte *Modiolus* stellt die verknöcherte Achse der *Cochlea* dar. Innerhalb des Schneckenkanals unterteilt die *Lamina spiralis ossea* diesen in einen oberen Raum, der als *Scala vestibuli* bezeichnet wird und in einen unteren Raum, die *Scala tympani* (Abb. 1.2). Die beiden *Scalae* sind über die Schneckenspitze, das sogenannte *Helicotrema*, miteinander verbunden. Zwischen den beiden Gängen befindet sich der *Ductus cochlearis*, welcher die für den Höreindruck verantwortlichen Sinneszellen enthält und auch als *Scala media* bezeichnet wird (Abb. 1.2). *Scala vestibuli* und *Scala tympani* sind mit *Perilymphe* gefüllt, die reich an Natriumionen und arm an Kaliumionen ist und somit der extrazellulären Flüssigkeit ähnelt. Im Gegensatz hierzu findet sich in der *Scala media* eine mit dem Intrazellularraum vergleichbare Flüssigkeit mit einer hohen Kalium- und einer niedrigen Natriumionenkonzentration.

Innerhalb eines knöchernen Kanals, dem Rosenthal-Kanal, liegt das aus bipolaren Spiralganglienzellen bestehende *Ganglion spirale cochleae*, dessen afferente Nervenfasern zusammen mit den Fasern des *Nervus vestibularis* aus dem

Gleichgewichtsorgan den Nervus vestibulocochlearis bilden. Dieser auch als achter Hirnnerv bezeichnete Nerv leitet die Sinnesreize weiter, die nach zentralnervöser Verarbeitung schließlich als Höreindruck wahrgenommen werden.



**Abb. 1.1 Anatomie des menschlichen Ohres nach F. Netter (Netters Klinische Anatomie, modifiziert nach T. Hansen, R. Lambert, 2. Aufl., 2004, Thieme).**

### 1.1.2 Physiologie des Hörens

Innerhalb des Ductus cochlearis befindet sich das für die mechanoelektrische Transduktion verantwortliche Corti-Organ mit seinen Sinneszellen (Abb. 1.2). Der Kanal wird apikal durch die Reissner-Membran, basal durch die die Sinneszellen tragende Basilarmembran und lateral durch die für die Endolymphproduktion verantwortliche Stria vascularis begrenzt und stellt sich im Querschnitt dreieckig dar (Abb. 1.2). Auf der Basilarmembran sitzen verschiedene Sinnes- und Stützzellen auf. Bei den Sinneszellen unterscheidet man innere von äußeren Haarzellen. Während ungefähr 3500 innere Haarzellen einreihig angeordnet sind und ihre synaptischen Kontakte vorwiegend bipolare Afferenzen bilden, besitzen die ca. 15000 überwiegend

dreireihigen äußeren Haarzellen pseudo-unipolare Zellkörper mit efferenten synaptischen Kontakten. Es werden myelinisierte Typ-I-Neuriten, welche Verbindungen mit den inneren Haarzellen eingehen von nicht-myelinisierten Typ-II-Neuriten, die mit den äußeren Haarzellen verbunden sind, unterschieden. Apikal tragen beide Arten von Haarzellen unterschiedlich lange Stereozilien, von denen die längsten Ausläufer der äußeren Haarzellen in eine gallertige Überdachung, die Tektorialmembran (Membrana tectoria), hineinragen (Abb. 1.2). Die Tektorialmembran ragt von medial über das Corti-Organ und hat ihren Ursprung im Limbus spiralis, einer vom Modiolus ausgehenden Knochenspanne (Abb. 1.2). Als Stützzellen sind von medial aus die inneren Phalangenzellen zu nennen, auf denen die inneren Haarzellen aufsitzen. Es folgen die die äußeren Haarzellen tragenden Deiters-Zellen (Abb. 1.2). Zwischen den Reihen der inneren und äußeren Haarzellen mit ihren Stützzellen befindet sich ein Hohlraum, der sogenannte Corti-Tunnel, der mit Perilymphe gefüllt ist (Abb. 1.2). Zu beiden Seiten begrenzt wird der Corti-Tunnel von Pfeilerzellen. Fortsätze von Deiters-Zellen bilden die Retikularmembran, die eine Grenzmembran des Inneren des Corti-Organ zu der mit Endolymphe gefüllten Scala media darstellt (Abb. 1.2). Die lateralen Grenzzellen werden als Hensen- und Claudius-Zellen bezeichnet (Abb. 1.2). Der adäquate Reiz für die Sinneszellen ist eine durch Bewegungen der Scala media hervorgerufene Abscherbewegung der Stereozilien. Bewirkt wird diese Konformationsänderung durch schallinduzierte Relativbewegungen zwischen der Tektorialmembran und der Basilarmembran. Zwischen den Stereozilien sind sogenannte *tip links* quer aufgespannt. Diese Proteinschnüre öffnen bei adäquatem Reiz Kalium- und Kalziumionenkanäle der in die Tektorialmembran ragenden äußeren Haarzellen, welche draufhin kontrahieren. Die Kontraktion der äußeren Haarzellen führt zu einer Bewegung der Tektorialmembran und infolgedessen zu einer Flüssigkeitsbewegung zwischen Tektorialmembran und Corti-Organ. Diese Strömung stellt den adäquaten Reiz zur Depolarisation der inneren Haarzellen über *tip links* dar. Die Depolarisation bewirkt bei den inneren Haarzellen allerdings keine Kontraktion, sondern einen Kalziumioneneinstrom, der zur Ausschüttung von Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter führt. Eine so erfolgte Erregung der inneren Haarzellen führt über die afferenten Neurone der bipolaren Spiralganglienzellen über die Nuclei cochleares in der Medulla oblongata und Weiterleitung in den primär auditorischen Kortex im Temporallappen zu einem Höreindruck.

Die inneren Haarzellen, von denen jede mit einer eigenen nervalen Leitung verbunden ist, dienen somit der direkten Fortleitung auditorischer Reize in zentrale Bereiche, während die in Gruppen mit primär efferenten Nervenfasern verbundenen äußeren Haarzellen der Verstärkung eingehender akustischer Signale dienen. Im ovalen Fenster ankommende hochfrequente Schallwellen führen an der Basis der Cochlea, an der die Basilarmembran eher dick und steif ist, zu einer Wahrnehmung von hohen Tönen. Niedrige Frequenzen stellen für die Spitze der Hörschnecke mit ihrer eher dünnen und leichter verformbaren Basilarmembran den adäquaten Reiz dar. Die so räumlich festgelegte selektive Hörwahrnehmung verschiedener frequenztypischer Amplitudenmaxima wird als Tonotopie bezeichnet.

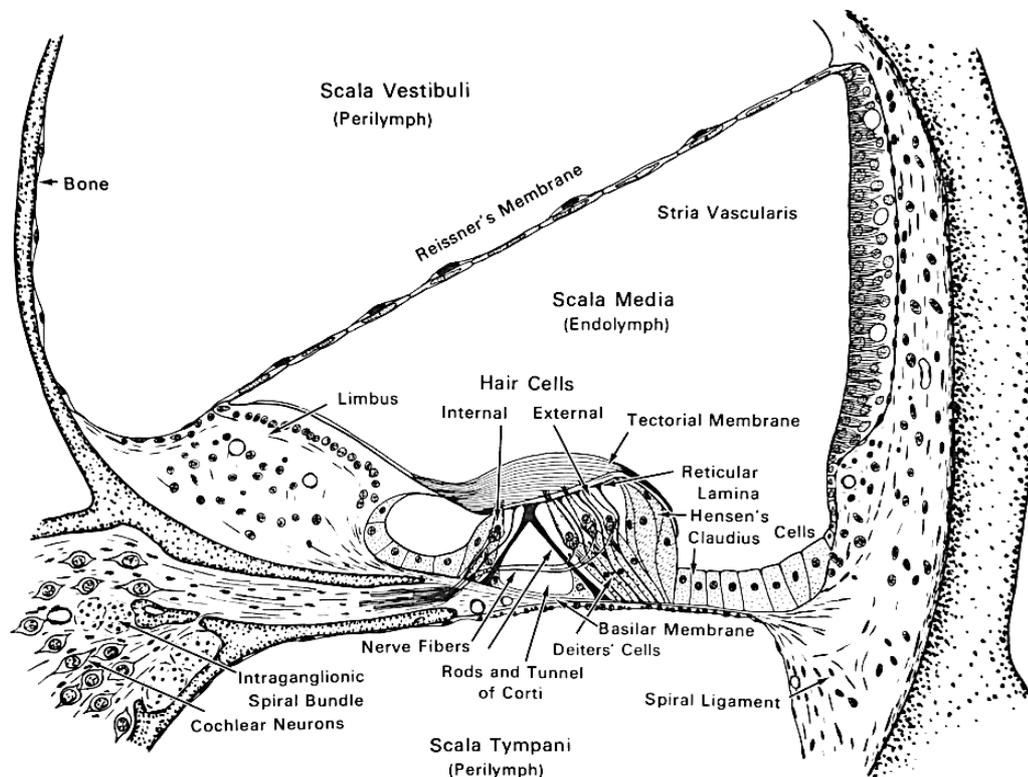


Abb. 1.2 Querschnitt durch den Canalis spiralis cochleae nach Courtesy of Davis, 1962 aus H. Schuknecht (Pathology of the ear, 1974, Harvard University Press). Zu sehen ist die durch Reissner Membran und Lamina spiralis ossea begrenzte Dreigliederung in Scala vestibuli, Scala media mit enthaltendem Corti-Organ und Scala tympani.

## 1.2 Nervale De- und Regeneration im peripheren Nervensystem

### 1.2.1 Nicht-myelinisierende Schwannzellen

Gliazellen des peripheren Nervensystems lassen sich in myelinisierende und nicht-myelinisierende, nach ihrem Entdecker benannte, Schwannzellen unterteilen. Myelin besteht vorwiegend aus Lipiden und Proteinen, deren primärer Nutzen in der elektrischen Isolation der Nervenfasern besteht. Die Myelinisierung dauert von der embryonalen Entwicklung bis in die Adoleszenz an. Myelinisierende Schwannzellen umhüllen mit ihren Zellausläufern Axonabschnitte und wickeln sich lamellenartig mehrfach um eine einzige Nervenfaser. Umgeben sind die Myelinschichten, die auch Markscheiden genannt werden, von einer Basallamina, an die sich nach außen das sogenannte Endoneurium anschließt. Das Endoneurium ist die innerste Bindegewebshülle um eine Nervenfaser und enthält Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen. Die Myelinisierung durch zwei nebeneinanderliegende Schwannzellen ist unterbrochen von sogenannten Ranvier Schnürringen, die eine schnelle, saltatorische Erregungsleitung ermöglichen.

Nicht-myelinisierende Schwannzellen umhüllen mehrere Axone gleichzeitig, wobei es sich meist um dünnere Fasern handelt. Zu Beginn stülpen sich auswachsende Nervenfasern in die Schwannzellen ein, und es entsteht das Mesoaxon, das einer glialen Zellmembranduplikatur entspricht. Die Zytoplasmaausläufer der Schwannzellen liegen den Nervenfasern dabei direkt an, sind aber nicht mit ihnen verwachsen, sodass sich ein interzellulärer, periaxonaler Spalt ergibt. Gegen die bindegewebige Peripherie sind die Schwannzellen durch eine Basalmembran abgegrenzt. Die Dicke der marklosen Axone beträgt durchschnittlich  $1\mu\text{m}$  und die Erregung wird im Vergleich zu myelinisierten Axonen kontinuierlich und langsamer fortgeleitet.

Neben der elektrischen Isolation haben Schwannzellen noch weitere essentielle Aufgaben. Sie besitzen die Fähigkeit, sich auch im adulten Zustand mitotisch zu teilen. Nach einer Nervenverletzung (siehe 1.2.2) fungieren sie in einem reaktivierten Zustand als Makrophagen und beseitigen Zelldébris (Perry et al., 1987). Eine Nervenverletzung induziert eine Proliferation der Schwannzellen (Salzer and Bunge, 1980). Im weiteren Verlauf bilden Schwannzellen longitudinal ausgerichtete Anreihungen von Zellkörpern entlang der Basallamina, sodass diese sogenannte Büngner-Bänder als Leitschienen für die axonale Regeneration entstehen (Fawcett and Keynes, 1990). Zudem sind die Gliazellen des peripheren Nervensystems in der Lage, für die Regeneration wichtige

extrazelluläre Matrixmoleküle und neurotrophe Faktoren zu sezernieren (Fu and Gordon, 1997; Lindholm et al., 1987). Der Verlust der glialen Unterstützung durch Sekretion neurotropher Faktoren kann zu einer fortschreitenden axonalen Degeneration sowie einer lokalen Entzündungsreaktion führen (Nave and Trapp, 2008). Für adulte myelinisierende Schwannzellen ist nachgewiesen, dass sie unter Kulturbedingungen und der Zugabe von Wachstumsfaktoren zu adulten multipotenten Stammzellen der Neuralleiste reprogrammiert werden können (Widera et al., 2011).

### **1.2.2 Anterograde und retrograde Degeneration von Nervenzellen**

Eine menschliche Nervenzelle (Neuron) ist aus einem Zellkörper (Perikaryon, Soma), Dendriten, die afferente Zellfortsätze darstellen sowie aus einer Efferenz in Form von Axonen aufgebaut. Umgeben werden die Nervenfasern von myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwannzellen (siehe 1.2.1). Die Neurone mit ihren Fortsätzen treten häufig nicht singulär auf, sondern sind zu Nervenbündeln zusammengefasst. Nach Key und Retzius (1876) unterscheidet man eine innere Bindegewebsschicht, das Endoneurium, welches der Nervenfaser direkt anliegt, das Perineurium, welches die Nervenfasern zu Bündeln zusammenfügt und das Epineurium, eine die Bündel umhüllende äußere Grenzschiicht (Key and Retzius, 1876).

Bei der Durchtrennung einer Nervenfaser mit Ausnahme ihrer glialen Ummantelung und der perineuralen Schichten spricht man von einer Axonotmesis oder einer Schädigung Grad II nach Sunderland (Sunderland, 1951). Nach dem Kontinuitätsverlust unterscheidet man einen proximalen axonalen Stumpf, welcher noch mit dem Soma verbunden ist von einem distalen Stumpf, der keine Konnektivität mehr zum Perikaryon hat. Eine solche Schädigung hat multiple zelluläre und extrazelluläre Vorgänge zur Folge (Mumenthaler et al., 2014).

Nach einer Axonotmesis kommt es zu einem sekundären Zerfallsprozess der nervalen Strukturen. Diese anterograde, absteigende Degeneration des distalen Zellstumpfes wird auch als Waller-Degeneration bezeichnet (Waller, 1850). Waller beschrieb erstmals eine Retraktionsneigung durchtrennter Nervenfasern sowie ein Anschwellen des Nervenendes bis auf die zweifache ursprüngliche Zellgröße. Die genaue Abfolge und Ausprägung dieser nervalen Degeneration unterscheidet sich je nach Nervenart, Dicke der Nervenfaser, Temperatur, Entfernung von der Läsionsstelle und anderen Umgebungsfaktoren (Waller, 1850). Eine läsionsinduzierte Fragmentation der

Nervenfaser beginnt nahe der Läsionsstelle und breitet sich von dort nach distal aus. Die zeitliche Latenz bis zum Einsetzen der degenerativen Vorgänge beträgt 25 bis 45 Stunden und die Strecke der Degeneration 46 mm bis 250 mm pro Tag, wobei dünnere Fasern früher betroffen sind und schneller degenerieren. Neben der Volumenzunahme des Zellkörpers kommt es zu einer Wanderung des Zellkerns in die Peripherie mit begleitender Chromatolyse. Zusätzlich beginnen auch die glialen Umhüllungen anzuschwellen und in eiförmige Strukturen, sogenannte Ovoide, zu zerfallen (Lubinska, 1977). In der Folge werden die umliegenden Myelinschichten durch Schwannzellen selbst sowie zunächst durch ortsständige Makrophagen abgebaut (Perry et al., 1987). Ab dem zweiten Tag ist zusätzlich eine monozytäre Invasion aus umgebenden Gefäßen zu beobachten (Liu, 1974; Stoll et al., 1989). Die Schwannzellen beginnen ab dem fünften Tag nach der Kontinuitätsunterbrechung zu proliferieren, gleichzeitig sind diverse Veränderungen ihrer Zellorganellen nachweisbar (Seiler and Schröder, 1970). Die proliferierten Schwannzellen bilden anschließend längliche zusammengelagerte Zellausläufer, welche als regenerative Leitstruktur für wieder auswachsende Axone dienen und nach ihrem Entdecker als Büngner-Bänder bezeichnet werden (Fawcett and Keynes, 1990).

Der proximale Zellstumpf unterliegt ähnlichen Veränderungen, die als retrograde Degeneration bezeichnet werden, wobei die Ausprägung vom Schädigungsort abhängig ist. Liegt die Läsionsstelle nah am Perikaryon kann es zum Untergang der gesamten Zelle kommen (Lieberman, 1971).

### 1.2.3 Nervale Regenerationsmechanismen

Im Gegensatz zum zentralen Nervensystem können durchtrennte Nervenfasern im peripheren Nervensystem unter bestimmten Bedingungen wieder regenerieren. Nach einer Axonotmesis laufen Regenerationsvorgänge vor allem im proximalen, mit dem Perikaryon verbundenen Zellstumpf ab.

Innerhalb der ersten Tage nach der Durchtrennung produzieren die axonalen Stümpfe eine hohe Anzahl von kollateralen Aussprossungen, die in verschiedene Richtungen wachsen bis die ersten Ausläufer ein distales Nervenende erreicht haben (Lundborg, 1987). Die Enden der aussprossenden Nervenfasern tragen hierbei von Ramon y Cajal erstmals 1928 postulierte *growth cones* oder Wachstumskegel (Ramon y Cajal, 1928). Hierbei handelt es sich um zelluläre Auftreibungen mit mobilen Filopodien und Mikrospiques, die durch Chemoattraktion und -repulsion gelenkt werden und an ihrer Oberfläche Rezeptoren tragen, die an Zelladhäsionsmoleküle der Umgebung binden (Frostick et al., 1998). Die Wachstumskegel selbst sezernieren eine Protease, den Plasminogen-Aktivator, um die umgebende Matrix für ein schnelleres Vorankommen durchgängiger zu machen (Krystosek and Seeds, 1981). Ein Glykoprotein, welches Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Basallamina von Schwannzellen ist, spielt in der Attraktion von Wachstumskegeln eine zentrale Rolle. Es handelt sich hierbei um Laminin, das zu einem verlängerten Neuritenwachstum, zur Defaszikulation auswachsender Nerven sowie zu einer Stabilisierung der Wachstumskegel beiträgt (Gundersen, 1987; Seckel, 1990).

Nach der Durchtrennung eines Nerven sezernieren sowohl der proximale als auch der distale Stumpf verstärkt den Wachstumsfaktor *nerve growth factor* (NGF) (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). Begleitend dazu exprimieren die umgebenden Schwannzellen des distalen Nervenendes ebenfalls NGF und einen entsprechenden Rezeptor, den *p75 nerve growth factor receptor* (p75 NGF) und treten somit auf humoraler Ebene mit aussprossenden Axonen in Kontakt (Heumann et al., 1987; Johnson Jr et al., 1988).

Eine entscheidende Rolle in der nervalen Regeneration spielen die Schwannzellen. Nach einer Axonotmesis induzieren die zellulären Zerfallsprodukte die Zellproliferation und Phagozytosefähigkeit der Schwannzellen (Aguayo et al., 1976). Die den distalen Zellstumpf umgebenden Schwannzellen dedifferenzieren in ein den Schwannzellen vorläufiges Stadium, welches die nervale Regeneration unterstützt. Hierzu sezernieren

sie verstärkt Adhäsionsmoleküle, sogenannte *cell adhesion molecules* (CAMs). Weiterhin verstärken sie die Basalmembran durch die Sekretion von extrazellulären Matrixmolekülen wie Laminin, Fibronectin und Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) (Fu and Gordon, 1997). Schließlich sind auch Schwannzellen in der Lage, neurotrophe Faktoren zu sezernieren. Wie alle Nervenendigungen sezernieren sie *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und Neurotrophin-3 (NT-3) sowie *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin-4 (NT-4) (Funakoshi et al., 1993; Watabe et al., 1995). Mit ihrer Migrationsfähigkeit wandern sie nach einer Axonotmesis sowohl vom proximalen als auch vom distalen Zellstumpf aus, begleiten die Axone oder wachsen ihnen voraus. Mit glialer Unterstützung sind die Auswachsungsgeschwindigkeiten der Neuriten signifikant höher, wobei die Gliazellen des distalen Stumpfes eine höhere Potenz zur Unterstützung zeigen (Torigoe et al., 1996).

Erreichen die auswachsenden Axone die Büngner-Bänder des distalen Abschnittes, wachsen sie in diese ein. Daraufhin sterben überschüssige ausgewachsene Axone ab und nach ungefähr sieben Tagen beginnt eine Remyelinisierung der neu zusammengewachsenen axonalen Fasern (Nathaniel and Pease, 1963).

## 1.3 Sensorineuraler Hörverlust und seine Therapieansätze

### 1.3.1 Sensorineuraler Hörverlust

Der sensorineurale Hörverlust bezeichnet eine Schädigung des Innenohres oder Hörnervs und geht zumeist mit einer Funktionsstörung der inneren Haarzellen des Corti-Organ und einer begleitenden oder konsekutiven Schädigung des Hörnervs einher. Es lassen sich allgemein kongenitale und erworbene Ursachen für diese Schallempfindungsschwerhörigkeit unterscheiden.

Kongenitale genetische Ursachen umfassen zum einen syndromale Erkrankungen mit oft gleichzeitig vorliegenden Störungen der Augen, der Nieren oder des Herzens, was auf Ähnlichkeiten der Proteinstrukturen zurückgeführt werden kann, wie zum Beispiel das Cogan-Syndrom (Malekpour et al., 2007). Eine häufige Ursache für nicht-syndromale hereditäre Erkrankungen des Innenohres ist eine Mutation sogenannter *gap junction* Proteine (Scott and Kelsell, 2011).

Pränatal erworbene Ursachen, welche nicht genetisch manifestiert sind, umfassen beispielsweise Röteln- oder Cytomegalievirusinfektionen, Medikamententoxizitäten oder Alkoholmissbrauch in der Schwangerschaft. Eine perinatale Hypoxie kann eine weitere Ursache für einen Innenohrschaden darstellen.

Erworbene Ursachen schließen Lärmschädigungen oder ototoxische Medikamente wie Aminoglykosidantibiotika ein. Weitere Gründe stellen beispielweise der Morbus Menière, eine Resorptionsstörung der Endolymphe, die Meningitis oder die Presbyakusis, eine altersbedingte Degeneration des Corti-Organ, dar. Auch die Schädigung des Hörnervs durch ein Vestibularis-Schwannom, ein benigner Tumor der Schwannzellen, kann eine Ursache der sensorineuralen Schwerhörigkeit sein.

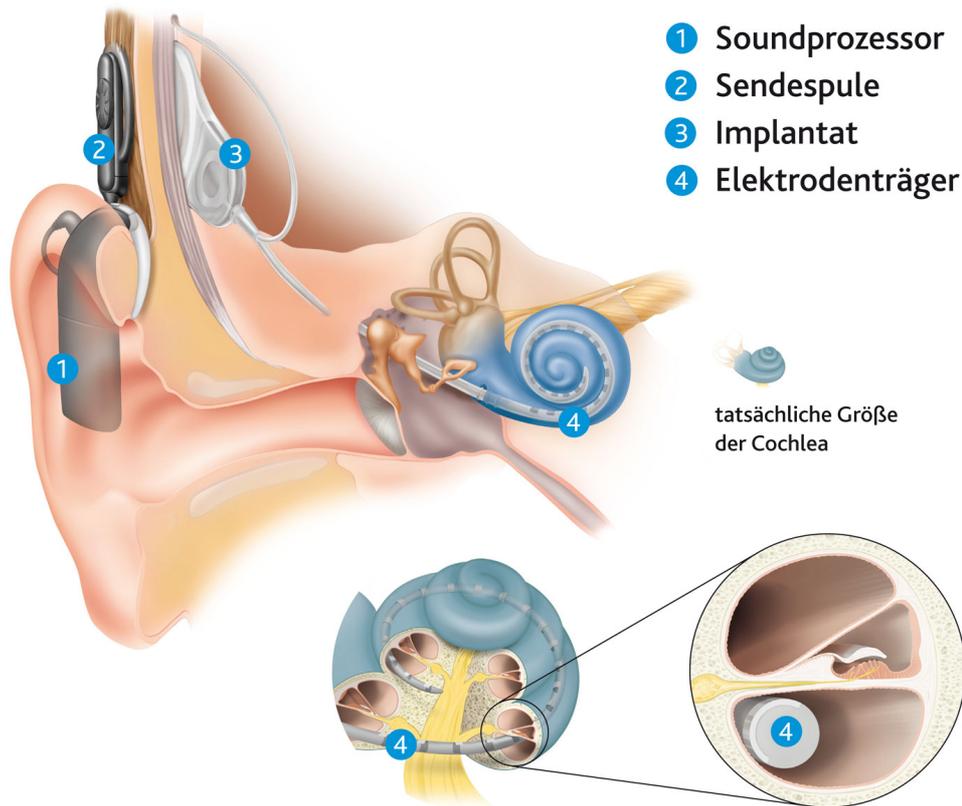
Die Pathophysiologie der Haarzellschädigung unterscheidet sich je nach auslösendem Faktor. Bei der Presbyakusis kommt es beispielsweise durch vaskuläre oder metabolische Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus zu einer Degeneration des Corti Organ (Fetoni et al., 2011). Lärmschädigungen des Ohres führen über die Bildung reaktiver Sauerstoff- (*reactive oxygen species*, ROS) und Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) zur Bildung freier Radikale, die eine Haarzellschädigung auslösen und eine Apoptose einleiten können (Greenlund et al., 1995; Ohinata et al., 2000). Während cochleäre Schädigungen ausgelöst durch Durchblutungsstörungen zum vollständigen Untergang der Haarzellen führen, verläuft die Schädigung bei

degenerativen Prozessen langsamer. Die verschiedenen genetischen Syndrome können zeitlich stark variierende Verläufe bewirken (Spoendlin, 1975).

Der Hörnerv kann eine primäre Schädigung der Hörnervenfasern oder eine sekundäre Schädigung derselben nach vorausgegangenem Haar- oder Stützzelluntergang erleiden. Eine primäre Degeneration des Hörnervs ist auch ohne vorausgegangene Schädigung des Corti-Organs möglich. Auslöser für eine primäre Schädigung können beispielsweise eine Presbyakusis (Pauler et al., 1986) oder eine infektiös bedingte plötzliche Ertaubung sein (Ishii and Toriyama, 1977). In der Folge der Schädigung der Haarzellen (Bredberg et al., 1965) oder der Stützzellen (Suzuka and Schuknecht, 1988) kommt es zur retrograden, sekundären Degeneration der Hörnervenfasern (Otte et al., 1978; Spoendlin, 1983). Hierbei korreliert das Ausmaß der Schädigung der inneren und äußeren Haarzellen mit dem Grad der konsekutiven Schädigung des Hörnervs. Basale cochleäre Abschnitte sind schwerer betroffen und zeigen zuerst Degenerationserscheinungen, während bei fortschreitender Zeit auch apikale Bereiche geschädigt werden. Bei einer schweren Schädigung des Corti-Organs sind Typ-II-Neuronen, welche mit den äußeren Haarzellen in Verbindung stehen, primär betroffen (Zimmermann et al., 1995). Es wird angenommen, dass bei einer Lärmschwerhörigkeit eine massive Freisetzung des Transmitters Glutamat an den Synapsen der inneren Haarzellen zu einer Schädigung der Dendriten führt (Puel et al., 1998).

### **1.3.2 Indikationen für Cochlea-Implantate**

Im Gegensatz zu peripheren motorischen und sensiblen Neuronen regenerieren Spiralganglienzellen nach nervaler Degeneration von selbst nicht in einem klinisch ausreichenden Ausmaß (Roberson and Rubel, 1994). Cochlea-Implantate (CI) werden seit Anfang der 70er Jahre klinisch eingesetzt. Sie sind operativ implantierte elektronische Innenohrprothesen, die den Hörnerven direkt stimulieren und somit eine Funktionseinschränkung oder ein Ausfall des Innenohres teilweise kompensieren können (Lenarz, 1998). Ein Cochlea-Implantat besteht grundsätzlich aus vier Teilkomponenten. Ankommende Schallwellen werden von dem externen Sprachprozessor (Soundprozessor, 1 in Abb.1.3) aufgenommen und in einen digitalen Code übersetzt. Die digitalen Signale werden durch eine in der Kopfhaut verankerten Sendespule (2 in Abb. 1.3) transkutan an das Implantat (3 in Abb. 1.3) mit der Empfangsspule übertragen, welches im Schädelknochen liegt. Das Implantat dekodiert die ankommenden Signale und leitet sie auf den in der Scala tympani liegenden Elektodenträger (4 in Abb. 1.3) weiter. 12-22 Elektroden entlang der Scala tympani reizen die Basilarmembran an verschiedenen Abschnitten und ahmen so die Tonotopie des gesunden Innenohres nach (Boenninghaus and Lenarz, 2006). Der Umfang degenerierter Spiralganglienzellen hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effektivität implantierter Cochlea-Implantate (Blamey et al., 1996).



**Abb. 1.3 Cochlea-Implantat System mit intracochleärem Elektroenträger in der Scala tympani (Nucleus® Cochlear Implant System, Cochlear GmbH & Co.KG)**

Eine grundsätzliche Indikation für die Implantation eines Cochlea-Implantats besteht für postlingual (nach dem Spracherwerb) ertaubte und resthörige Kinder, Jugendliche und Erwachsene. In ausgewählten Fällen ist eine Implantation bei prälingual (vor dem Spracherwerb) tauben Erwachsenen gegeben. Bei prälingual tauben und perilingual (während des Spracherwerbs) ertaubten und resthörigen Kindern besteht die Indikation für eine möglichst frühzeitige Implantation innerhalb der ersten Lebensjahre. Es gibt keine Altersgrenze für die Indikationsstellung (AMWF S2k-Leitlinie „Cochlea-Implantat Versorgung und zentral-auditorische Implantate“, AMWF Register-Nr.: 017-071). Ein weiterer möglicher Indikationsbereich ist die Behandlung von einseitiger sensorineuraler Hörminderung mit ipsilateral starkem Tinnitus, welcher durch elektrische Stimulation reduziert werden kann (Van de Heyning et al., 2008). Bei einer beidseitigen CI-Indikation sollte für ein besseres Sprachverstehen sowie eine bessere Schalllokalisation auch eine beidseitige Implantation durchgeführt werden (Laszig et al., 2004).

Für eine sichere Indikationsfindung ist eine umfangreiche präoperative Diagnostik wichtig. Sie umfasst neben der Erhebung des allgemeinen und speziellen Hals-Nasen-

Ohren-Status die Ton- und Sprachaudiometrie, die Optimierung einer bestehenden Hörgeräte-Versorgung, objektive Hörprüfungen wie beispielsweise die Messung der TEOAE (transitorisch evozierte otoakustische Emissionen) und die BERA (*brainstem evoked response audiometry*), eine Labyrinthfunktionsprüfung, eine neuroradiologische Diagnostik in Form einer hochauflösenden Felsenbein-Computertomografie und eine hochauflösende Kernspintomografie von Schläfenbein und Kleinhirnbrückenwinkel. Wichtig ist weiterhin eine begleitende psychologische und logopädisch-phoniatrische Versorgung (AMWF S2k-Leitlinie „Cochlea-Implantat Versorgung und zentral-auditorische Implantate“).

### **1.3.3 Einflussfaktoren einer erfolgreichen Hörrehabilitation**

Nach einer anforderungsgerechten Indikationsstellung und der operativ erfolgreichen Implantation eines CI haben verschiedene Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf eine erfolgreiche Hörrehabilitation.

Grundsätzlich korreliert eine höhere residuale Anzahl an Spiralganglienzellen mit einem besseren Outcome im Sinne eines besseren Sprachverständnisses und besseren Ergebnissen in der audiometrischen Untersuchung (Incesulu and Nadol, 1998; Nadol et al., 1989). Eine prädiktive Wertigkeit im Falle postlingual ertaubter Erwachsener besteht bei der präoperativen Dauer der Ertaubung, dem erhaltenen Sprachverständnis, der Resthörfähigkeit, den kognitiven Fähigkeiten sowie der Kooperationsbereitschaft der Patienten (Gantz et al., 1993). Für Kinder mit einem Ertaubungsbeginn unter 3 Jahren zeigt sich eine eindeutige Verbesserung der späteren Lesefähigkeit bei frühzeitiger CI-Implantation vor einem Alter von 42 Monaten (Archbold et al., 2008).

Ein wichtiger protektiver und neurotropher Einflussfaktor für die verbliebenen Spiralganglienzellen ist die regelmäßige elektrische Stimulation und somit eine frühzeitige Implantation bei residualen Hörnervenanteilen (Hartshorn et al., 1991; Lousteau, 1987).

Für den postoperativen Rehabilitationserfolg hat eine anschließende multimodale und multidisziplinäre klinische Basis- und Folgetherapie eine entscheidende Bedeutung. Die Basistherapie beinhaltet die Optimierung der Einstellung des Sprachprozessors, hör- und sprachtherapeutische Maßnahmen, eine psychologische Betreuung sowie technische und audiometrische Kontrollen. Die anschließende Folgetherapie hat zum Ziel, eine optimierte Anpassung des Sprachprozessors zu erreichen und den

Trainingserfolg zu überwachen (Ernst et al., 2009, AMWF S2k-Leitlinie „Cochlea-Implantat Versorgung und zentral-auditorische Implantate“).

## **1.4 Neurotrophe Faktoren und ihre Funktionen**

### **1.4.1 Überblick und Bedeutung im Innenohr**

Neurotrophine gehören zu der Familie der Wachstumsfaktoren und sind Proteine, die für die neuronale Entwicklung, die zielgerichtete Verknüpfung von Synapsen, die zelluläre Proliferation und Differenzierung sowie auch für Regenerationsvorgänge und die Apoptose relevant sind.

Auf der Grundlage ähnlicher struktureller und funktioneller Charakteristika werden die bekannten Wachstumsfaktoren in verschiedene Familien eingeteilt. Dazu gehört die Familie der Nervenwachstumsfaktoren, NGFs (*nerve growth factor*), die unter dem namensgebenden Protein unter anderem die Neurotrophine BDNF, NT-3 und NT-4/5 beinhaltet. Weitere für die vorliegende Arbeit relevante Familien von Wachstumsfaktoren sind die *fibroblast growth factor*- (FGF) und die *epidermal growth factor* (EGF)- Familie. Die Familie der Nervenwachstumsfaktoren bindet an zwei in ihrer Affinität und Spezifität gegenüber den einzelnen Mitgliedern verschiedenen Transmembranrezeptoren. Zum einen binden alle Neurotrophine mit einer geringen Affinität an den p75-NTR (Neurotrophinrezeptor) Rezeptor aus der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie (Bothwell, 1995; Chao, 1994; Rodriguez-Tebar et al., 1991). Zum anderen stellen die Tyrosinkinase Rezeptoren *tropomyosin-related kinase* Trk A, Trk B und Trk C Neurotrophin spezifische hochaffine Bindungspartner dar (Barbacid, 1994). Eine alleinige p75-NTR Bindung kann zu einer Apoptose führen (Frade et al., 1996). Die Aktivierung der Trk Rezeptoren wirkt antiapoptotisch, proliferativ und differenzierend (Barbacid, 1994; Huang and Reichardt, 2001). Verschiedene Konstellationen einer Koaktivierung von p75-NTR und Trk Rezeptoren durch die verschiedenen Neurotrophine können ebenfalls proliferative und differenzierende Effekte haben (Bothwell, 1995; Teng et al., 2010). Zielzellen können also durch die Regulation der Expression ihrer Rezeptortypen und deren Anzahl über ihren Fortbestand entscheiden.

In der Cochlea können vor allem BDNF und NT-3 nachgewiesen werden, wobei ihr Vorkommen vom Entwicklungsstand des Organs abhängig ist. Während die inneren und äußeren Haarzellen der Ratte nur in frühen Entwicklungsstadien BDNF

exprimierten, konnte NT-3 im Verlauf der embryonalen Entwicklung bis hin zum frühen Erwachsenenalter in größeren Konzentrationen gefunden werden (Fritsch et al., 1997; Wheeler et al., 1994; Ylikoski et al., 1993).

#### **1.4.2 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 im Innenohr**

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 1, auch *acidic fibroblast growth factor* genannt (aFGF, FGF-1), gehört zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. FGF-1 spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von verschiedenen Zellarten. Im adulten Organismus hat FGF-1 Einfluss auf die Proliferation, Migration und Regeneration von Zellen. Eine besondere Bedeutung hat der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 1 in der Angiogenese, der Wundheilung und der Tumorentstehung (Folkman and Klagsbrun, 1987; Klagsbrun, 1989; Nabel et al., 1993; Thomas, 1987). Als wichtiges Protein fungiert FGF-1 in der Neurogenese und der peripheren nervalen Regeneration (Trigg et al., 1998; Walter et al., 1993). Die von FGF-1 hochaffin gebundenen Rezeptoren sind die vier Tyrosinkinaserzeptoren FGFR1-4 sowie deren alternative *Splicing*-Varianten (Ornitz et al., 1996). Eine Besonderheit der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren besteht in ihrer Wirkungsverstärkung am Rezeptor bei Anwesenheit von Proteoglykanen, Heparansulfaten und Glykosaminoglykanen, die als niedrigaffine Korezeptoren wirken (Gimenez-Gallego et al., 1986; Ornitz et al., 1996; Thornton et al., 1983).

Trotz der Prädominanz von NT-3 und BDNF in der adulten Cochlea konnte nachgewiesen werden, dass andere neurotrophe Faktoren bei Applikation ähnlich protektive und regenerative Effekte haben (Gillespie et al., 2004; Ramekers et al., 2012).

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren wurden im Innenohr von Säugertieren gefunden. Sie tragen zur Entwicklung cochleärer Stützzellen bei und ihre hochaffinen Rezeptoren wurden während der ersten postnatalen Tage in den cochleären Haarzellen nachgewiesen (Dazert et al., 1998). Das zeitgleiche Auftreten der Expression der Rezeptoren auf der Haarzelloberfläche und der Phase der synaptischen Verbindung zwischen Haarzellen und Spiralganglienneuriten weist darauf hin, dass FGF-1 zur Innervation der Sinneszellen beiträgt (Dazert et al., 1998). In der Embryonalzeit und in der adulten Cochlea ist FGF-1 sowohl in den Haarzellen als auch in den Spiralganglienzellen nachweisbar und wird nach der Schädigung von Haarzellen

verstärkt exprimiert (Lin et al., 1993; Luo et al., 1995; Pirvola et al., 1995). So kam es bei Versuchen an der Ratte und am Meerschweinchen nach Applikation von FGF-1 zu einem längeren Überleben, einer verstärkten Migration, einer erhöhten Dichte und einem verlängerten Auswachsen von Spiralganglienneuriten *in vitro* (Aletsee et al., 2000; Hossain and Morest, 2000; Miller et al., 2007).

### **1.4.3 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 im Innenohr**

Wie auch FGF-1 gehört der basische, oder Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (bFGF, FGF-2) zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. So spielt auch er eine Rolle in der embryonalen Entwicklung von Zellen sowie in der Differenzierung, Proliferation und Regeneration von verschiedenen Zelltypen (Klagsbrun, 1989). FGF-2 hat eine besondere Funktion im Rahmen des Knochenstoffwechsels und wird unter anderem von Adipozyten exprimiert (Kühn et al., 2012). Das Protein bindet an die hochaffinen transmembranären Fibroblasten-Wachstumsfaktoren 1-3 (FGFR1-3) mit Tyrosinkinaseaktivität sowie an die niedrigaffinen Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) (Grothe et al., 2006; Ornitz et al., 1996).

FGF-2 findet sich als ubiquitär vorkommender Wachstumsfaktor auch im nervalen Gewebe. Im peripheren Nervensystem unterstützt FGF-2 *in vivo* und *in vitro* das nervale Überleben und die Regeneration nach Nervenverletzungen und verstärkt das Wiederauswachsen geschädigter Neuriten (Grothe et al., 2006; Grothe and Nikkhah, 2001; Hossain and Morest, 2000; Unsicker et al., 1987). *In vitro* Untersuchungen der Cochleae von Ratte und Maus zeigten eine Verstärkung des Neuritenwachstums, der Migration und der Neuritenlänge unter Einfluss von FGF-2 (Hossain and Morest, 2000). Während der Neonatalperiode von Ratten wurde eine verstärkte FGF-2 Expression in den Haarzellen und den Spiralganglienzellen nachgewiesen (G. Després et al., 1991; Lin et al., 1993). Nach der experimentellen Durchtrennung von Spiralganglienneuriten war unter FGF-2 Einfluss *in vitro* ein verstärktes Neuritenlängenwachstum, eine stärkere Migration sowie eine erhöhte Zelldichte nachweisbar (Hossain et al., 1996; Hossain and Morest, 2000). Für FGF-2 zeigte sich weiterhin ein signifikanter protektiver Effekt für das Corti-Organ, wenn dieses vor ototoxischer Schädigung mit FGF-2 behandelt wurde. Hierbei überlebte ein größerer Anteil an äußeren Haarzellen und weniger Stereozilien wurden geschädigt (Low et al., 1996). Versuche an Zellkulturen aus Goldhamsterembryonen zeigten nach FGF-2 Applikation signifikant

vergrößerte Wachstumskegel auswachsender Neuriten, die sich mit reduzierter Geschwindigkeit fortbewegten. Die auswachsenden Axone hatten eine dreifach erhöhte Aufzweigungsrate. FGF-2 bewirkte außerdem eine veränderte Morphologie der Wachstumskegel im Sinne eines schnellen Entstehens von Filopodien innerhalb von Minuten (Szebenyi et al., 2001). Weiterhin zeigten Untersuchungen an FGF-2 überexprimierenden adulten Mäusen eine FGF-2 vermittelte Verbesserung der synaptischen Reorganisation nach cochleärem Schaden (D'Sa et al., 2007).

#### 1.4.4 Bedeutung von Neuregulin-1 im Innenohr

Neuregulin-1 (NRG-1) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF) und ist ein durch ein einziges Gen codiertes Protein, das durch verschiedene Promotoren und alternatives *Splicen* in mehr als 20 verschiedenen Isoformen vorkommt (Britsch, 2007; Falls, 2003). NRG-1 kommt unter anderem im Herzen, Brustdrüsengewebe und dem Nervensystem vor und kann proliferative, differenzierende, migratorische sowie apoptotische Prozesse induzieren (Buonanno and Fischbach, 2001; Falls, 2003; Pinkas-Kramarski et al., 1997). Die prädominante Isoform in Spiralganglien der Maus ist NRG-1 Typ III (Heermann and Schwab, 2013). Es vermittelt seine Wirkungen über die zu der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Familie gehörenden Rezeptortyrosinkinasen ErbB3 (Akronym für „avian erythroblastosis virus B oncogene“) und ErbB4 sowie indirekt über den als Korezeptor fungierenden ErbB2 (Citri et al., 2003; Linggi and Carpenter, 2006). Es sind zwei nach der transmembranären Proteinstruktur „EGF like domain“ benannte Isoformen von NRG-1, NRG-1 $\alpha$  und NRG-1 $\beta$ , bekannt. Während das Vorkommen der Domäne vom  $\alpha$ -Typ über eine physiologische Brustentwicklung entscheidet, ist der  $\beta$ -Typ für die regelrechte embryonale Genese von Nerven- und Herzmuskelgewebe verantwortlich (Falls, 2003; Li et al., 2002).

Neben der nervalen Differenzierung und Myelinisierung ist NRG-1 ein Schlüsselprotein in der frühen Phase der axonalen Regeneration und sorgt unter *in vitro* Bedingungen für ein verlängertes Auswachsen von Neuriten (Audisio et al., 2008; Geuna et al., 2007; Liu et al., 2011a; Reinhard et al., 2009). Im adulten Organismus sind Neureguline für den Erhalt der physiologischen Zellfunktion von peripheren Nervenzellen unentbehrlich (Esper et al., 2006a). Über das Vorkommen von Neuregulin-1 im Innenohr ist bisher wenig bekannt. Es wurde in Spiralganglienzellen gefunden während erbB2 und erbB3 von umgebenden Stützzellen des Cortiorgans exprimiert werden, sodass eine durch diese Moleküle vermittelte Interaktion anzunehmen ist (Stankovic et al., 2004).

## **1.5 Neurotrophine und Schwannzellen**

### **1.5.1 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 für das Schwannzellwachstum**

Die Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 in nicht-myelinisierenden Schwannzellen und ihre Signalmoleküle spielen eine Schlüsselrolle in der Strukturhaltung und Funktion von peripheren Nerven (Furusho et al., 2009). Versuche an den Innenohren von FGF1R/FGF2R-*knock out* Mäusen, bei denen diese Rezeptoren in den Schwannzellen deaktiviert wurden, aber in den Neuronen aktiv blieben, führten zu einer Verschlechterung der auditorischen Funktion sowie einer verminderten Myelinisierung der Spiralganglienzellen (Wang et al., 2009). FGF-1 stimuliert die zelluläre DNA Synthese und erhöht die Proliferationsrate und stellt somit ein potentes Mitogen für Schwannzellen dar (Chen et al., 1991; Davis and Stroobant, 1990). Versuche an kortikalen Neuronen der Ratte zeigten bei der Zugabe von FGF-1 zu kokultivierten Schwannzellkulturen in der Hälfte der Versuche ein vermindertes Absterben und eine verbesserte Regeneration von Neuriten, die allerdings in ihrer Anzahl begrenzt blieben (Guest et al., 1997). Weitere Versuche an kortikospinalen Axonen zeigten unter Zugabe von FGF-1 keine Verbesserung des Wachstums (Blits et al., 2000; Hiebert et al., 2002).

### **1.5.2 Bedeutung von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 für das Schwannzellwachstum**

Am proximalen Ende der nervalen Läsion stellen Schwannzellen die hauptsächliche Quelle für die Sekretion von FGF-2 und seiner Rezeptoren dar. Schwannzellen exprimieren FGF-2 und dessen Rezeptor FGFR1 (Timmer et al., 2003b). Im Falle eines neuronalen Kontaktes wird die Expression des FGFR1 stimuliert, was auf eine Rolle der Nervenfasern für die Rezeptorexpression auf den Gliazellen hinweist. Im Gegensatz dazu führt eine externe FGF-2 Applikation *in vitro* nicht zu einer Hochregulation dieses Rezeptors, was zeigt, dass FGF-2 selbst nicht zu einer autokrinen Stimulation fähig ist. FGF-2 könnte die Myelinisierung während der nervalen Regeneration also inhibieren (Grothe et al., 1996; Morgan et al., 1994). FGF-2 kann mitogen wirken und erhöht unter *in vitro* Bedingungen die Proliferationsrate von Schwannzellen im Innenohr (Chen et al., 1991; Hansen et al., 2001; Watabe et al., 1994). Versuche mit Ratten zeigten nach einer Implantation von FGF-2 sezernierenden Schwannzellen nach einer Nervenläsion

eine deutlich beschleunigte Nervenregeneration über lange Strecken, eine größere Anzahl regenerierter Axone und ein besseres motorisches und sensorisches Outcome nach axonaler Regeneration (Haastert et al., 2006; Timmer et al., 2003a). Auf der Seite des proximalen Nervenstumpfes zeigte sich bei FGF-2 überexprimierenden Mäusen eine verstärkte Proliferation von Schwannzellen und in der Folge eine verbesserte nervale Regeneration im Sinne einer erhöhten Anzahl wiederauswachsender Neuriten in der ersten Woche nach einer Läsion. Weiterhin führte die FGF-2 Überexpression zu einer verminderten Myelindicke der Nerven (Jungnickel et al., 2006).

### 1.5.3 Bedeutung von Neuregulin-1 für das Schwannzellwachstum

Neuregulin-1 beeinflusst die Entwicklung, das Überleben sowie die Proliferationsfähigkeit von Schwannzellen in einem entscheidenden Maß und kann bei einer Applikation *in vitro* eine Apoptose verhindern (Dong et al., 1995; Grinspan et al., 1996; Heermann et al., 2011). NRG-1-*knock out* Mäuse zeigten einen verspäteten Beginn der Myelinisierung peripherer Nerven, eine dünnere Myelinscheide und in der Folge auch einen verringerten axonalen Durchmesser. *In vitro* führte eine cAMP (cyclisches Adenosin Monophosphat) Aktivierung von NRG-1 von zu einem promyelinisierenden Signal für Schwannzellen von Mäusen (Arthur-Farraj et al., 2011). NRG-1 gehört zu den entscheidenden axonal sezernierten Proteinen, die die Entwicklung und das Überleben von Schwannzellen beeinflussen (Garratt et al., 2000). Während der Entwicklung glialer Zellen aus Vorläuferzellen der Neuralleiste gehören Neureguline zu den signalgebenden Molekülen für die Entwicklungsrichtung (Jessen and Mirsky, 2005, 2002). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die physiologische Apoptose bestimmter Schwannzellen während der neuralen Entwicklung durch die Applikation von Neuregulinen verhindert werden kann (Grinspan et al., 1996). Durch periphere Nerven sezernierte Neureguline verbessern die Motilität von Schwannzellen *in vitro* und tragen so indirekt zu einer optimierten nervalen Regeneration bei (Mahanthappa et al., 1996; Meintanis et al., 2001). Der von NRG-1 genutzte ErbB Signalweg fördert die Mitoserate, die Migrationsfähigkeit und somit die Kolonisation von Schwannzellen um die distalen, auswachsenden Nervenfasern, während eine pharmakologische Blockade der ErbB2/4 Rezeptoren *in vitro* zu einer reduzierten Proliferation führt und eine Apoptose induzieren kann (Hansen et al., 2001; Heermann et al., 2011).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems sind essentiell für die Entwicklung, den Erhalt und die Regeneration von Neuronen und deren Neuriten. Periphere axonale Schäden induzieren eine Wallersche Degeneration, die initial durch nicht-myelinisierende Schwannzellen begleitet wird. Schwannzellen können hierbei zurück zu einem unreifen Zustand dedifferenzieren und durch eine erhöhte Ausschüttung von neurotrophen Faktoren und extrazellulären Matrixmolekülen ein günstiges Milieu für das regenerative Neuritenwachstum schaffen. Im Innenohr ist die Rolle der Schwannzellen in Bezug auf eine mögliche Regeneration von Spiralganglienzellen bisher weitgehend unklar.

In den vorgestellten Untersuchungen wurden Spiralganglienzellkulturen aus 3-5 Tage alten Mäusen (C57/BL6) durch Hinzugabe verschiedener neurotropher Faktoren in mehreren Konzentrationsstufen modifiziert, um deren Einfluss auf die cochleäre Glia-Neuron-Interaktion zu untersuchen. Impulsive sowie repulsive Effekte der Wachstumsfaktoren wurden anhand der Wachstumsdichte und des Migrationsverhaltens der Neuriten und der Gliazellen ausgewertet.

Die Untersuchungen zeigten die mögliche Modulation nicht nur des Neuritenlängenwachstums, sondern auch der Glia-Neuron-Interaktion durch neurotrophe Faktoren *in vitro*. Hieraus könnten durch die induzierte Regeneration und den Erhalt des geschädigten Hörnervs neue Therapiestrategien zur optimierten Versorgung von Patienten mit Cochlea-Implantat abgeleitet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Feinwaage	ACJ 120-4M (KERN, Balingen)
Fluoreszenzmikroskop	BX 40 (Olympus, Tokio, Japan)
Inkubator	HERA cell 150 (Heraeus, Hanau)
Kamera	D 7000 (Nikon, Tokio, Japan)
Kühlschrank	TP 1410 (Liebherr, Bulle, Schweiz)
Operationsmikroskop	OPMI pico (Zeiss, Aalen)
Pipetten (1000µl, 100µl, 20µl, 10µl)	Reference (Eppendorf, Hamburg)
Präparationsbesteck	Karl Storz (Tuttlingen)
Sterile Werkbank	BSB 4 (Gelaire, Melbourne, Australien)
Tiefkühlschrank	GNP 2713 (Liebherr, Bulle, Schweiz)
Vortexer	TJT 864 (Heidolph, Schwabach)
Wärmeschrank	B 5042 (Heraeus, Hanau)

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
<i>Chamber slides 2x8-well</i>	Thermo Fischer (Waltham, USA)
Deckgläser 21 x 26 mm	Menzel (Braunschweig)
Falconröhrchen 15ml, 50ml	Cellstar, Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Petrischalen	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

### 2.1.3 Beschichtungen

Tabelle 2.3 Beschichtungen

Bezeichnung	Hersteller
Poly-D-Lysin Hydrobromid, P 6407	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laminin, L 2020	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 2.4 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Methanol 100%	VWR International (Radnor, USA)
Paraformaldehyd 4%	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin/ Streptomycin	Gibco (Waltham, USA)
<i>Mounting Medium</i> 4,6-Diamidin-2-Phenylindol <i>with</i> (DAPI)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

### 2.1.5 Puffer und Nährmedien

Tabelle 2.5 Verwendete Puffer und Nährmedien

Bezeichnung und Hersteller	Inhalt
<b>D-PBS 1x</b> (Gibco, Waltham, USA)	2,67 mM KCl 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137,93 mM NaCl 8,06 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH Bereich 6,7- 7,0
<b>DMEM</b> (Gibco, Waltham, USA)	6,15 g/l Glucose 25,03 mM HEPES Puffer; 3,97 mM L-Alanyl L-Glutamin Dipeptid; GlutaMAX™ Phenol Rot
<b>B 27® Supplement 50x</b>	Antioxidantien

(Invitrogen, Waltham, USA)	Insulin
	Vitamin A
<b>Blocking Lösung</b>	0,1% Polysorbat-20 (Tween-20)
(Dade Behring, Deerfield, USA)	1% Bovines Serumalbumin (BSA)
	10% <i>chicken</i> Serum
	D-PBS

### 2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.6 Verwendete Antikörper, Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-p75 NTR	Ziege	1:400	R&D Systems (Minneapolis, USA)
β-III Tubulin Antikörper	Maus	1:400	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Sekundärantikörper	Antigen	Verdünnung	Hersteller
anti-Ziege Alexa® 594	Ziege IgG	1:500	Invitrogen (Waltham, USA)
anti-Maus Alexa® 488	Maus IgG	1:500	Invitrogen (Waltham, USA)
DNA Fluoreszenz			Hersteller
<i>Mounting Medium</i> 4,6-Diamidin-2- Phenyindol <i>with</i> (DAPI)			Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

### 2.1.7 Neurotrophe Faktoren

Tabelle 2.7 Verwendete Neurotrophine

Bezeichnung	Synthese	Hersteller
FGF-1, F 5542	E.coli, rekombinant human	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FGF-2, F 0291	E.coli, rekombinant human	Sigma-Aldrich

---

NRG-1, $\beta$ 1, 396-HB-050	E.coli, rekombinant human	(St. Louis, USA) R&D Systems (Minneapolis, USA)
------------------------------	---------------------------	---

---

### 2.1.8 Tiermodell

Die durchgeführte Tötung zur Organentnahme wurde nach § 7a des Tierschutzgesetzes mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter der Projektnummer O/13/2010 und dem Thema „Interaktion von Spiralganglienzellen mit Gliazellen als Modell für Degenerations- und Regenerationsvorgänge des Hörnervs“ durchgeführt. Der Tierversuchskurs zum Erwerb des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde am 26.04.2013 in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf erfolgreich abgeschlossen. Für die vorliegende Arbeit wurden 3-5 Tage alte Mäuse beider Geschlechter des Inzuchtstammes C75BL/6 verwendet. Die trächtigen Mütter der Versuchstiere entstammten den Janvier Labs in Saint-Berthevin Cedex in Frankreich. Nach der Verbringung nach Düsseldorf wurden die Tiere in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben geboren. Die Dekapitation und Präparation erfolgte im Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf. Es wurden an insgesamt 19 Präparationstagen 128 Versuchstiere verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Beschichtung der gekammerten Zellkulturschalen

Für die Beschichtung der 2x8 Kammern messenden Zellkulturschalen (*2x8-well chamber slides* (Abb. 2.1, Tab. 2.2)) wurden zwei verschiedene Adhäsionsmoleküle verwendet. In einem ersten Schritt wurde das positiv geladene Polymer der Aminosäure Lysin, Poly-D-Lysin (Tab. 2.3), in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml und einer Menge von 170  $\mu$ l pro *well* auf die *chamber slides* verteilt. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die *wells* zweifach mit 250  $\mu$ l Dulbecco's

phosphatgepufferter Kochsalzlösung (D-PBS) gespült (Tab. 2.5). In einem nächsten Schritt wurde Laminin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix (Timpl et al., 1979), in D-PBS bis zu einer Endkonzentration von 5 µg/ml gelöst. Einer 12-stündigen Inkubationszeit bei 4°C folgte die 3-fache Spülung der *wells* mit 250 µl D-PBS je *well* und Spülvorgang. Abschließend wurde das D-PBS abgesaugt und die *wells* konnten zugedeckt (Abb. 2.1) trocknen.



**Abb. 2.1** 2 x 8 well chamber slide

### **2.2.2 Ansatz der Zellkultur**

Das Ansetzen des Mediums für die Spiralganglienzellen erfolgte am Tag der jeweiligen Präparation an der sterilen Werkbank (Tab. 2.1). Das Medium bestand aus *Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)* (Tab. 2.5), B-27 Supplement 50 x (Tab. 2.5), Penicillin/ Streptomycin 10.000U/ml (Tab. 2.4) sowie einem der Wachstumsfaktoren in der Konzentration von 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml für FGF-1 und FGF-2 bzw. 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml oder 200 ng/ml für NRG-1. Vor Zugabe des Wachstumsfaktors wurden 2 ml Medium für die Präparation in ein separates Falconröhrchen (Tab. 2.2) abgefüllt. Bei Durchführung der Kontrollkultivierung wurde dem Medium kein Wachstumsfaktor zugefügt. Bis zum Ende der Präparation und dem Einsetzen der Spiralganglienzellimplantate wurden die so vorbereiteten Falconröhrchen zusammen mit den beschichteten Platten im Wärmeschrank (Tab 2.1) bei 37 °C gelagert.

### **2.2.3 Mikrochirurgische Präparation**

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 128 Mäuse präpariert, wobei pro Maus zwischen 4 und 8 Explantate gewonnen werden konnten. Zur Präparategewinnung wurde den Mäusen am 3. – 5. postnatalen Tag nach Dekapitation mit Hilfe einer Präparationsschere (Tab. 2.1) das Innenohr herausoperiert. Nach der Dekapitation wurde zuerst die Haut des Schädels entfernt. Anschließend wurde der Schädel mit Ansatz im Foramen magnum in einem frontookzipitalen Schnitt halbiert und das Hirngewebe entfernt. Für die Präparation der Cochleae wurden die Schädelhälften in eine Petrischale (Tab. 2.2), gefüllt mit D-PBS zur besseren mikroskopischen Sicht sowie um eine Austrocknung zu verhindern, überführt. Es erfolgte daraufhin ein Wechsel des Präparationsbestecks (Tab. 2.1). Die weitere Präparation fand unter dem Operationsmikroskop (Tab. 2.1) statt. Die mikrochirurgische Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an Van De Water und Ruben sowie Sobkowicz (Sobkowicz et al., 1993; Van De Water and Ruben, 1971). Als Orientierungsstruktur für das Auffinden der Cochlea in der jeweiligen Schädelhälfte diente der Sinus petrosus inferior. Nach Herauspräparation des Felsenbeins aus der Schädelhälfte wurde das extrahierte Gewebe zur besseren Übersichtlichkeit in eine neue Petrischale mit D-PBS übertragen. Hier wurde der bei Mäusen dieses Alters noch nicht vollständig verknöcherte Canalis spiralis cochleae abgelöst. Anschließend wurde mit einer Pinzette zuerst die Stria vascularis und darauffolgend die Haarzellschicht von basal nach apikal abgezogen, sodass der Modiolus mit radiär herausragenden Spiralganglienzellen überblieb. In einem nächsten Schritt wurde auch die Spiralganglienzellschicht abgetragen. Der Modiolus wurde schließlich mit einem Skalpell in einem horizontalen Schnitt in 3-4 Stücke zerteilt und in das vorbereitete Präparationsnährmedium verbracht.

### **2.2.4 Kultivierung von Spiralganglienzellen**

Nach der Präparation aller Mäuse wurden die gestückelten Explantate unter mikroskopischer Kontrolle auf die beschichteten und vorgewärmten *chamber slides* gesetzt. Die Anzahl der Explantate pro Kammer variierte je nach Präparationserfolg und Anzahl beschichteter *chamber slides* und betrug zwischen 1 und 3 Explantaten pro Kammer, wobei darauf geachtet wurde, dass die Explantate sich nicht berühren. Aus dem Präparationsmedium wurden die Explantate einzeln mit einer feinen Pinzette in die

Kammern der *chamber slides* gesetzt. Nach einer kurzen Wartezeit von einigen Sekunden, die darauf abzielte, dass die Explantate gut an der Oberfläche hafteten, aber gleichzeitig nicht austrockneten, wurden mit einer Pipette (Tab. 2.1) 250 µl des vorbereiteten Nährmediums mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor in jede Kammer gegeben. Die befüllten *chamber slides* wurden abschließend für 72 Stunden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Tab. 2.1).

### 2.2.5 Fixierung und Immunfluoreszenz

Nach der Inkubationszeit von 72 Stunden wurde das Nährmedium abgesaugt und die Explantate wurden mit 200 µl D-PBS mit einer Einwirkzeit von 3 Minuten pro Kammer gespült. Hierbei war ein vorsichtiges Vorgehen wichtig, um ein Ablösen der Präparate vom Boden der Kammern zu verhindern. Danach wurden die Explantate mit Paraformaldehyd (PFA) (Tab. 2.4) fixiert. Hierzu wurden 200 µl einer frischen, in D-PBS gelösten 4%igen Paraformaldehydlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur in jedes *well* gegeben. Anschließend wurden die *wells* in zwei Durchgängen von 5 Minuten mit jeweils 200 µl D-PBS gespült. Die Explantate wurden anschließend mit 200 µl Methanol 100 % (Tab. 2.4) für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Nach dem vorsichtigen Absaugen des Methanols mit der Pipette trockneten die Präparate an der Luft. Um unspezifische Antikörper- und Proteinbindungen zu verhindern wurde in einem nächsten Schritt die *blocking solution* (Tab. 2.5) auf die Explantate gegeben (Hauri and Bucher, 1986). Diese bestand aus *chicken* Serum 10 %, Tween-20 0,1 %, bovinem Serumalbumin 1% sowie D-PBS. Ein Teil der *blocking solution* wurde für die Mischung mit den ersten Antikörpern in einem Falconröhrchen (Tab. 2.2) zurückbehalten. Nach der Aufteilung der *blocking solution* auf 120 µl pro *well* wurde eine Einwirkzeit von 30 Minuten abgewartet. Währenddessen wurden die ersten Antikörper in der zurückbehaltenen *blocking solution* gelöst. Es handelte sich bei den Primärantikörpern um anti-p75-NTR der Spezies Ziege in einer Verdünnung von 1:400 sowie um einen β-III Tubulin Antikörper der Spezies Maus in der gleichen Verdünnung (Tab. 2.6). Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die in *blocking solution* gelösten Primärantikörper mit 120 µl auf die *wells* verteilt und bei 4°C für 12-14 Stunden inkubiert. Es folgte dann die Zugabe der Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper im Dunkeln. Hierfür wurden die *wells* zunächst abgesaugt und zweimalig für 5 Minuten mit 200 µl D-PBS gespült. Bei den Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern

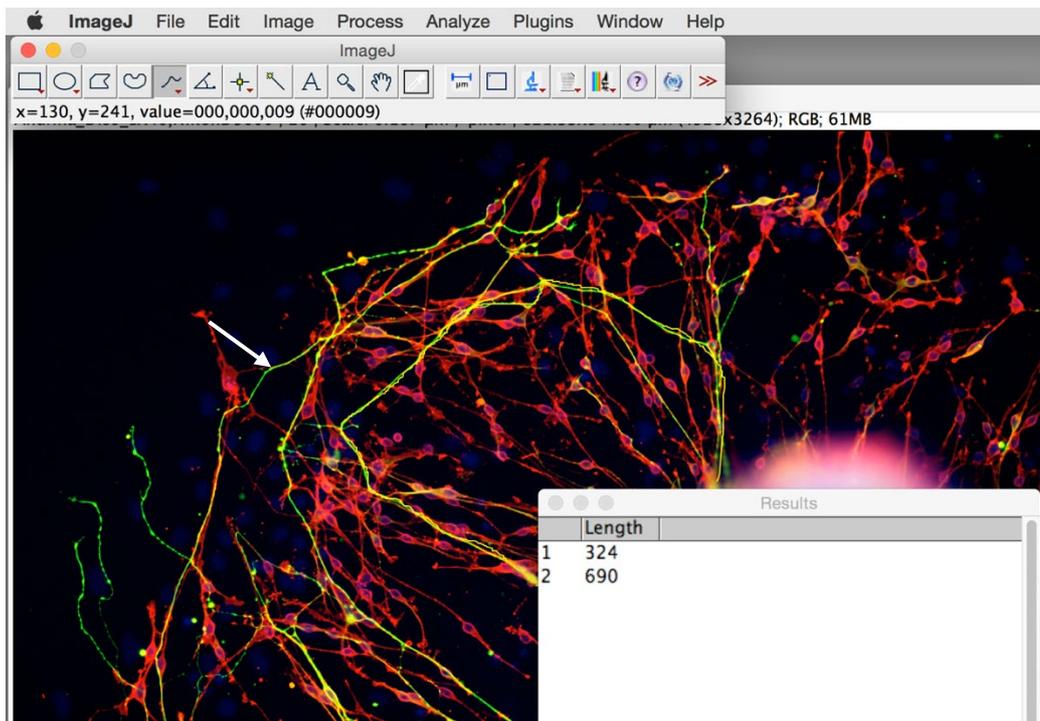
handelte es sich um Gammaglobuline (Immunglobulin G, IgG) anti-Ziege Alexa<sup>®</sup> 594 in einer Verdünnung von 1:500 sowie um IgG anti-Maus Alexa<sup>®</sup> 488 in der gleichen Verdünnung (Tab. 2.6). Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Antikörper in D-PBS gelöst, mit 120 µl auf die wells verteilt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Explantate zweimalig mit 200 µl pro well für 5 Minuten gespült. Schließlich wurden die Kammern der *chamber slides* entfernt. Abschließend wurden 7 µl *Mounting Medium* (DAPI) (Tab. 2.4) auf jedes Explantat gegeben und jeweils 4 Kammern wurden mit einem 21 x 26 mm messenden Deckgläschen (Tab. 2.2) bedeckt. Zur Fixierung der Deckgläschen auf dem Objektträger wurden die Kanten der Deckgläschen mit durchsichtigem handelsüblichen Nagellack punktwise betupft. Nach dem Abwarten einer Trocknungszeit von 10 Minuten konnten die Objektträger mikroskopiert werden. Die Lagerung der fixierten und gefärbten Präparate erfolgte bei 4°C in einer lichtundurchlässigen Box.

### **2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Dokumentation des Wachstumsverhaltens der Explantate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop vom Typ Olympus BX 40 (Tab. 2.1) in einem abgedunkelten Raum bei Rotlicht. Eine an das Okular angeschlossene digitale Spiegelreflexkamera des Typs Nikon D 7000 (Tab. 2.1) war manuell so einzustellen, dass das Explantat unter dem jeweiligen Fluoreszenzfilter möglichst scharf vor schwarzem Hintergrund abgebildet wurde. Hierzu mussten die Blende, die Belichtungszeit sowie die Empfindlichkeit des Kamerasensors angepasst werden. In einer 10-fachen Übersichtsvergrößerung wurde zuerst ein allgemeiner Eindruck über das Präparat gewonnen. Die genauere Abbildung des Verhaltens einzelner Neuriten und ihrer begleitenden Gliazellen wurde mit einer 20-fachen sowie einer 40-fachen Vergrößerung erreicht. Jede Einstellung wurde mit drei verschiedenen Filtern belegt und fotografisch dokumentiert. Der mit Alexa 594 besetzte Primäantikörper gegen den p75 NTR (Tab. 2.6) leuchtete rot auf. Von grün fluoreszierender Farbe war der mit Alexa Fluor 488 markierte Neuronen-spezifische Antikörper gegen  $\beta$ -III Tubulin (Tab 2.6). Schließlich markierte das am Ende der Immunfluoreszenz applizierte DAPI (mit *Mounting Medium*) (Tab. 2.6) die DNA haltigen Zellkerne in blau. Die gespeicherten Bilder wurden anschließend für die qualitative und quantitative Auswertung am Computer verwendet.

## 2.2.7 Vermessung der Spiralganglienneuriten

Auswachsende Spiralganglienneuriten wurden mit Hilfe des *open source* Programmes Image J Version 1.0 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) gemessen. Vor Beginn der Vermessung musste die Eingabe der Skalierung des Fluoreszenzmikroskops in Image J erfolgen und die jeweilige Vergrößerung angegeben werden. Mit dem Mauszeiger des Computers verfolgte man anschließend freihand die einzelnen Neuriten in ihrem Verlauf ab Austritt aus dem Präparat auf dem Bildschirm (Abb. 2.2). Zur besseren Erkennbarkeit einzelner Neuritenverläufe war es bei einigen Bildern nötig, die Farbbalance oder den Kontrast des Bildes mit Image J zu adjustieren. Von jedem Explantat wurden alle auswachsenden Neuriten gemessen. Im Falle einer oder mehrerer Aufzweigungen wurde der längste Hauptzweig verfolgt.



**Abb. 2.2** Screenshot einer digitalen Längenmessung der Spiralganglienneuriten. Per Mauszeiger wurde auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern mit Hilfe der Software Image J der Verlauf der Neuriten (Pfeil) nachgefahren. Nach Eingabe des Umrechnungsfaktors für  $\mu\text{m}$  pro Pixel konnte so die Länge der Neuriten gemessen werden.

### 2.2.8 Qualitative Auswertung

In einem weiteren Schritt wurde das Wachstumsmuster sowohl der Neuriten und der nicht-myelinisierenden Schwannzellen als auch ihrer Assoziation qualitativ ausgewertet. Hierzu wurden die Neuritenverläufe hinsichtlich ihrer Wachstumsform im Sinne eines Parallelverlaufs nebeneinander, einer Netzbildung untereinander oder und Assoziation zu begleitenden Gliazellen ausgewertet. Die nicht-myelinisierenden Schwannzellen konnten anhand der Zellmorphologie verglichen werden. So wie beispielsweise Unterschiede in der Form der Perikarya und deren Ausläufern, in ihrer Tendenz zur Kumulation und Überlagerung sowie in der Kommunikation der glialen Zellausläufer untereinander. Ein weiterer qualitativer Auswertungsaspekt war die Interaktion zwischen Neuriten und nicht-myelinisierenden Schwannzellen. Hier wurde die räumliche Assoziation der beiden Zelltypen im Sinne eines von Gliazellen begleiteten oder unbegleiteten Neuritenwachstums und die Lokalisation der Gliazellen beispielsweise an Neuritenaufzweigungen bewertet.

### 2.2.9 Auswertung und statistische Tests

Für die quantitative Auswertung der Neuritenlängen unter Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren in den jeweiligen Konzentrationsstufen wurde die Statistik- und Analysesoftware SPSS verwendet (IBM SPSS *Statistics*, Version 23, USA). Der Vergleich erfolgte sowohl zwischen den verschiedenen Faktoren und der Kontrolle als auch zwischen den Konzentrationsstufen eines Wachstumsfaktors. Zunächst wurde mittels Kolmogorow-Smirnow-Test festgestellt, dass die Daten signifikant von einer Normalverteilung abweichen und somit für die weitere Auswertung non-parametrische Testverfahren zur Anwendung kommen müssen. Von den Neuritenlängen wurden die arithmetischen Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die jeweiligen Standardfehler berechnet. Als non-parametrisches Pendant zu einer Varianzanalyse (ANOVA) wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Anschließend wurden als Post-hoc Tests Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, deren Signifikanzniveau einer Bonferroni-Korrektur unterzogen wurde. In einem weiteren Schritt wurde in gleicher Weise der Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktorkonzentrationen innerhalb einer Wachstumsfaktorgruppe untersucht. Ein p-Wert  $< .05$  wurde als signifikant, ein  $p < .001$  als hochsignifikant gewertet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Wachstum von Spiralganglienzellen unter Kulturbedingungen**

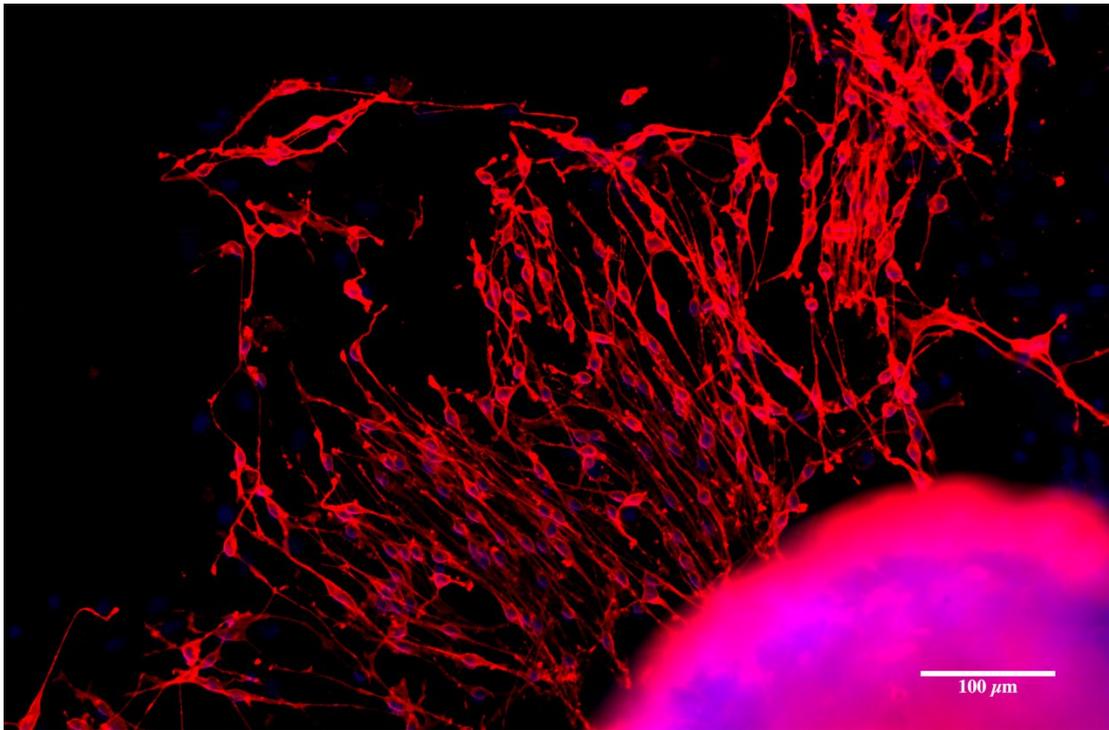
#### **3.1.1 Anzahl der Tiere und Präparate**

Insgesamt wurden 128 C75BL/6 Mäuse in einem Alter von 3 - 5 Tagen verwendet. Aus jeder Maus konnten 4 - 8 Explantate gewonnen werden, wobei es auch vorkam, dass ein Präparat bei der mikrochirurgischen Präparation beschädigt wurde. Insgesamt 120 Explantaten in Zellkultur wurde der Wachstumsfaktor FGF-1 zugegeben. Davon konnte bei 92 Explantaten unter FGF-1 ein Wachstum festgestellt werden, was einem Überleben unter Kulturbedingungen von 70,8% entspricht. Der Anteil der unter FGF-1 gewachsenen Präparate an der Gesamtzahl aller auf die Objektträger verbrachten Präparate betrug 27,1%. Unter FGF-2 wuchsen von 96 Explantaten 67 aus, dies bedeutet eine Überlebensrate von 69,8% und einen Anteil von 19,7% an der Gesamtzahl aller ausgewachsenen Explantate. NRG-1 hatte die höchste Überlebensrate von 79,9% (131 von 164) und einen Anteil an der Gesamtzahl aller ausgebrachten Explantate von 38,5%. Schließlich überlebten unter Kontrollbedingungen ohne Zugabe eines Wachstumsfaktors 74,6% (50 von 67) der Explantate und stellten einen prozentualen Anteil von 14,7% an der Menge aller ausgewachsenen Explantate.

#### **3.1.2 Allgemeine Zellmorphologie**

Unter allen Kulturbedingungen konnte ein Zellwachstum festgestellt werden, das sich je nach Wachstumsfaktor und dessen Konzentration sowie im Vergleich zu den Kontrollbedingungen deutlich hinsichtlich der Neuritenlänge, der Zellmorphologie verschiedener Zelltypen sowie dem Interaktionsmuster unterschied. Die verschiedenen sichtbaren Zelltypen waren Gliazellen, Neurone und selten Astrozyten sowie vereinzelt und nicht sicher zuordenbar Fibroblasten und andere nicht-neuronale Zellen. Fluoreszenzmikroskopisch war eine klare Abgrenzung des Explantatrandes von dem Bereich der unter Kulturbedingungen ausgewachsenen Neuriten und Gliazellen erkennbar. Das Auswachsen der Neuriten aus dem Explantat erfolgte zumeist in einem bis zwei Quadranten, was einer einheitlichen Ausrichtung der Spiralganglienzellen entspricht. Die Neuriten zeigten oftmals eine vom Präparaterand in die Peripherie laufende Wachstumsrichtung, in selteneren Fällen liefen sie auch parallel zum Präparat

oder wieder dahin zurück. Bei längeren Neuritenverläufen zeigten sich vermehrt Aufzweigungen. Allgemein zeigte sich ein starkes Gliazellwachstum unter allen Kulturbedingungen, oft auch ohne gleichzeitig auftretende Neuriten (Abb. 3.1). Die Gliazellen begleiteten die Neuritenverläufe über weite Entfernungen, blieben aber schließlich hinter den Neuritenausläufern zurück.

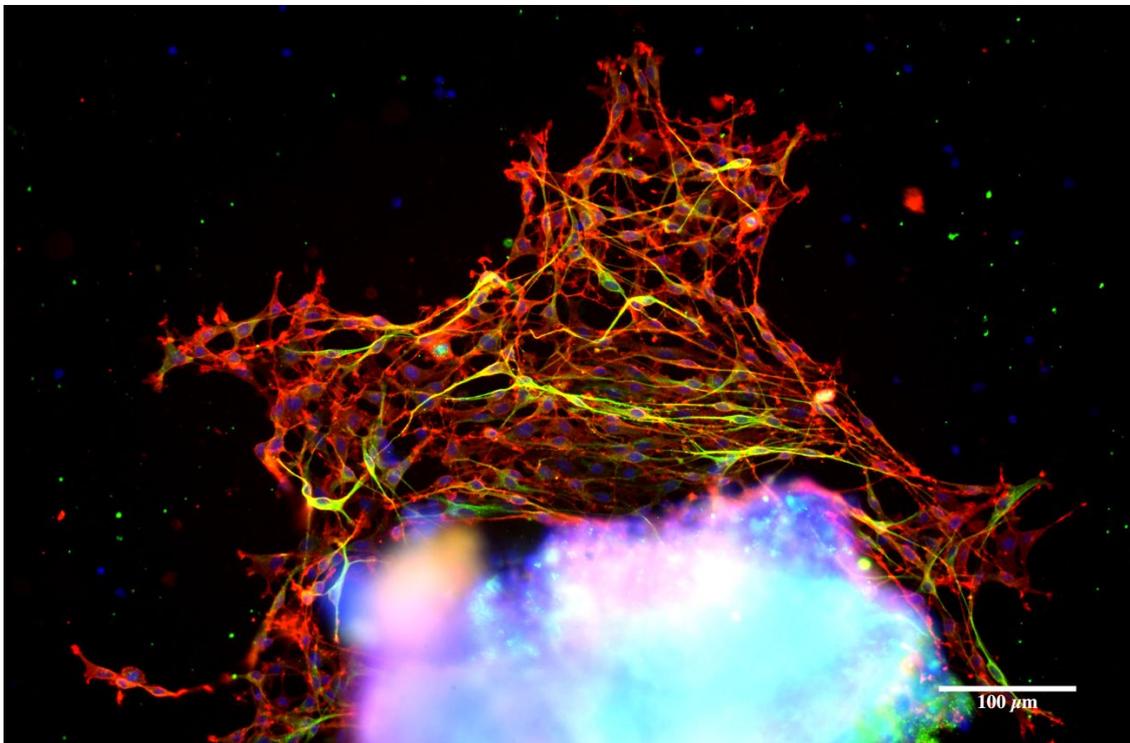


*Abb. 3.1 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzellexplantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (20 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Die rot gefärbten nicht-myelinisierenden Schwannzellen wachsen ohne begleitende Neuriten (grün) aus dem Explantat aus.*

## 3.2 Qualitative Analyse des Wachstumsverhaltens von Spiralganglienzellen und Gliazellen

### 3.2.1 Dichte Schwannzellvernetzung und kurze Neuriten unter dem Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-1

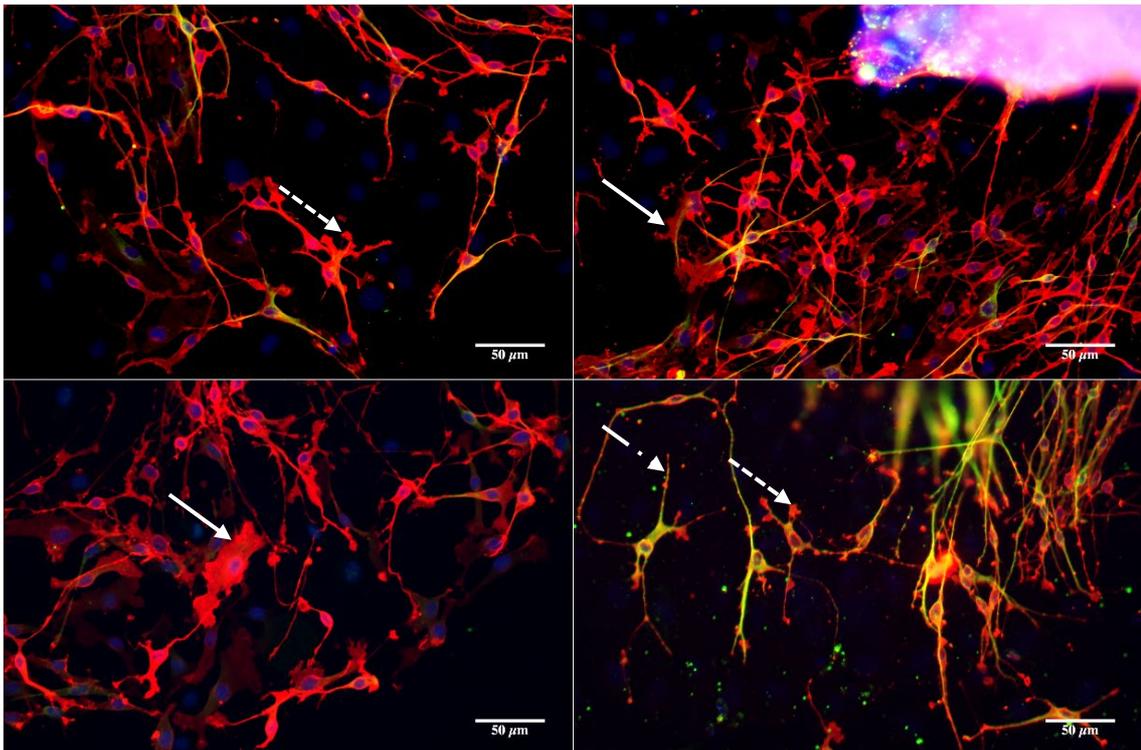
Nach Zugabe von FGF-1 zu den Spiralganglienzellkulturen zeigte sich in allen Konzentrationsstufen dieses Neurotrophins eine starke Netzbildung der aus dem Präparat migrierten Gliazellen. So war eine Tendenz zur Kumulation und Überlagerung sowie zu einer gitterartigen Anordnung der Zellen festzustellen (Abb. 3.2).



*Abb. 3.2 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-Explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (1 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Starke Netzbildung nicht-myelinisierender Schwannzellen am Beispiel FGF-1, 1 ng/ml. Nach Austritt aus dem Präparat zeigen die Gliazellen eine starke Zusammenlagerung mit einer hohen Zelldichte sowie die Tendenz des Aufeinander Zuwachsens.*

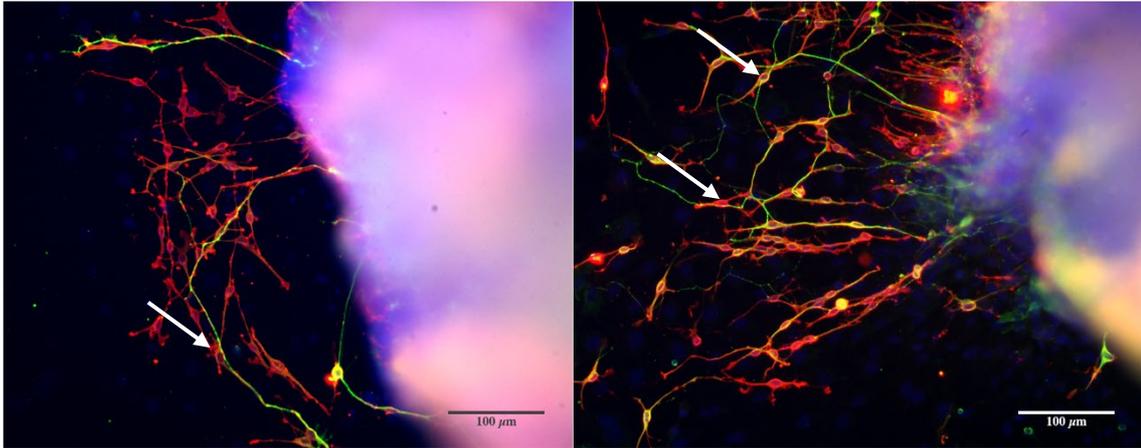
Zellmorphologisch zeigten sich flächige Perikarya der p75NTR positiven Zellen mit kurzen bis mittellangen (ca. 50  $\mu$ m) Ausläufern. Die glialen Zellausläufer stellten sich ebenfalls tendenziell verbreitert dar (Abb. 3.3). Eine relativ hohe Konzentration des

FGF-1 von 10 ng/ml zeigte keine deutliche Änderung in der Morphologie der Gliazellen im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen von FGF-1. Im Vergleich zu NRG-1 und der Kontrolle fielen bei den nicht-myelinisierenden Schwannzellen unter Einfluss von FGF-1 unter allen Konzentrationsstufen häufig drei bis vier radiäre Zellausläufer auf (Abb. 3.3).



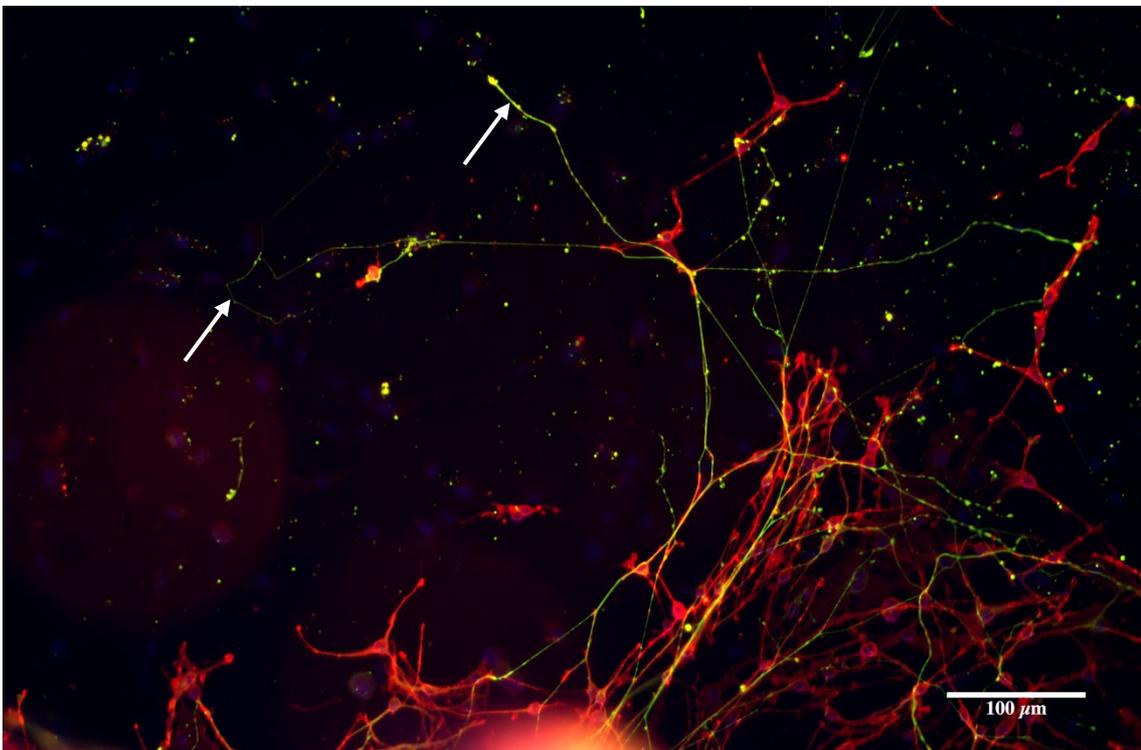
*Abb. 3.3 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (a, b, d: 5 ng/ml, c: 10 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). P-75 NTR positive Zellen mit flächigen Perikarya, kurzen Zellausläufern sowie breiten Zellausläufern unter FGF-1. Unter Einfluss von FGF-1 kommt es zu einer Verbreiterung der Zellkörper (Pfeile) und der Ausbildung kurzer bis mittellanger, oft drei- bis vierfacher Ausläufer (punkt-gestrichelter Pfeil) mit peripheren Aufweitungen (gestrichelte Pfeile). (a, b, d: 5 ng/ml, c: 10 ng/ml).*

In der Zusammenschau mit dem unter FGF-1 aufgetretenen Neuritenwachstum und dem Verhalten der nicht-myelinisierenden Schwannzellen fiel in den niedrigen Konzentrationsstufen von 1 ng/ml und 5 ng/ml eine enge Neurit-Glia-Assoziation auf. Auswachsene Neuriten wurden nach Austritt aus dem Explantat von Gliazellen eng begleitet, und nur selten kam es zu einem Auswachsen der Neuriten über das Gliazellniveau hinaus. Häufig war ein Schwannzellwachstum an Aufzweigungen der Neuriten zu beobachten (Abb. 3.4).



*Abb. 3.4 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (5 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Direkte Neuritenassoziation p75-NTR positiver Schwannzellen (Pfeile), FGF-1, 5 ng/ml.*

In der höchsten getesteten Konzentration von FGF-1 10 ng/ml wuchsen die Neuriten vermehrt auch über das Gliazellniveau hinaus (Abb. 3.5). Insgesamt aber bewirkte die Zugabe von FGF-1 im Vergleich zu FGF-2 und NRG-1 einen nur mäßigen Effekt auf das Neuritenlängenwachstum.

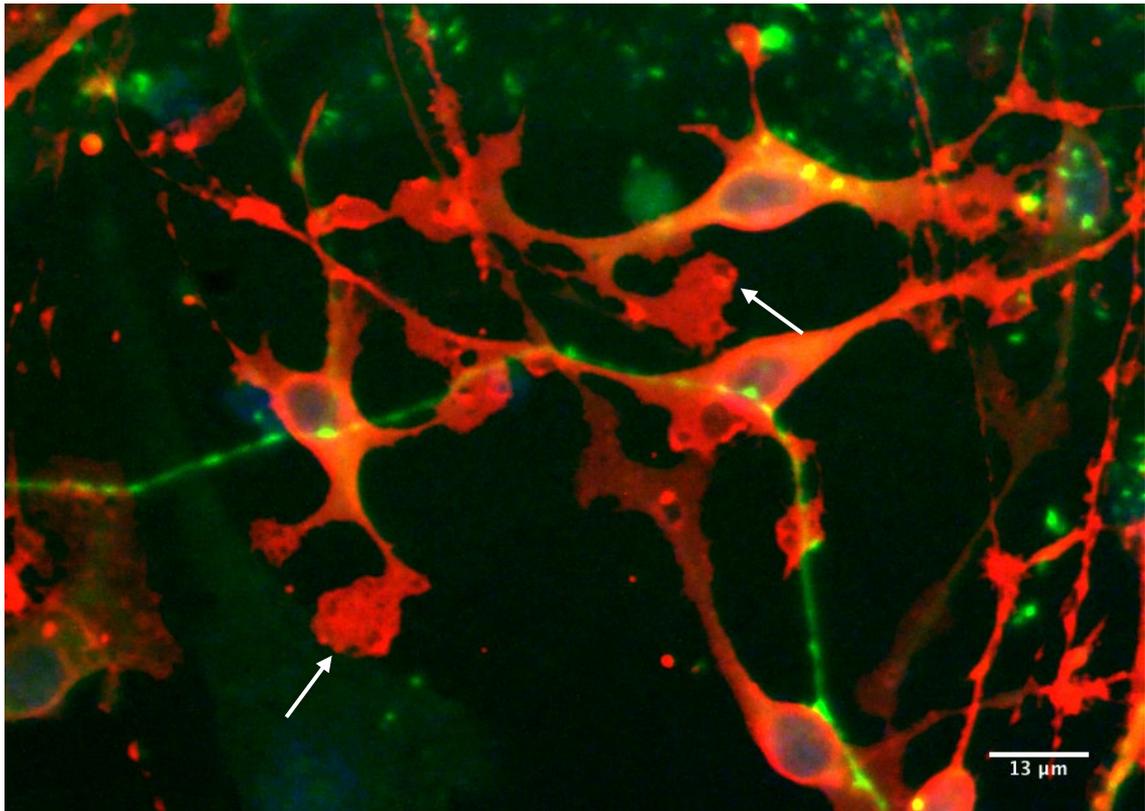


*Abb. 3.5 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (10 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende*

*Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Neuritenwachstum über Schwannzellniveau hinaus, FGF-1, 10 ng/ml (Pfeile).*

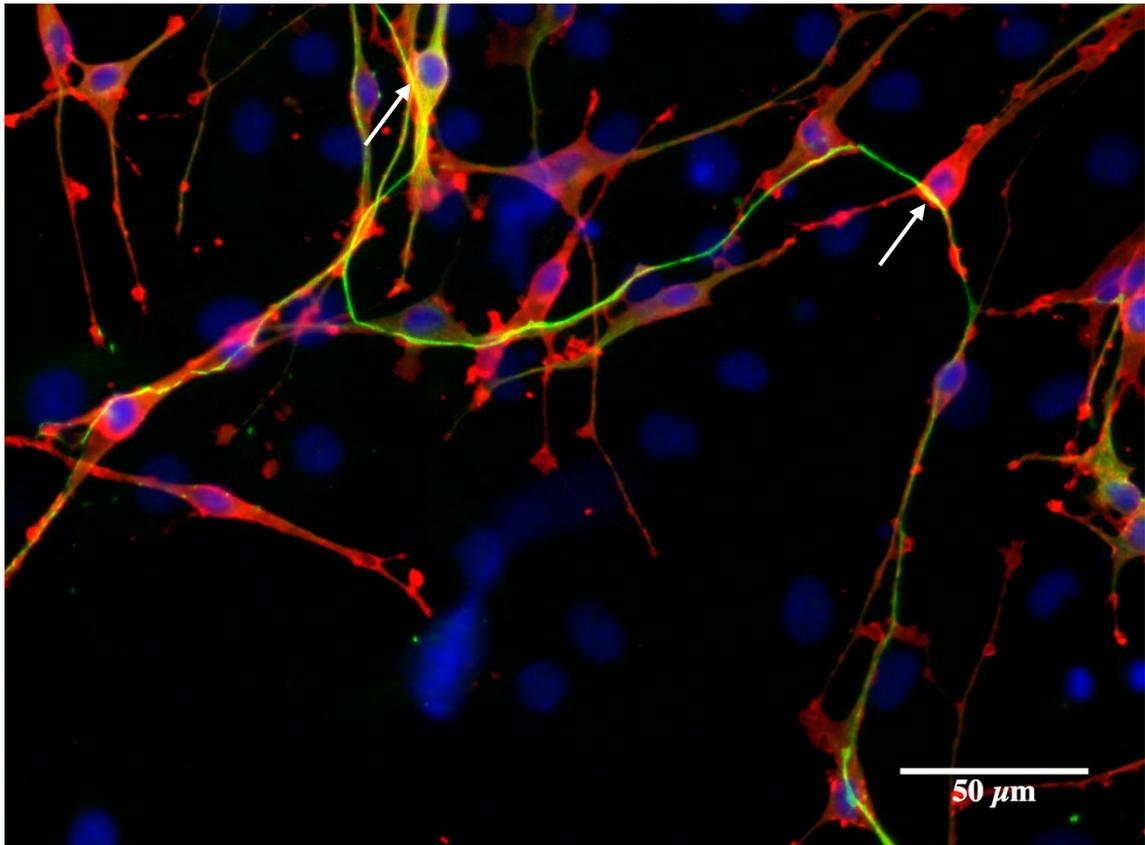
### **3.2.2 Reduziertes Gliazellwachstum bei verlängertem Neuritenwachstum unter dem Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-2**

Unter FGF-1 und FGF-2 zeigten die Gliazellen kürzere Zellausläufer und flächigere Perikarya im Vergleich zur Kultivierung mit NRG-1. Ein Wachstum in Faszikeln war typisch. Der Einfluss des Wachstumsfaktors FGF-2 bewirkte ein vermindertes Auftreten nicht-myelinisierender Schwannzellen im Vergleich zu den anderen Wachstumsfaktor-Gruppen. Ihre Anordnung stellte sich grobmaschig netzartig dar, und der Radius ihres Auswachsens blieb auf ca. 300 - 400  $\mu$ m ab Explantatrand begrenzt. Typisch waren flächige Perikarya mit zwei bis vier kurzen bis mittellangen Zellausläufern (ca. 60  $\mu$ m), an deren Enden oft deutlich breite Aufweitungen zu erkennen waren (Abb. 3.6).

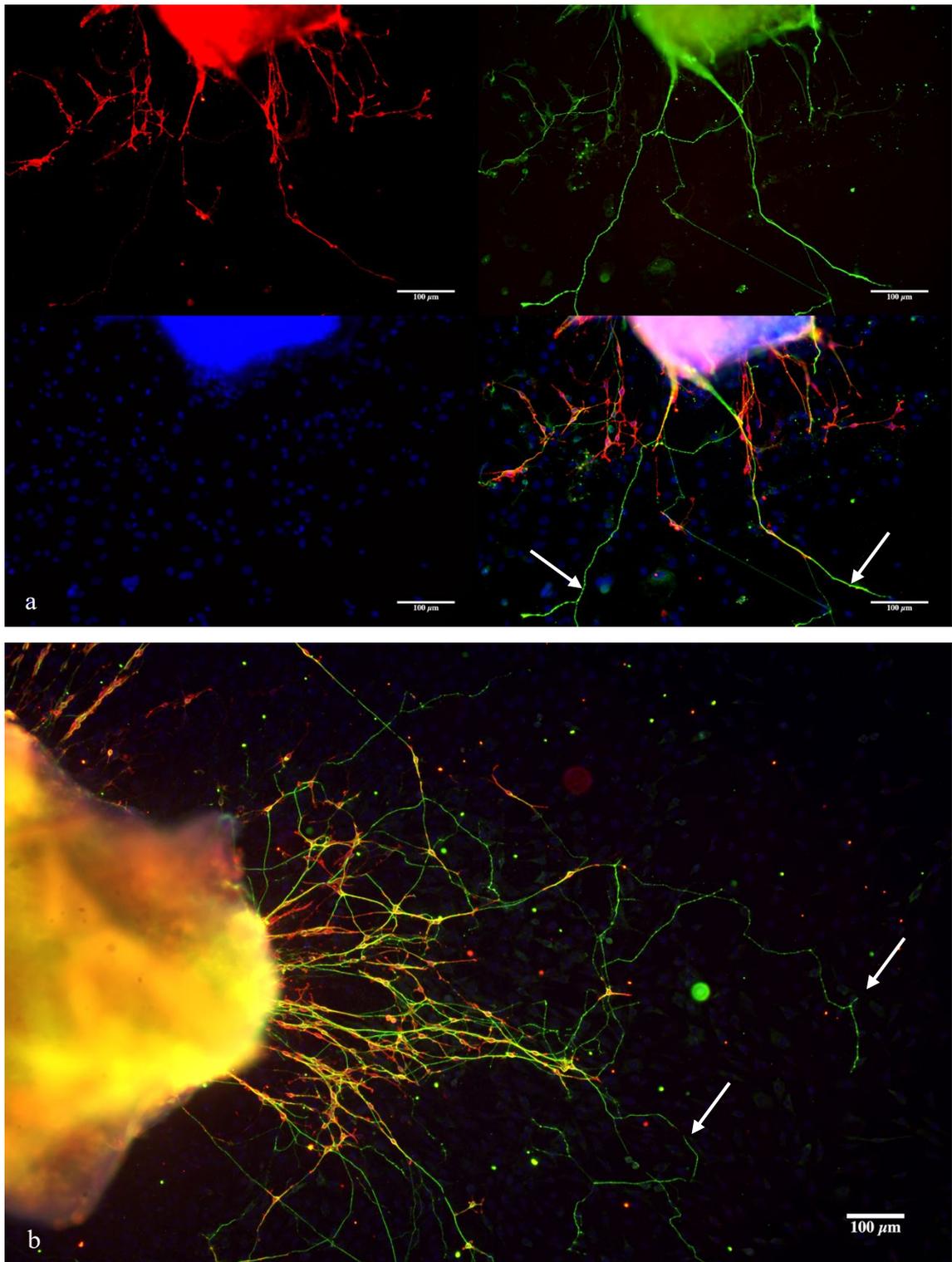


*Abb. 3.6 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzellimplantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-2 (5 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Flächige Perikarya und buschförmige Erweiterungen unter FGF-2, 5 ng/ml. Es zeigen sich breite Zellkörper, deren kurze bis mittellange Ausläufer in buschartigen Aufweitungen enden (Pfeile).*

Auswachsene Neuriten zeigten nur im Bereich des Explantataustritts eine räumliche Assoziation zu den Schwannzellen (Abb. 3.7, Abb. 3.8). Die Gliazellen schienen deutlich an einer Richtungsänderung der Neuritenverläufe beteiligt zu sein (Abb. 3.6, Abb. 3.7), da sie vermehrt an Neuritenaufzweigungen und peripheren nervalen Verläufen zu finden waren. In der niedrigsten angewandten Konzentration von 1 ng/ml blieben die Neuriten nahezu auf dem Radius der Gliazellen, während höhere Konzentrationen bis zu 10 ng/ml ein langstreckig unbegleitetes Neuritenwachstum begünstigten. Ab einer Konzentration von 10 ng/ml FGF-2 war ein deutlich längeres Neuritenwachstum im Vergleich zu niedrigeren FGF-2 Konzentrationen festzustellen. Die Morphologie und Verteilung der Gliazellen blieb bei der höheren Konzentration ähnlich. Auch an peripheren Aufzweigungen der Neuriten traten unter der höchsten Konzentration dann keine Schwannzellen mehr auf (Abb. 3.8 a, b).



*Abb. 3.7 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-2 (1 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Neuritenwachstum begleitet von nicht-myelinisierenden Schwannzellen unter FGF-2, 1 ng/ml. Der Neuritenverlauf wird anfänglich von sich anlagernden Schwannzellen begleitet, während sich die Zellkerne zumeist parallel zu den Neuriten darstellen. Auffällig ist auch die Schwannzell-assoziierte Richtungsänderung des Neuriten (Pfeile).*

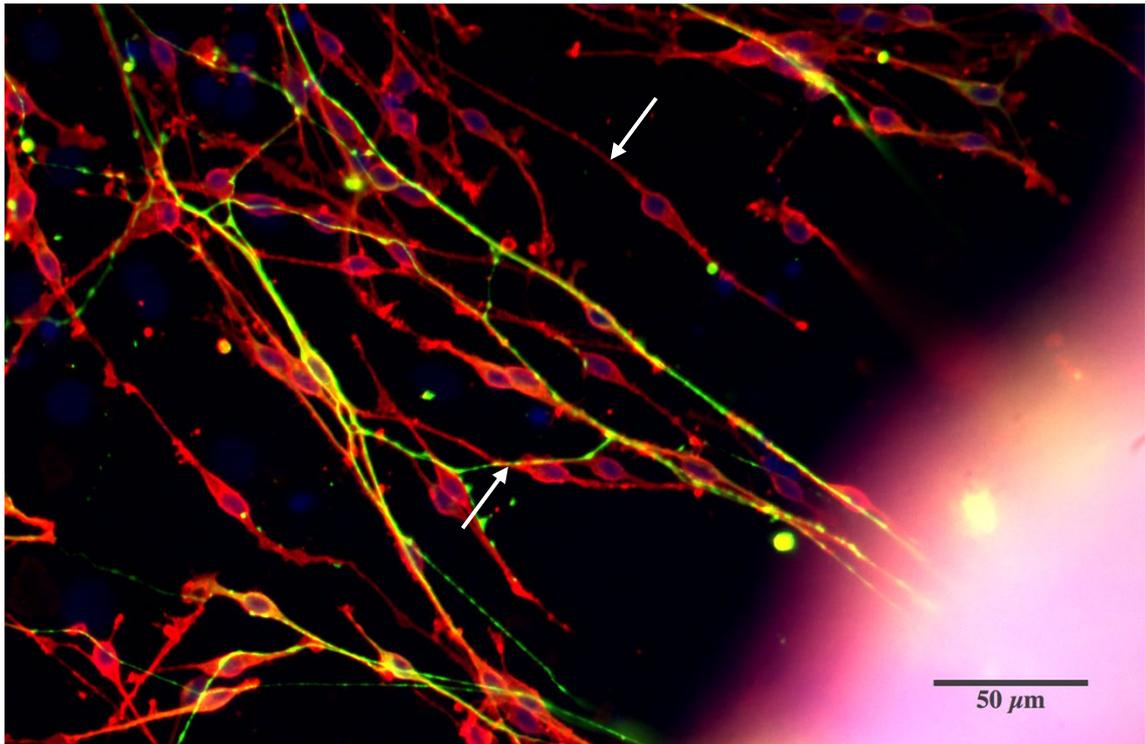


*Abb. 3.8 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-2 (5 ng/ml) (a) und FGF-2 (10 ng/ml) (b). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Unbegleitetes Neuritenwachstum nach anfänglicher Assoziation unter FGF-2 (5 ng/ml) (a) und FGF-2 (10 ng/ml) (b). Neben dem spärlichen Vorkommen netzartig angeordneter Schwannzellen in der Explantat-nahen Umgebung sind lange solitäre Neuritenverläufe zu erkennen (Pfeile).*

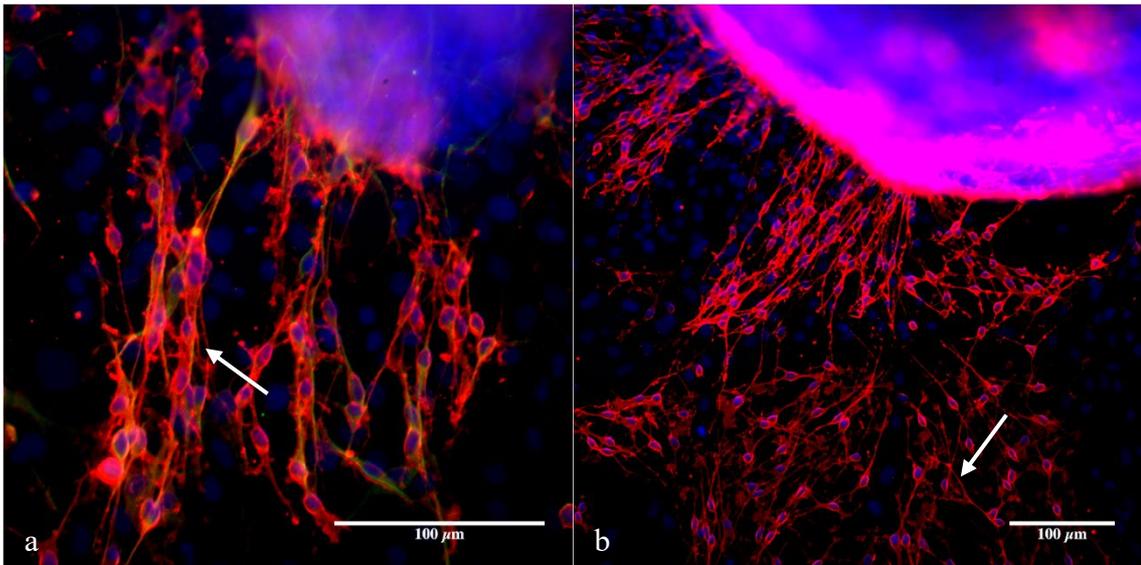
### **3.2.3 Erhöhte Gliazellmigration und vernetztes Neuritenwachstum unter dem Einfluss von Neuregulin-1**

Unter Einfluss von NRG-1 zeigten sich die längsten auswachsenden Neuriten. NRG-1 bewirkte weiterhin eine starke Vernetzung bei gleichzeitig geringerer Dichte der Schwannzellen. Die Morphologie der Schwannzellkörper unter NRG-1-Gabe war schmaler und die Ausläufer waren länger. Die Schwannzellen begleiteten in geringeren Konzentrationen regelmäßig die gesamte Strecke der Neuritenverläufe und waren oft an axonalen Aufzweigungen zu sehen. In den beiden höheren Konzentrationsstufen von NRG-1 kam es auch hier zu einem unbegleiteten Auswachsen der Neuriten bis weit über das Schwannzellniveau heraus.

Die Zugabe des Neurotrophins NRG-1 führte zu einem dichten, faszikulären Wachstum von nicht-myelinisierenden Schwannzellen. Die Zellkörper ordneten sich in der Nähe zum Explantat tendenziell parallel an (Abb. 3.1) während eine Vernetzung vermehrt in der Peripherie zu beobachten war. Es fielen schlanke Perikarya mit durchschnittlich zwei schmalen Zellausläufern auf (Abb. 3.9, Abb. 3.10 a, b). Die Ausläufer der Gliazellen waren mittellang bis lang (70 - 80  $\mu\text{m}$ ) (Abb. 3.11). Eine Änderung der Morphologie der Schwannzellen war auch bei hohen Konzentrationen des Wachstumsfaktors nicht festzustellen. Ein weiteres Merkmal war die verstärkte Schwannzellmigration in die Peripherie ab Explantataustritt unter Einfluss von NRG-1, die bei steigenden Konzentrationen von bis zu 200 ng/ml weiter zunahm. So war eine Migrationsstrecke von 600  $\mu\text{m}$  und mehr oft zu finden (Abb. 3.10 b).

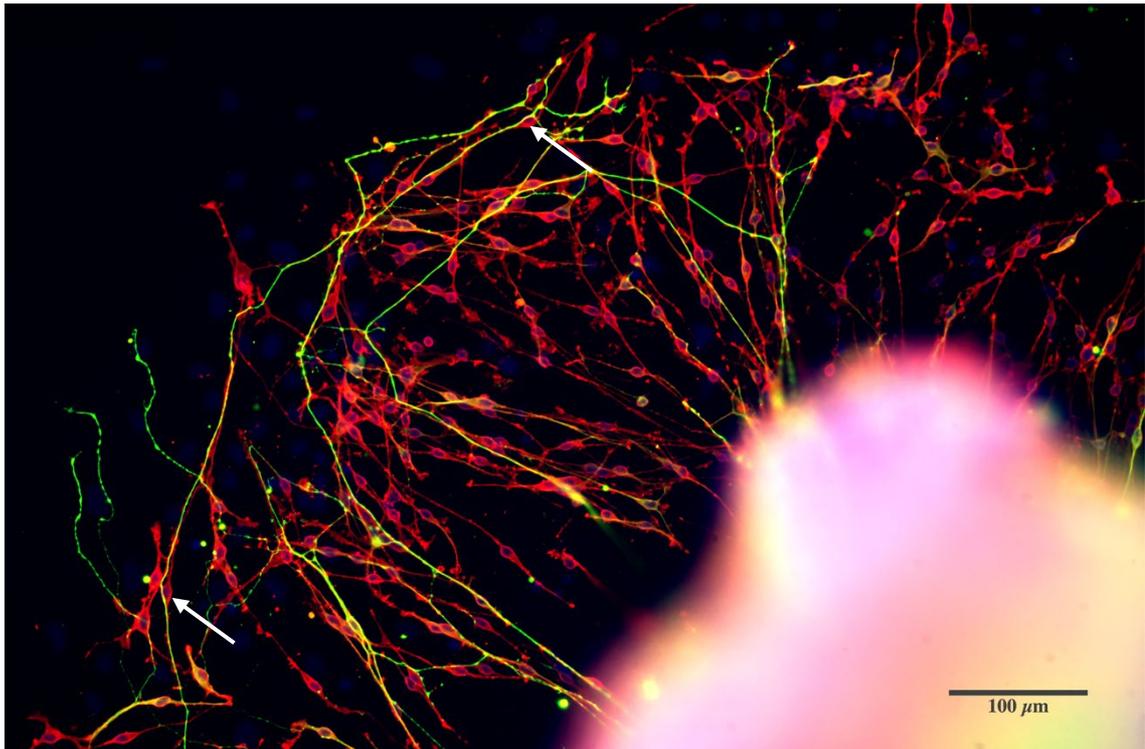


*Abb. 3.9 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (20 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Schlanke Perikarya mit schmalen, bipolar angeordneten Zellausläufern, NRG-1 20 ng/ml. Nicht-myelinisierende Schwannzellen bildeten unter NRG-1 durchschnittlich 2 schmale Zellausläufer, die auswachsenden Neuriten anliegen (Pfeile).*

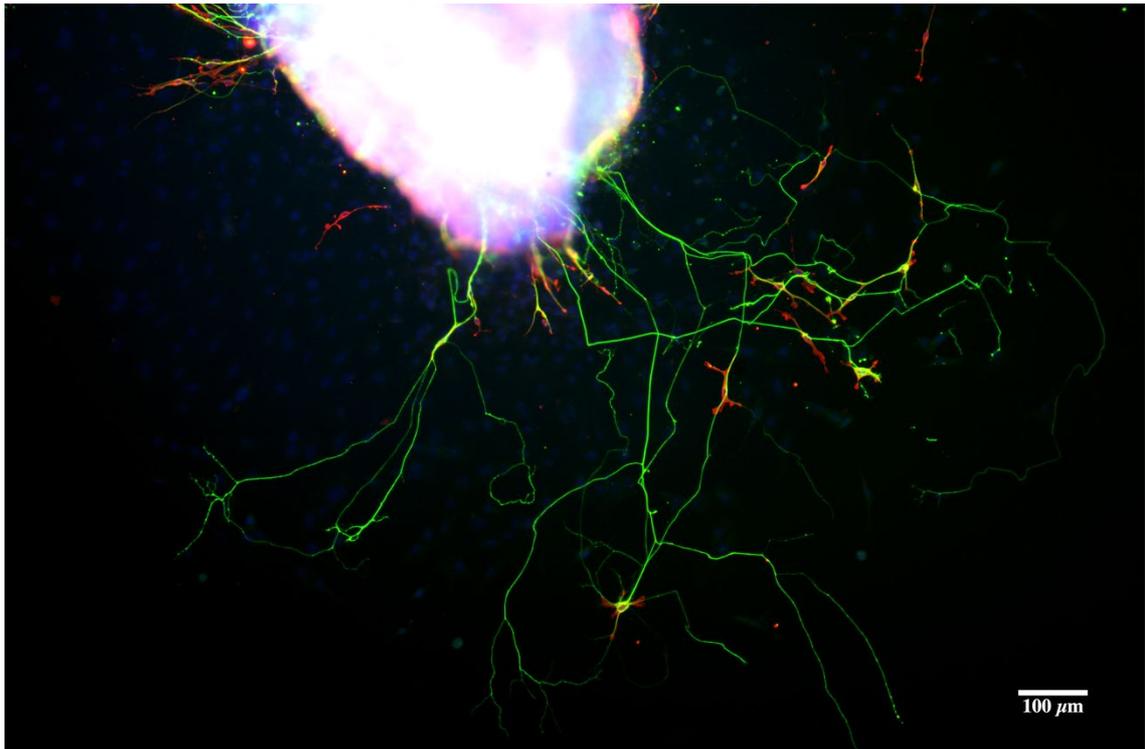


**Abb. 3.10 a, b Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (200 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Faszikulation von Schwannzellen mit Netzbildung in der Peripherie am Beispiel NRG-1, 200 ng/ml. Während in den zentralen Abschnitten eine typisch faszikuläre Anordnung der Schwannzellen mit filigranen Zellausläufern zu erkennen ist (Pfeil, a), stellen sich peripher netzartige Zusammenschlüsse dar (Pfeil, b).**

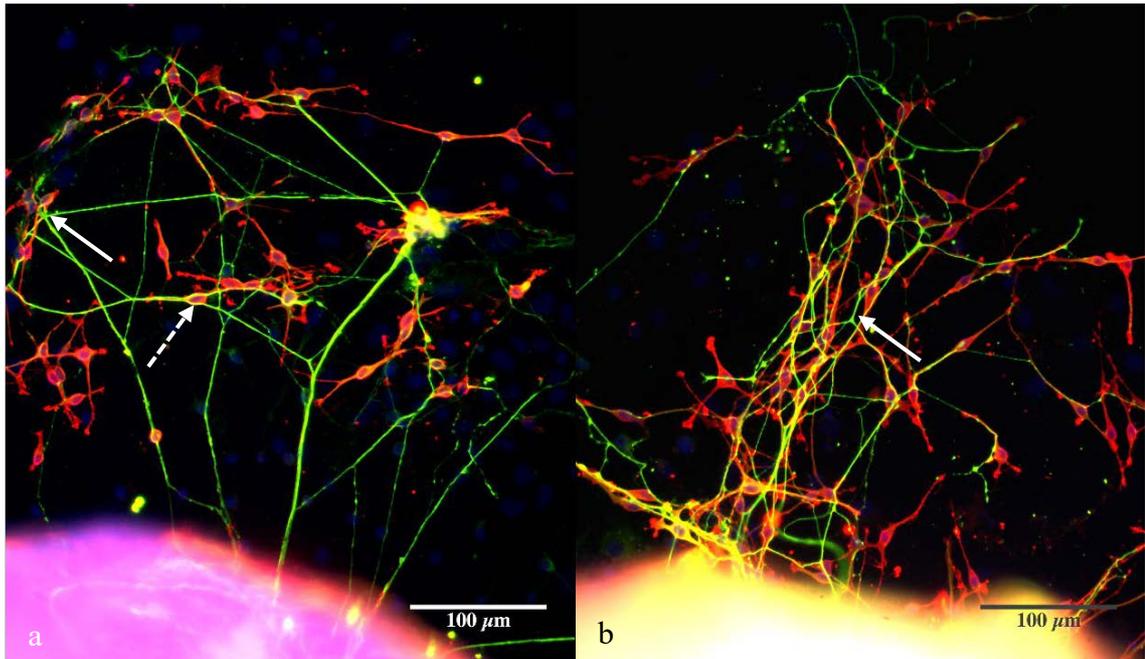
Im Hinblick auf die Schwannzell-Neurit-Interaktion war unter Einfluss von NRG-1 eine starke Assoziationstendenz auffällig. Auswachsende Neuriten waren über lange Strecken von nah anliegenden Schwannzellkörpern und -zellausläufern begleitet. Die Gliazellen schienen vor allem in den Konzentrationsstufen bis 100 ng/ml als Leitschiene für das Neuritenwachstum zu fungieren (Abb. 3.11), während ab einer Konzentration von NRG-1 200 ng/ml die Neuriten auch unabhängig von den Schwannzellen in die Peripherie wuchsen (Abb. 3.12). Eine weitere morphologische Auffälligkeit war die verstärkte Vernetzung der Neuriten. Zum einen zeigten die einzelnen Neuriten selbst vermehrte Aufzweigungen und zum anderen wuchsen die Neuriten untereinander verstärkt netzartig aufeinander zu. Die nicht-myelinisierenden Schwannzellen waren häufig an Aufzweigungen der Neuriten zu finden (Abb. 3.13 a, b).



*Abb. 3.11 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (20 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Starke Schwannzell-Neurit-Assoziation unter NRG-1, 20 ng/ml. Unter Einfluss von Neuregulin-1 zeigten sich die Schwannzellen als Leitschiene für das Neuritenwachstum bis weit in die Peripherie (Pfeile).*



*Abb. 3.12 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzellplantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (200 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Isoliertes Neuritenwachstum unter NRG-1, 200 ng/ml. Zu erkennen ist ein weitläufiges Auswachsen der Neuriten ohne begleitende Schwannzellen.*



**Abb. 3.13 a, b** Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (a: 50 ng/ml, b: 100 ng/ml). Markierung mit p75NTR (rot, nicht-myelinisierende Schwannzellen), DAPI (blau, Zellkerne) und  $\beta$ III-Tubulin (grün, Neuriten). Neuronale Netzbildung unter NRG-1 (a: 50 ng/ml, b: 100 ng/ml). Das gitterartige Wachstum war sowohl bei einzelnen Neuritenverläufen als auch untereinander festzustellen (Pfeile). Nicht-myelinisierende Schwannzellen fanden sich zudem oft an Aufzweigungen (gestrichelter Pfeil).

### 3.3 Quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens der Neuriten

#### 3.3.1 Längenwachstum der Spiralganglienneuriten

Unter Einfluss der verschiedenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren zeigten sich signifikante Unterschiede im Längenwachstum der Spiralganglienneuriten innerhalb der Gruppen und im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrollgruppe wuchs ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Zunächst wurde im Rahmen einer non-parametrischen Varianzanalyse durch einen Kruskal-Wallis-Test bei nicht normalverteilten Daten ein hochsignifikanter Effekt der zugegebenen Faktoren auf die Neuritenlänge ermittelt,  $\chi^2(3) = 152,5$ ,  $p < .001$ . Anschließende Post-Hoc-Analysen in Form von Paarvergleichen zwischen den verschiedenen Faktoren und der Kontrolle durch Mann-Whitney U-Tests erbrachten genauere Aussagen über die Unterschiede der mittleren Ränge kumuliert über alle Konzentrationsstufen in den 4 Gruppen (FGF-1, FGF-2, NRG-1, Kontrolle). Um eine Kumulierung des  $\alpha$ -Fehlers zu verhindern, ergab sich mittels Bonferroni-Korrektur für die Post-Hoc-Tests ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p < .0083$ . Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der Mittelwerte der Neuritenlängen in  $\mu\text{m}$  in den verschiedenen Konzentrationsstufen.

**Tabelle 3.1 Mittelwerte der Neuritenlängen in  $\mu\text{m}$  und Standardfehler in den verschiedenen Konzentrationsstufen**

<b>Faktor</b>	<b>Konzentration</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert Neuritenlänge (Standardfehler)</b>
FGF-1	1 ng/ml	52	152,0 (4,9)
	5 ng/ml	81	300,1 (12,9)
	10 ng/ml	40	524,0 (28,2)
FGF-2	1 ng/ml	29	147,4 (5,8)
	5 ng/ml	40	412,9 (37,3)
	10 ng/ml	40	900,1 (50,3)
NRG-1	20 ng/ml	62	414,1 (14,8)
	50 ng/ml	55	558,7 (14,9)
	100 ng/ml	53	666,7 (26,1)
	200 ng/ml	41	709,0 (35,5)
Kontrolle		76	329,6 (19,9)

*Tabelle 3.1 Mittelwerte der Neuritenlängen in  $\mu\text{m}$  und Standardfehler in den verschiedenen Konzentrationsstufen sowie der Kontrolle*

### 3.3.2 Mittelwertvergleiche innerhalb der Gruppen

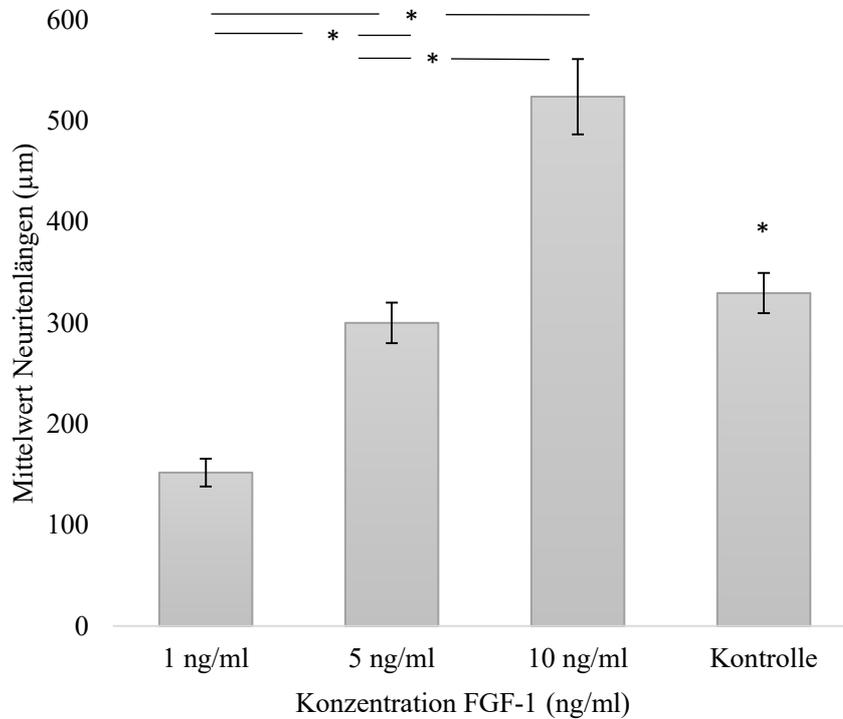
Die statistische Auswertung der Unterschiede zwischen den Neuritenlängen bei verschiedenen Konzentrationsstufen innerhalb einer Gruppe (FGF-1, FGF-2, NRG-1) erbrachte hochsignifikante Unterschiede. Für den Faktor FGF-1 war der Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen hochsignifikant,  $\chi^2(3) = 116,8$   $p < .001$ . Post-Hoc-Vergleiche zwischen den Konzentrationsstufen von FGF-1 von 1 ng/ml und 5 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml sowie 5 ng/ml und 10 ng/ml zeigten sich zu einem  $p < .001$  hochsignifikant unterschiedlich zueinander (Tab. 3.1, Abb 3.14). Auch die Kontrollgruppe unterschied sich signifikant zu den verschiedenen Konzentrationsstufen. Insgesamt war demnach unter FGF-1-Gabe bei steigender Konzentration ein längeres Auswachsen der Neuriten festzustellen, wobei die Konzentration von 1 ng/ml und 5 ng/ml kürzere Neuritenlängen bewirkte als die Kontrollgruppe.

Eine vergleichbare Tendenz zeigte sich nach Zugabe von FGF-2. Die Varianzanalyse zeigte auch hier hochsignifikante Längenunterschiede bei steigenden Konzentrationen mit Zunahme der Neuritenlänge unter Steigerung der Konzentration,  $\chi^2(3) = 78,7$ ,  $p < .001$ . Es konnten ebenfalls zwischen allen Konzentrationsstufen von FGF-2 sowie auch jeweils zur Kontrollgruppe hochsignifikante Längenunterschiede gemessen werden. Verglichen wurden 1 ng/ml und 5 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml sowie 5 ng/ml und 10 ng/ml (Tab. 3.1, Abb. 3.15). Bei Konzentrationen von 5 ng/ml und 10 ng/ml bewirkte FGF-2 im Vergleich zu FGF-1 in den identischen Konzentrationsstufen ein signifikant längeres Auswachsen der Neuriten mit Längen von bis zu 900  $\mu\text{m}$  unter FGF-2 10 ng/ml.

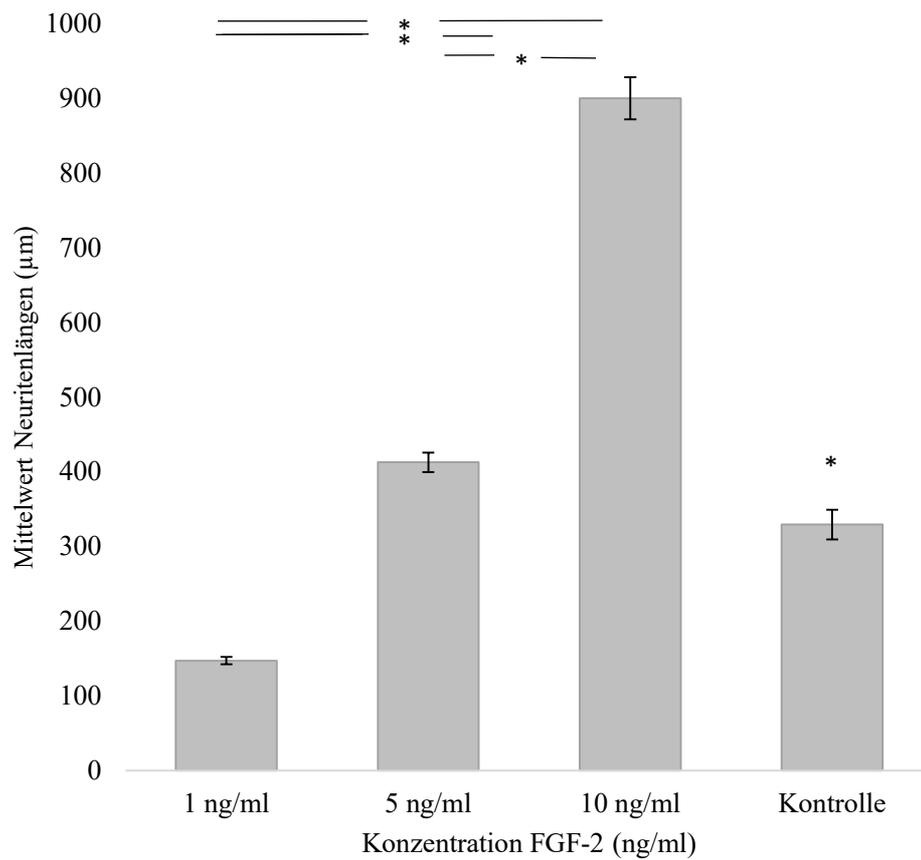
Schließlich zeigten die Neuritenlängen auch unter NRG-1 die beschriebene Tendenz, allerdings wurden bei sehr hohen Konzentrationen von 200 ng/ml im Vergleich zu 100 ng/ml keine signifikanten Längenzuwächse mehr beobachtet (Abb. 3.16). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationsstufen von NRG-1 ergab der Vergleich von 20 ng/ml mit 50 ng/ml,  $p < .001$ , von 20 ng/ml mit 100 ng/ml,  $p < .001$ , von 20 ng/ml mit 200 ng/ml,  $p < .001$ , von 50 ng/ml mit 100 ng/ml,  $p < .001$ , von 50 ng/ml mit 200 ng/ml,  $p < .001$ . Die Kontrollgruppe erwies sich als statistisch signifikant unterschiedlich zu allen gemessenen Konzentrationsstufen von NRG-1.

Der Vergleich zwischen den gleichen Konzentrationsstufen von FGF-1 und FGF-2 zeigte für 5 ng/ml,  $p < .001$  und für 10 ng/ml,  $p < .001$  hochsignifikante Unterschiede.

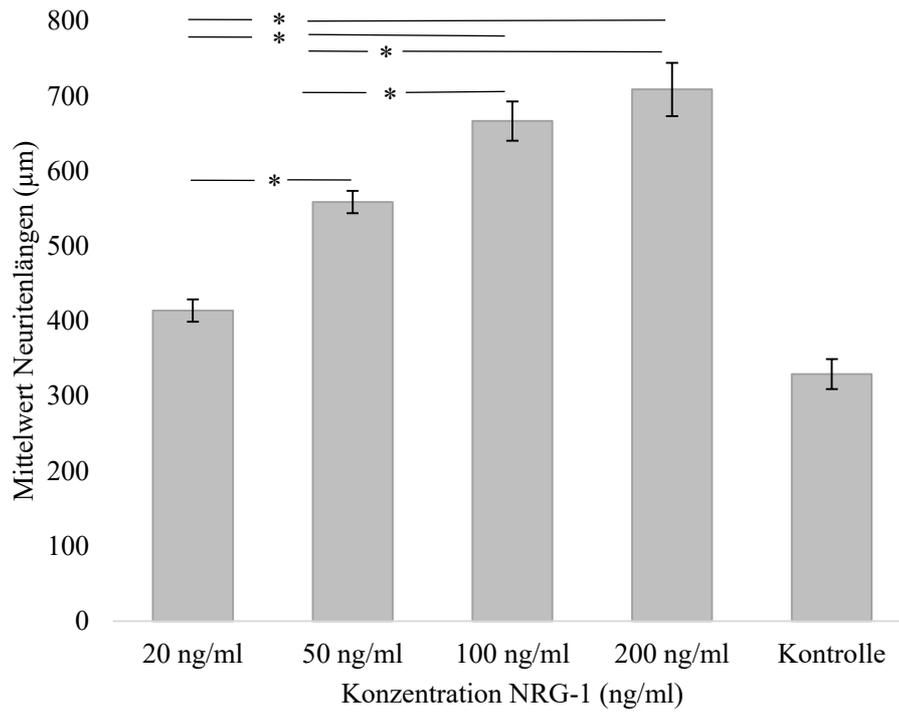
Bei einer Konzentration von 1 ng/ml unterschieden sich die Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2 statistisch nicht in Bezug auf die mittleren Neuritenlängen.



**Abb. 3.14 Mittelwerte der Neuritenlängen in µm und Standardfehler in verschiedenen Konzentrationsstufen unter Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 und in der Kontrollgruppe.** Zwischen allen Konzentrationsstufen und der Kontrollgruppe zeigten sich signifikante Längenunterschiede, „\*“ zeigt ein  $p < .001$ .



**Abb. 3.15 Mittelwerte der Neuritenlängen in µm und Standardfehler in verschiedenen Konzentrationsstufen unter Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 und in der Kontrollgruppe.** Zwischen allen Konzentrationsstufen sowie im jeweiligen Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich signifikante Längenunterschiede, „\*“ zeigt ein  $p < .001$ .



**Abb. 3.16 Mittelwerte der Neuritenlängen in µm und Standardfehler in verschiedenen Konzentrationsstufen unter Einfluss von Neuregulin-1 und in der Kontrollgruppe.** Mit Ausnahme des Vergleichs zwischen 100 ng/ml und 200 ng/ml zeigten sich zwischen allen Konzentrationsstufen und im jeweiligen Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede, „\*“ zeigt ein  $p < .001$ .

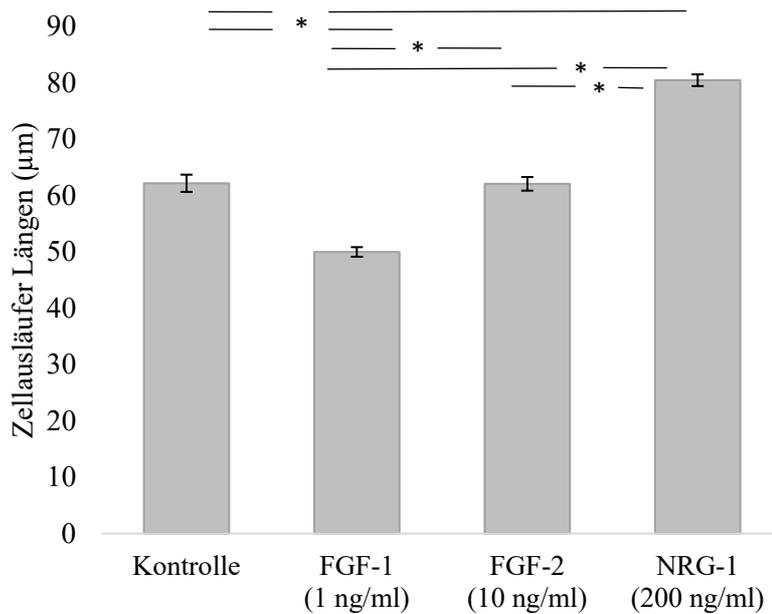
### **3.4 Quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens der nicht-myelinisierenden Schwannzellen**

#### **3.4.1 Länge einzelner Zellausläufer nicht-myelinisierender Schwannzellen**

Abhängig von dem zugegebenen Wachstumsfaktor zeigten nicht nur die auswachsenden Neuriten quantifizierbare Längenunterschiede sondern auch die begleitenden nicht-myelinisierenden Schwannzellen unterschieden sich messbar in ihrer Morphologie.

Die quantitative Auswertung der Länge der einzelnen glialen Zellausläufer, gemessen ab dem Verlassen des Perikaryons in die Peripherie, erbrachte hochsignifikante Längenunterschiede zwischen den einzelnen Wachstumsfaktoren und im Vergleich zur Kontrolle.

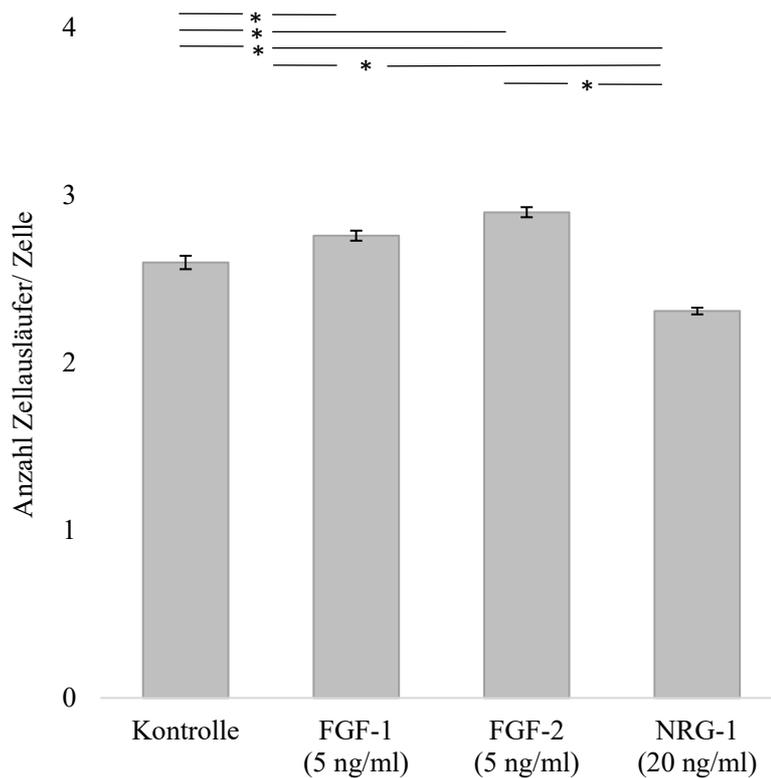
Die durchschnittlich längsten glialen Ausläufer waren unter NRG-1 200 ng/ml festzustellen ( $M = 80,5 \mu\text{m}$ ,  $SE = 1,0$ ). An zweiter Stelle folgte FGF-2 10 ng/ml mit mittellangen Aussprossungen ( $M = 62,1 \mu\text{m}$ ,  $SE = 1,2$ ), die fast genau der Länge der Kontrollgruppe entsprachen ( $M = 62,2 \mu\text{m}$ ,  $SE = 1,5$ ). Die kürzesten Ausläufer zeigten die nicht-myelinisierenden Schwannzellen unter Zugabe von FGF-1 1 ng/ml ( $M = 50,0 \mu\text{m}$ ,  $SE = 0,9$ ) (Abb. 3.17). Einzig der Paarvergleich zwischen FGF-2 und der Kontrolle ergab keinen signifikanten Unterschied in den Längen.



**Abb. 3.17 Mittelwerte der Längen glialer Zellausläufer in µm und Standardfehler nach Zugabe von FGF-1 1 ng/ml, FGF-2 10 ng/ml, NRG-1 200 ng/ml und in der Kontrollgruppe. Mit Ausnahme des Vergleichs zwischen FGF-2 10 ng/ml und der Kontrolle zeigten sich zwischen den Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede, „\*“ zeigt ein  $p < .001$ .**

### 3.4.2 Anzahl der Zellausläufer nicht-myelinisierender Schwannzellen

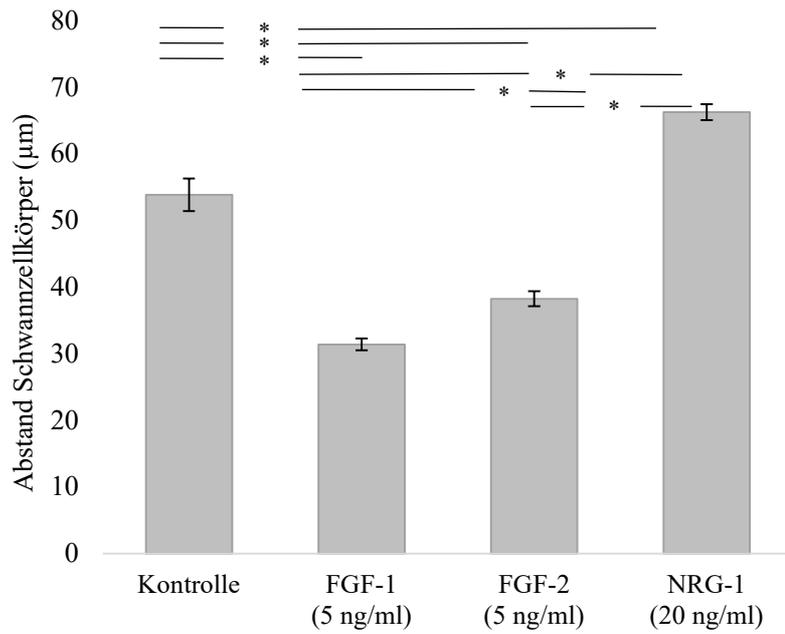
Die kultivierten nicht-myelinisierenden Schwannzellen zeigten unter den verschiedenen zugegebenen Wachstumsfaktoren Unterschiede in der Anzahl ihrer Zellausläufer. Der Kruskal-Wallis-Test war auch hier hochsignifikant,  $\chi^2(3) = 300,46$ ,  $p < .001$ . Die einzelnen Paarvergleiche in den Mann-Whitney-U-Tests waren alle hochsignifikant, nur der Vergleich der Gruppen FGF-1 und FGF-2 erbrachte keinen statistisch relevanten Unterschied in der Anzahl der Gliazellausläufer. Die Zugabe von NRG-1 20 ng/ml bewirkte die geringste Anzahl an Ausläufern ( $M = 2,31$ ,  $SE = 0,02$ ). An zweiter Stelle folgt die Kontrollgruppe ( $M = 2,60$ ,  $SE = 0,04$ ). Unter FGF-1 5 ng/ml zeigten sich durchschnittlich 2,76 Ausläufer pro einzelner Schwannzelle ( $M = 2,76$ ,  $SE = 0,03$ ). Die meisten glialen Zellausläufer bewirkte die Zugabe des Faktors FGF-2 5 ng/ml mit durchschnittlich fast 3 Ausläufern pro Zellkörper ( $M = 2,90$ ,  $SE = 0,03$ ) (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18** Mittelwerte der Anzahl glialer Zellausläufer und Standardfehler unter FGF-1 (5 ng/ml), FGF-2 (5 ng/ml), NRG-1 (20 ng/ml) und in der Kontrollgruppe. Mit Ausnahme des Vergleichs zwischen FGF-1 (5 ng/ml) und FGF-2 (5 ng/ml) zeigten sich zwischen den Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede, „\*“ zeigt ein  $p < .001$ .

### 3.4.3 Abstand der Zellkörper nicht-myelinisierender Schwannzellen

Um die Dichte der die Neuriten begleitenden Schwannzellen zu quantifizieren wurde der Abstand der Perikarya der Schwannzellen entlang der Neuritenausläufer gemessen und verglichen. Dieser unterschied sich abhängig vom zugegebenen Wachstumsfaktor deutlich. Der geringste Abstand zwischen den Schwannzellkörpern fand sich unter Zugabe von FGF-1 5 ng/ml ( $M = 31,4 \mu\text{m}$ ,  $SE = 0,9$ ). Es folgte FGF-2 5 ng/ml mit  $M = 38,2 \mu\text{m}$ ,  $SE = 1,1$ . Unter Kontrollbedingungen zeigte sich der zweitlängste Abstand zwischen den Perikarya,  $M = 53,8 \mu\text{m}$ ,  $SE = 2,5$  während NRG-1 20 ng/ml die längsten Abstände zwischen den Zellkörpern der Schwannzellen bewirkte,  $M = 66,3 \mu\text{m}$ ,  $SE = 1,2$  (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19** Mittelwerte des Abstandes glialer Zellkörper in  $\mu\text{m}$  und Standardfehler unter FGF-1 (5 ng/ml), FGF-2 (5 ng/ml), NRG-1(20 ng/ml) und in der Kontrollgruppe. Zwischen den genannten Konzentrationsstufen der Wachstumsfaktoren zeigten sich signifikante Unterschiede, „\*“ zeigt ein  $p < .001$ .

## **4 Diskussion**

### **4.1 Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 auf die Interaktion zwischen Spiralganglienzellen und Gliazellen**

Das Längenwachstum der Neuriten wurde durch FGF-1 konzentrationsabhängig verändert, wobei bei niedrigen verwendeten Konzentrationen (1 ng/ml und 5 ng/ml) eine Inhibition des Längenwachstums auffiel und unter der höheren Konzentrationen von FGF-1 10 ng/ml die Neuriten länger auswuchsen. Es zeigten sich unter einer Konzentration von FGF-1 1 ng/ml und 5 ng/ml Neuritenlängen, die auch gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant verkürzt waren. Der Vergleich von FGF-1 mit den identischen Konzentrationsstufen von FGF-2 zeigte nur in den Konzentrationen von 5 ng/ml und 10 ng/ml signifikant kürzere Neuriten unter FGF-1. In der höchsten Konzentration von 10 ng/ml FGF-1 waren die Neuriten durchschnittlich kürzer als die Neuriten unter NRG-1 Konzentrationen von 50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml. Bezüglich der über alle Konzentrationen von FGF-1 gemittelten Anzahl auswachsender Neuriten erbrachte die Zugabe von FGF-1 keinen statistisch relevanten Unterschied zu den anderen Gruppen. Die quantitative Auswertung des Wachstumsverhaltens der Schwanzzellen zeigte, dass, vergleichbar mit den Neuritenlängen, unter FGF-1 1 ng/ml die kürzesten Gliazellausläufer festzustellen waren. In der durchschnittlichen Anzahl der Zellausläufer unter FGF-1 5 ng/ml konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe und NRG-1 20 ng/ml festgestellt werden. So wuchsen unter FGF-1 5 ng/ml durchschnittlich fast drei Ausläufer aus, was dem morphologischen Korrelat der sichtbar stärkeren Netzbildung zwischen den Gliazellen entspricht. Zu dieser Beobachtung passt auch der unter FGF-1 5 ng/ml statistisch geringste durchschnittliche Abstand der Gliazellkörper untereinander. Unter FGF-1 5 ng/ml zeigten die Schwanzzellen die höchste Dichte und die stärkste Schwanzzellproliferation.

Im Hinblick auf die räumliche Interaktion zwischen den Spiralganglienneuriten und den Gliazellen konnte unter dem Einfluss von FGF-1 in den Konzentrationen von 1 ng/ml und 5 ng/ml eine enge Assoziation der Gliazellen zu den auswachsenden Neuriten festgestellt werden. So lagerten sich die Schwanzzellen mit ihren Ausläufern dem Faserverlauf der Neuriten an und schienen sie zu ummanteln. Die Gliazellen reihten sich entlang des Faserverlaufes perlschnurartig über längere Strecken hintereinander

und schienen somit als eine Art Leitschiene für das Neuritenwachstum zu fungieren. Sie zeigten oft flächige Perikarya und bildeten mit ihren Ausläufern untereinander gitterartige Verbände aus. An den Enden ihrer Zellausläufer waren oftmals zelluläre Verbreiterungen zu erkennen.

In allen untersuchten Konzentrationsstufen zeigte sich dieses kumulative, faszikuläre Schwanzzellwachstum um die Neuriten, während bei FGF-1 10 ng/ml die Neuriten auch deutlich über das Schwanzzellniveau hinauswuchsen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf einen inhibitorischen Einfluss der nicht-myelinisierenden Schwanzzellen auf das Neuritenwachstum unter FGF-1 bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml hin. Die Zugabe von FGF-1 führte unter allen untersuchten Faktoren inklusive der Kontrollgruppe zu den kürzesten glialen Zellausläufern. An zweiter Stelle hinter FGF-2 zeigten die mit FGF-1 behandelten nicht-myelinisierenden Schwanzzellen durchschnittlich über alle Konzentrationsstufen hinweg eine hohe Anzahl an Zellausläufern mit geringem Abstand der Zellkörper untereinander im Sinne einer engen, maschenartigen Verflechtung dieser glialen Zellen.

Die beobachtete enge Assoziation von nicht-myelinisierenden Schwanzzellen und auswachsenden Spiralganglienneuriten sowie deren netzartige Kommunikation untereinander legt eine entscheidende Bedeutung der glialen Zellen für die nervale Regeneration nahe. Während das mitogene Potenzial dieser Zellen unter FGF-1 Einfluss nachgewiesen wurde (Chen et al., 1991; Davis and Stroobant, 1990) ist über ihr Verhalten in Bezug auf die nervale Regenerationskapazität wenig bekannt. In dissoziierten Spiralganglienzellkulturen wurde unter FGF-1 Zugabe ein verlängertes Neuritenwachstum und verbessertes Zellüberleben festgestellt, sodass von den Autoren vermutet wird, dass FGF-1 direkt an Oberflächenrezeptoren der Neuriten bindet und seine trophische Wirkung nicht intermediär über Gliazellen vermittelt wird (Aletsee et al., 2000). Allerdings sind die zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen verschiedenen Kulturbedingungen hervorzuheben. So wurde eine wesentlich höhere FGF-1 Konzentration von 100 ng/ml mit einer Kokultivation von Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) verwendet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen noch nicht messbaren Effekt der nicht-myelinisierenden Schwanzzellen auf das Neuritenwachstum nach Zugabe der niedrigen FGF-1 Konzentrationen von 1 ng/ml und 5 ng/ml hin. Eine andere Möglichkeit ist ein Schwanzzell-vermittelter repulsiver Effekt auf das Neuritenlängenwachstum unter den FGF-1 Konzentrationen 1 ng/ml und 5 ng/ml, welcher allerdings bisher nicht

beschrieben wurde. Bei der Konzentration von FGF-1 10 ng/ml zeigte sich eine gleichbleibend starke Schwanzzellproliferation mit dichter Schwanzzellvernetzung, allerdings zeigten die Neuriten ein deutlich verlängertes Auswachsen über das Niveau der nicht-myelinisierenden Schwanzzellen hinaus. Somit ist bei der Konzentration von 10 ng/ml durch eine FGF-1-induzierte Schwanzzellproliferation mit konsekutiver Sekretion attraktiver Faktoren ein mitogener Einfluss auf das Neuritenwachstum anzunehmen. Versuche zur nervalen Regeneration an adulten Innenohren der Maus zeigen, dass die Applikation von Fibroblastenwachstumsfaktoren zusammen mit anderen Neurotrophinen ruhende Gliazellen in einen Zustand vergleichbar dem neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen versetzen kann. Dies galt für Gliazellen, die den Transkriptionsfaktor Sox2 (*sex determining region Y box 2*) exprimierten. So führte eine neuronale Degeneration zu nukleärer Chromatinkondensation in den Zellkernen der Gliazellen sowie einer Hochregulation von für die Neurogenese und Entwicklung verantwortlicher Gene mit dem Ergebnis einer verbesserten Regeneration der Nerven (Lang et al., 2015; Widera et al., 2011b). Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass niedrige Konzentrationen von FGF-1 (1 ng/ml und 5 ng/ml) lediglich zu einer Schwanzzellproliferation führen, eine höhere Konzentration ab 10 ng/ml jedoch die nervale Regeneration anregt. Für die zellulären Mechanismen, die die nervale Regeneration aktivieren sind sowohl direkte Effekte von FGF-1 auf die Spiralganglienzellen als auch indirekt über die nicht-myelinisierenden Schwanzzellen vermittelte Wirkungen denkbar.

## **4.2 Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 auf die Interaktion zwischen Spiralganglienzellen und Gliazellen**

FGF-2 hatte in den durchgeführten Versuchen einen signifikanten Einfluss auf das Längenwachstum von Spiralganglienneuriten. Es fand sich unter der höchsten Konzentration von 10 ng/ml FGF-2 das höchste Neuritenlängenwachstum von allen untersuchten Faktoren. Im Vergleich zu FGF-1 bewirkte FGF-2 in den Konzentrationsstufen 5 ng/ml und 10 ng/ml statistisch signifikant längere Neuriten. Die durchschnittliche Länge der Zellausläufer der Schwanzzellen war höher als unter FGF-1 und niedriger als unter NRG-1 Zugabe. Eine Auswertung der durchschnittlichen Anzahl glialer Zellausläufer unter FGF-2 zeigte gegenüber der Kontrolle und NRG-1 eine signifikante Erhöhung. Unter Einfluss von FGF-2 war nach FGF-1 der zweitgeringste

Abstand der Schwanzzellkörper untereinander in den Explantaten zu beobachten. Andere Untersuchungen zeigen, dass FGF-2 defiziente Mäuse eine signifikant höhere Anzahl regenerierender Axone mit erhöhtem Myelinisierungsgrad aufwiesen, während eine FGF-2 Überexprimierung zu einer geringeren Neuritenzahl mit Hypomyelinisierung führt (Jungnickel et al., 2004), was den vorliegenden Ergebnissen widersprechen würde. Eine andere Tendenz zeigte die Implantation von FGF-2 überexprimierenden Schwanzzellen in Ratten nach nervaler Schädigung, die zu einer signifikant größeren Anzahl myelinisierter Axone führte (Timmer et al., 2004, 2003b). Untersuchungsergebnisse an kortikalen Neuronen wiesen nach Zugabe von FGF-2 verbreiterte Wachstumskegel auf, aus denen in der Folge vermehrt axonale Verzweigungen entstanden (Klimaschewski et al., 2004; Szebenyi et al., 2001).

Die Vermessung der zellulären Ausläufer der Schwanzzellen ergab nach Zugabe von FGF-2 die zweitlängsten Fortsätze nach der NRG-1-Gruppe. Andere Experimente mit FGF-2 überexprimierenden Mäusen oder externer Applikation von FGF-2 zeigten mit den vorliegenden Beobachtungen vereinbare Ergebnisse. So traten nach nervaler Schädigung verlängerte Axone mit einer reduzierten Myelinisierung auf, während die Schwanzzellproliferation erhöht war (Grothe et al., 2006; Hossain and Morest, 2000; Jungnickel et al., 2006).

Eine Zugabe von FGF-2 führte in den vorliegenden Untersuchungen zu den durchschnittlich meisten glialen Zellausläufern, wobei nur im Vergleich zu FGF-1 mit ähnlich vielen Ausläufern kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Nach der FGF-1-Gruppe zeigten die Perikarya der Gliazellen bei Kultivierung mit FGF-2 die zweitkürzesten Abstände, einer erhöhten Dichte der Schwanzzellen entsprechend.

Die allgemeine Morphologie der Schwanzzellen blieb in allen Konzentrationsstufen ähnlich. So zeigten die nicht-myelinisierenden Schwanzzellen unter FGF-2-Gabe eine grobmaschig netzartige Anordnung. Ihre Migration vom Präparat in die Peripherie blieb auf einen Umkreis von 300 – 400  $\mu\text{m}$  begrenzt. Auffällig waren oftmals flächige Perikarya mit drei bis vier Zellausläufern, an deren Enden buschige Aufweitungen zu erkennen waren.

Untersuchungen an FGF-2 überexprimierenden Schwanzzellen konnten bei der 18 kDa schweren Isoform des FGF-2 keine Unterschiede in der Zellmorphologie im Vergleich zum eher bipolaren schlanken Wildtyp feststellen, während die 21 kDa und 23 kDa Isoform zu einer Veränderung im Sinne einer flachen, fibroblastenähnlichen Form mit kurzen Zellausläufern, vergleichbar mit vorliegenden Ergebnissen, führte. Abhängig

von der exprimierten Isoform und somit der unterschiedlichen Zellmorphologie vermuten die Autoren unterschiedliche physiologische Funktionen. Die 18 kDa Isoform schien die Expression von Zelladhäsionsmolekülen zu begünstigen und neurotrophe Effekte aufzuweisen, während die 21 kDa und 23 kDa Isoformen eine hohe mitogene Aktivität zeigten und zu einer erhöhten Schwanzzellproliferation führten (Grothe et al., 1998). Entlang der auswachsenden Neuriten reihten sich die nicht-myelinisierenden Schwanzzellen dicht an die Nervenfasern an und schienen sie zu ummanteln. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml wurden die Neuriten nur während der ersten 300- 400  $\mu\text{m}$  ab Präparataustritt von nicht-myelinisierenden Schwanzzellen begleitet und wuchsen danach langstreckig unbegleitet von Schwanzzellen weiter in die Peripherie heraus. Auffällig war eine scheinbare Beteiligung der Schwanzzellen an der Richtungsänderung nervaler Faserverläufe, was auf einen chemoattraktiven Einfluss auf die nervalen Wachstumskegel hinweisen könnte. Für FGF-2 und seine Rezeptoren ist eine Rolle in der Wegfindung zentraler Axone nachgewiesen (McFarlane et al., 1996).

Das weitreichende regenerative Potenzial von adulten Schwanzzellen unter FGF-2 Einfluss verdeutlichen *in vitro* Untersuchungen an myelinisierenden Schwanzzellen des Gaumenbogens der Ratte, die unter FGF-2 Zugabe zu multipotenten Stammzellen der Neuralleiste dedifferenzierten. Die kultivierten Schwanzzellen exprimierten neben dem p75 NTR, gegen welchen auch die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Primärantikörper gerichtet sind, Nestin (Akronym für *neuroectodermal stem cell marker*) als Stammzellmarker und konnten unter FGF-2 und EGF (*epidermal growth factor*) multipotenten Zustand reprogrammiert werden (Widera et al., 2011a). Die vorliegenden Ergebnisse lassen eine durch nicht-myelinisierende Schwanzzellen vermittelte Zunahme des Längenwachstums der Spiralganglienzellen *in vitro* durch die Zugabe von FGF-2 ab einer Konzentration von 5 ng/ml vermuten. Auch eine Beteiligung der Schwanzzellen an einer Richtungsänderung nervaler Faserverläufe unter FGF-2 ist möglich.

### **4.3 Einfluss von Neuregulin-1 auf die Interaktion zwischen Spiralganglienzellen und Gliazellen**

Die Zugabe von NRG-1 bewirkte deutliche Änderungen sowohl in der Morphologie der nicht-myelinisierenden Schwanzzellen und der Neuriten als auch in den quantitativen Analysen.

NRG-1 führte zu den durchschnittlich längsten Neuriten in allen Gruppen. Ein Vergleich der Neuritenlängen innerhalb der Konzentrationsstufen von NRG-1 erbrachte bei steigender Konzentration bis 100 ng/ml signifikant zunehmende Längen, während bei einer Konzentration von 200 ng/ml kein Unterschied mehr zu 100 ng/ml festgestellt werden konnte. Die Beobachtungen passen zu Ergebnissen von Untersuchungen an Rückenmarksganglien der Ratte, bei denen eine dosisabhängige signifikante Verlängerung und Erhöhung der Anzahl auswachsender Neuriten unter NRG-1-Gabe sowie eine gesteigerte gliale Proliferation festgestellt wurde (Audisio et al., 2012; Liu et al., 2011b). Bei den genannten Untersuchungen wurden weiterhin ein mediatorischer Einfluss von NGF auf die Ausschüttung von NRG-1 und somit eine gesteigerte neurotrophe Wirkung festgestellt (Audisio et al., 2012). Eine mögliche Erklärung dafür ist eine NGF Ausschüttung durch Schwanzzellen, welche in der Folge über axonale TrkA Rezeptoren eine axonale NRG-1 Sekretion auslöst, die über einen parakrinen Effekt die gliale NGF Sekretion weiter erhöht und so einen positiven Feedbackmechanismus bewirkt (Esper et al., 2006b).

Auch die quantitative Analyse des durchschnittlichen glialen Wachstumsverhaltens über alle Konzentrationsstufen repräsentierte die proliferativen Wirkungen von NRG-1. So traten die längsten Schwanzzellausläufer im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf. Die bipolare Schwanzzellmorphologie unter NRG-1 bestätigte sich in den statistischen Tests und zeigte für NRG-1 die geringste Anzahl der glialen Zellfortsätze mit durchschnittlich 2,31 Ausläufern pro Zelle. Der vermessene Abstand zwischen den Perikarya der Schwanzzellen war unter NRG-1 der längste unter allen Gruppen entsprechend einer geringeren Zelldichte und somit einer verminderten Zellproliferation.

Die qualitative Analyse der Schwanzzell-Neurit-Interaktion zeigte weit aus dem Präparat wachsende Neuriten, die mit vermehrten Aufzweigungen zu einer neuronalen Netzbildung tendierten. Ähnliche Ergebnisse mit signifikant lang auswachsenden Neuriten zeigten in-vitro Kultivierungen von Hinterstrangbahnen nach Zugabe von NRG-1 (Audisio et al., 2012). Umgebende Schwanzzellen wuchsen dicht parallel angeordnet in die Peripherie und zeigten ähnlich den nicht-myelinisierenden Schwanzzellen eine Faszikulationstendenz. Ihre bipolare Zellmorphologie war unter allen Konzentrationsstufen ähnlich. So zeigten sich oftmals bipolare Perikarya mit schlanken, weit auslaufenden Fortsätzen.

Weiterhin auffällig war eine starke Migrationstendenz der nicht-myelinisierenden Schwannzellen sowie eine enge räumliche Assoziation zu auswachsenden Neuriten, wobei die Schwannzellen die Nervenfasern über lange Strecken begleiteten. So war ein assoziiertes Wachstum bis durchschnittlich 600  $\mu\text{m}$  in die Peripherie üblich, während unter FGF-1 und FGF-2 Gliazellen nur bis durchschnittlich 350  $\mu\text{m}$  in die Peripherie migrierten. Für Schwannzellen der Ratte ist die verstärkte Migration von Schwannzellen, unabhängig von ihrer Proliferation, unter NRG-1 Kultivierung nachgewiesen (Mahanthappa et al., 1996; Meintanis et al., 2001). *In vitro* Untersuchungen zu Schwannzellen an zervikalen Ganglienzellimplantaten der Maus zeigten einen entscheidenden Einfluss des von NRG-1 genutzten ErbB Signalweges auf das Zellverhalten. So stellt NRG-1 Typ III ein wichtiges axonales Signalprotein für den Kontakt mit umgebenden ErbB exprimierenden Schwannzellen dar und vermittelt eine reduzierte Apoptose, eine verstärkte gliale Proliferation und Kolonisation sowie eine verstärkte Schwannzellmigration entlang der untersuchten Axone (Heermann et al., 2011; Perlin et al., 2011). Die auswachsenden Neuriten wirken somit auf molekularer Ebene chemoattraktiv für nachfolgend migrierende Schwannzellen. Weitere Untersuchungen ergaben einen indirekten Einfluss des ErbB-NRG-1 Typ III Signalwegs auf das Migrationsvermögen von Schwannzellen durch die Verhinderung der Apoptose dieser Zellen (Heermann and Schwab, 2013). In den vorliegenden Untersuchungen wuchsen die Neuriten ab einer Konzentration von 200 ng/ml nach Erreichen der maximalen Migrationsstrecke der Schwannzellen unbegleitet weiter in die Peripherie.

Eine weitere Auffälligkeit war das Auftreten von nicht-myelinisierenden Schwannzellen an Aufzweigungen von Neuriten. Für NRG-1 $\beta$  ist nachgewiesen, dass es an hippocampalen Neuronen *in vitro* eine verstärkte Verzweigung induziert (Gerecke et al., 2004), was eine NRG-1 vermittelte Glia-Neuron-Interaktion vermuten lässt.

NRG-1 Isoformen werden axonal sezerniert und vermitteln die Kommunikation zwischen Nerven- und Gliazellen. Nach einigen Monaten der Denervation zeigen Gliazellen eine Verminderung der Expression der Rezeptordichte von erbB-Neuregulin und p75NTR Rezeptoren, während die Rezeptoren für Laminin und dem Gliaspezifischen S100b (*S calcium binding protein B*), einem für nervale Regeneration mitverantwortlichen Protein, unverändert bleiben. Dies ist ein möglicher Grund, warum Schwannzellen nach einer längeren Zeit der Denervation eine schlechtere

Regenerationsfähigkeit zeigen. Bei Hinzugabe von Neuregulinen ist dieser Prozess reversibel (Hall, 2005).

Weitere nicht-neuronale Zellen, die eine Rolle in der Glia-Neuron-Interaktion spielen, sind Fibroblasten. Fibroblasten haben einen repulsiven Effekt auf die axonale Regeneration und können das Zellverhalten von Schwannzellen modulieren. Während die Zugabe von Kollagen Typ IV und Heparansulfatproteoglykanen zu einer verlangsamten Schwannzellproliferation führt, steigert NRG-1 bei Zugabe zu Fibroblastenkulturen die Schwannzellmigration (Dreesmann et al., 2009a).

#### 4.4 Weitere Einflussfaktoren auf das Wachstum von Neuriten und nicht-myelinisierenden Schwannzellen

Das Bodenmaterial, die verwendete Bodenbeschichtung sowie die extrazelluläre *in vitro* Umgebung können einen entscheidenden Einfluss auf auswachsende Neuriten und Schwannzellen im Hinblick auf deren Wachstumsverhalten und Überlebensfähigkeit haben.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Glasplatten mit einer chemisch modifizierten, positiv geladenen Oberfläche verwendet, die laut Herstellerangaben eine Poly-D-Lysin Beschichtung nachahmen soll. Die Bodenbeschichtung gehört zu den wichtigsten extrinsischen Einflussfaktoren auf die axonale Elongation, die Wachstumsrichtung und die Aufzweigungsrate von Neuriten (Buettner and Pittman, 1991; Reichardt et al., 1989). Versuche mit verschiedenen alloplastischen Materialien ergaben signifikante Unterschiede in der Länge und der Anzahl von auswachsenden Spiralganglienzellen der Maus. So zeigte Titan die höchste Biokompatibilität mit den längsten und meisten Neuriten, auf Gold, Edelstahl und Platin wuchsen durchschnittlich weniger und kürzere Neuriten aus und auf einer Plastikoberfläche waren die kürzesten, aber neben Platin auch die meisten Neuriten festzustellen (Brors et al., 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Beschichtung war unter allen Versuchsmodalitäten gleich und bestand aus Poly-D-Lysin und Laminin. Poly-D-Lysin ist ein Polymer der Aminosäure Lysin und dient als unspezifisches Adhäsionsmolekül indem es als positiv geladenes Oberflächenmolekül die elektrostatische Interaktion mit den negativ geladenen Ionen der Zellmembran verstärkt. Laminin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix und Bestandteil von Basallaminae, dessen Funktion unter Kulturbedingungen die Bindung von zellulären Oberflächenrezeptoren ist.

Wie auch die Neurotrophine können Moleküle der extrazellulären Matrix permissive oder inhibitorische Wirkungen auf das Neuritenwachstum und die Schwannzellproliferation haben, wodurch Laminin in die Betrachtung der verantwortlichen Moleküle auf das untersuchte Wachstumsverhalten einbezogen werden muss (Dreesmann et al., 2009b). Laminin hat sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, vermittelt über Zelladhäsionsmoleküle (CAM, *cell adhesion molecules*), einen permissiven Effekt auf auswachsende Neuriten. Dies geschieht zum einen mechanisch, zum anderen aber auch über intrazelluläre Signalkaskaden (Kiryushko et al., 2004). Beschichtungen können über adsorbierte Oberflächenmoleküle und Oberfläche-Zell-

Interaktionen auf die Zellaktivität, die Zellmorphologie und das Migrationsverhalten einwirken und müssen somit im Versuchsaufbau als kritische Faktoren berücksichtigt werden. Eine weitere Beeinflussbarkeit auswachsender Neuriten durch Laminin ergibt sich durch deren Entwicklungsstand. Versuche an Hühnerembryonen zeigten, dass der für das neuronale Auswachsen und Anhaften wichtige Lamininrezeptor  $\beta_1$  Integrin in Phasen der axonalen Innervation nicht exprimiert wird, während eine experimentelle Unterbrechung der Nervenfasern eine Hochregulation des Rezeptors bewirkt (Tomaselli and Reichardt, 1988).

Schwannzellen sezernieren Laminin und andere Adhäsionsmoleküle, und das axonale Wachstum hängt entscheidend von Schwannzell-assoziierten extrazellulären Matrixmolekülen im distalen Nervsegment ab (Chiu et al., 1991; Jessen and Mirsky, 2002).

Neben der Beschichtung muss auch die extrazelluläre Umgebung in die Bewertung der Wachstumseigenschaften von Neuriten und Schwannzellen miteinbezogen werden. Das in dieser Arbeit verwendete Medium, in dem die Explantate wuchsen, bestand aus D-PBS, einem Puffer, der eine physiologische pH- und Elektrolytzusammensetzung imitieren soll, aus B27-Supplement, das antioxidative Komponenten enthält und aus DMEM, das als Nährmedium fungiert.

Für die Verwendung von verschiedenen kommerziell erhältlichen B27-Supplementen wurde eine schwierige Reproduzierbarkeit bei neuronalen Zellkulturen festgestellt, was auf die variable Zusammensetzung von Komponenten biologischen Ursprungs zurückgeführt werden könnte. Auch die Versuchsdurchführung durch verschiedene Personen oder falsche Lagerungsbedingungen könnten dazu beitragen (Chen et al., 2008). Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass die in DMEM enthaltenen Aminosäuren an in der Zellkultur enthaltene Proteine binden und in der Folge Auswirkungen auf das Zellverhalten haben. Für die Relevanz der Extrazellulärmatrix spricht auch eine Beobachtung im Rahmen der experimentellen Implantation von Cochlea-Implantat Elektroden in die Scala tympani von Meerschweinchen. Hierbei kam es nur in Regionen, die durch den Elektrodenkontakt fibrotisch umgebaut waren und somit ein Fasergerüst bildeten zu einem Auswachsen peripherer Fasern an das Implantat (Wise and Gillespie, 2012a). Zusammengenommen ist es wichtig, sich der vielfältigen Möglichkeiten der zellulären Beeinflussung bewusst zu sein und eine Standardisierung sowohl in der Versuchsdurchführung als auch in den verwendeten Produkten und ihren Herstellern sicherzustellen, um unerwünschte Einflüsse zu vermeiden.

## 4.5 Risiken durch die Applikation von Neurotrophinen

Neben den positiven Effekten durch die Applikation neurotropher Faktoren *in vivo* und *in vitro* bestehen insbesondere in der klinischen Anwendung auch Risiken.

So sind die hochaffinen Tyrosinkinase-Rezeptoren Trk A - C, die bestimmte Neurotrophine binden und ihre intrazellulären Signalwege auch für die Bildung von Proteinen aus Proto-Onkogenen und Onkogenen verantwortlich und könnten somit eine Tumorentstehung begünstigen (Ichim et al., 2012; Nakagawara, 2001). Für Neureguline, zu denen NRG-1 gehört, ist eine Rolle in der Entstehung, dem Fortschreiten, der Metastasierung und der Resistenz gegenüber onkologischen Therapien bekannt (Montero et al., 2008). Auch eine Deregulation der Rezeptoren von Fibroblastenwachstumsfaktoren fördert die Tumorentstehung, die Tumordinvasion sowie die tumorale Angiogenese über unkontrollierte mitogene Signale und Apoptoseinhibition (Turner and Grose, 2010; Wesche et al., 2011). In humanen Akustikusneurinomen und Schwannomen wurde eine verstärkte mRNA (*messenger ribonucleic acid*) Expression von FGF-2 nachgewiesen (Murphy et al., 1989).

Versuche an zentralen Neuronen der Ratte zeigten unter einer hochkonzentrierten Zugabe von NGF (*nerve growth factor*) eine neuronale Hypertrophie, die zu einer Funktionseinschränkung führen könnte (Vahlsing et al., 1991). Ebenso wäre unter der Applikation von neurotrophen Faktoren eine funktionell nachteilige Hyperplasie der glialen Zellen oder eine nervale Hyperinnervation denkbar (Winkler et al., 1997; Winkler and Thal, 1995). Schließlich besteht die Gefahr, dass der operative oder interventionelle Eingriff selbst am Innenohr durch Infektionen oder überschießende Immunreaktionen zu einem irreversiblen Verlust residualer Sinneszellen führt. Insgesamt sollte also eine Nutzen-Risiko Bewertung stattfinden, welche die Grenzen einer Konzentrationserhöhung angewandter Wachstumsfaktoren der klinischen Wirksamkeit und Sicherheit gegenüberstellt.

## **4.6 Perspektiven für die klinische Anwendung neurotropher Faktoren und Limitationen angewandter Methoden**

Der Einsatz neurotropher Faktoren in der Therapie des sensorineuralen Hörverlustes im Rahmen einer Cochlea-Implantation zielt darauf ab, eine fortschreitende nervale Degeneration aufzuhalten und die nervale Regeneration verbliebener Spiralganglienzellen zu fördern, um ein optimales klinisches Resultat im Sinne eines verbesserten Hörvermögens zu erzielen. Hierbei ist zum einen eine fortwährende elektrische Stimulation der residualen Nervenfasern und zum anderen die adäquate Zufuhr neuroprotektiver und neurotropher Substanzen in die Cochlea entscheidend.

Die Elektroden der Cochlea-Implantate liegen in der Scala tympani und überbrücken die geschädigten oder fehlenden Haarzellen, indem sie über mehrere Elektrodenkontakte direkt die Spiralganglienzellen stimulieren (Wise and Gillespie, 2012a). Der Umfang des Haarzelluntergangs, die Distanz der Elektrode zu den verbliebenen Spiralganglienzellen sowie die im Zeitverlauf fortschreitende Degeneration und damit Retraktion der Nervenfasern sowie die Degeneration der Zellkörper sind für das klinische Ergebnis relevante Einflussfaktoren (Shepherd and Javel, 1997). Für eine optimale Hörrehabilitation könnte die Strategie, mit der neurotrophe Substanzen in das Innenohr appliziert werden, von Bedeutung sein. Mögliche Methoden wären die Applikation mittels direkter Infusion (Staecker et al., 1996), die singuläre Bolusinjektion (Richardson et al., 2005) oder langsam sezernierende Alginateinlagen (Noushi et al., 2005). Die Kombination von Neurotrophinen mit der elektrischen Stimulation residualer Sinneszellen kann den Regenerationserfolg im Tiermodell potenzieren (Shepherd et al., 2005). Klinische Limitationen ergeben sich aus der zeitlich begrenzten Halbwertszeit der Neurotrophine im Innenohr sowie dem permanent erhöhten Infektionsrisiko bei implantierten Pumpsystemen (Wise and Gillespie, 2012a). Umsetzungsfähige Methoden könnten Polymere sein, die bei elektrischer Stimulation Neurotrophine sezernieren (Richardson et al., 2009) oder Nanopartikel als biologische Transporter (Tan et al., 2012), wobei bei beiden Methoden die Neurotrophinreserven erschöpfen. Weitere vielversprechende experimentelle Ansätze sind zell-basierte Therapien, welche neuronale oder sensorische Stammzellen verwenden (Chen et al., 2012; Gunewardene et al., 2012) oder genetisch modifizierte Neurotrophin-überexprimierende Schwanzzellen (Pettingill et al., 2008). Der Effekt der zell-basierten Therapieformen kann durch eine Einkapselung der veränderten Zellen in eine

biokompatible, semi-permeable Membran wesentlich verbessert werden. So würde die Membran eine Barriere für potenzielle Inflammations- und Immunreaktionen darstellen und die neurotrophen Substanzen könnten nach außen diffundieren während eine einwärts gerichtete Diffusion zellnutritiver Stoffe gesichert bliebe (Wise and Gillespie, 2012a).

Das Konzept der Gentherapie soll mittels einmalig injizierter adenoviraler Vektoren, die Gene für die Neurotrophinproduktion enthalten, für eine regulierbare lokalisierte Langzeitproduktion sorgen. Versuche an ertaubten Cochleae von Meerschweinchen ergaben hierdurch eine signifikant höhere Dichte auswachsender Spiralganglienzellen in der Nähe transfizierter Zellen (Wise et al., 2010; Wise and Gillespie, 2012b).

Es gibt einige Hinweise darauf, dass der kombinierte Einsatz von Neurotrophen den Regenerationserfolg steigern kann (Marzella et al., 1999; Mou et al., 1997). Der Einsatz von FGF-2 in Kombination mit NGF (*nerve growth factor*) zeigt Synergien im Sinne einer verbesserten Neuritogenese und TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) zusammen mit FGF-2 führt zu einem verbesserten Zellüberleben, was auf komplexe Interaktionen der Faktoren untereinander schließen lässt (Lefebvre et al., 1991). Die Kombination von FGF-1 und FGF-2 zeigte einen stärkeren Effekt als die jeweilige alleinige Applikation, allerdings war der kombinierte Effekt kleiner als die theoretische Addition der einzelnen Wirkungen (Hossain and Morest, 2000). Weiterhin könnte bei Verwendung der Fibroblastenwachstumsfaktoren generell die Kombination mit Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs), welche an den niedrig-affinen FGF-Rezeptor binden und somit die Wirkung steigern könnten, sinnvoll sein (Aletsee et al., 2000). Für NRG-1 gibt es Hinweise auf eine synergistische Wirkung mit den von Schwannzellen sezernierten BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) und NGF im Sinne eines axoglialen positiven Feedbacks. So fördert die Zugabe von BDNF an Rückenmarksneuronen von Hühner- und Mausembryonen das Schwannzellüberleben durch eine gesteigerte axonale NRG-1 Sekretion (Esper and Loeb, 2004; Ma et al., 2011).

Für den bestmöglichen Regenerationserfolg ist es also wichtig, die optimale synergistische Konzentration und Kombination von neurotrophen Substanzen zu finden. Womöglich unterscheidet sich dieses Optimum je nach zugrundeliegender Pathologie des Hörverlustes und dem umgebenden Zellmilieu.

Eine weitere wichtige Frage ist der optimale anatomische Zugang, der eine zielgenaue Applikation bei geringer Schädigung umliegender Strukturen erlaubt. Um

beispielsweise Stammzellen in die Cochlea und hierbei möglichst nahe dem die Spiralganglienzellen enthaltenden Canalis spiralis, auch Rosenthalkanal genannt, zu platzieren, um eine bestmögliche Migration der Zellen zu ermöglichen, wurden verschiedene Verfahren untersucht. Mögliche Transplantationsrouten sind ein intra-perilymphärer Zugang (Hu et al., 2005) oder ein intra-endolymphärer Zugang (Lang et al., 2008). Zugangswege mit einem besseren Zellüberleben, aber einem hohen Risiko eines weiteren Hörverlustes sind der Weg durch den Modiolus (Okano et al., 2005) oder über den Nervenstamm (Corrales et al., 2006). Ein neuer Ansatz ist die Stammzelltransplantation über die laterale Cochleawand, die sich in Versuchen an Ratten als zielgenau und sicher herausstellte. Neurale Stammzellen migrierten in den Canalis spiralis und gaben so Hinweise auf bisher unbekannte Zellzwischenräume in der Basilmembran, die die Migration der Stammzellen in den Spiralkanal ermöglichten (Zhang et al., 2013).

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente ergeben sich im Hinblick auf deren Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus Einschränkungen. So ist das Tiermodell Maus in den ersten postnatalen Tagen nicht vollständig auf das adulte menschliche Innenohr übertragbar. Ebenso wurden die Ergebnisse *in vitro* unter der physiologischen Umgebung nachgeahmten Bedingungen gewonnen. Nicht auszuschließen waren weiterhin trotz des Zusatzes von Penicillin/Streptomycin unbekannte kleinste Kontaminationen während der Präparation oder der Kulturphase, die die vorliegenden Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Auch für die praktische Umsetzung Neurotrophin-basierter Therapiekonzepte sind einige Limitationen zu berücksichtigen. Für verschiedene Neurotrophine ist ein cochleärer Basis-Apex-Gradient nachgewiesen worden, der für eine Imitation der physiologischen Gegebenheiten und somit für ein optimales funktionelles Ergebnis Beachtung finden muss. Für BDNF und NT-3 ist ein entgegengesetztes Gefälle ihrer Expression entlang der cochleären Windungen bekannt, wodurch sich unterschiedliche auditorische Reaktionen der Spiralganglienzellen ergeben. Während BDNF zu einem Signalverhalten entsprechend basaler cochleärer Abschnitte führt, ist NT-3 für apikale Signalcharakteristiken zuständig (Adamson et al., 2002). In der adulten Cochlea der Ratte wurde FGF-1 in den Spiralganglien stark exprimiert mit einer von basal nach apikal zunehmenden Intensität (Lin et al., 1993). Während der Entwicklung der cochleären Strukturen der Maus finden sich für verschiedene Neurotrophine sehr unterschiedliche Expressionsmuster der Rezeptoren, der Wachstumsfaktoren selbst

sowie deren verschiedene Splicevarianten (Pickles, 2001). In der Cochlea finden sich komplexe zeitliche Abfolgen der Expressionsmuster verschiedener Neurotrophine sowie potenzierende oder antagonistische Wirkungen untereinander (Hossain et al., 2002). Dies könnte zu einem sehr komplexen Antwortverhalten der Spiralganglien- und Gliazellen auf eine neurotrophe Therapie, abhängig vom Alter der Patienten und der zugrundeliegenden Pathologie, führen und eine Standardisierung der therapeutischen Strategie erschweren. Weiterhin scheint die Ermittlung einer optimalen Kombination und Konzentration von Wachstumsfaktoren je nach oben beschriebener Konstellation schwierig.

Als weitere potenzielle Einschränkung des Therapierfolgs von Neurotrophin-basierten Anwendungen mit einer Implantation von Fremdmaterial ist die Inflammation- und Infektionsgefahr zu nennen. Zell-basierte Therapiekonzepte beinhalten das Risiko einer immunologischen Abstoßungsreaktion des Empfängerimmunsystems (Wise and Gillespie, 2012a). Im Hinblick auf die flüssigkeitsgefüllte Cochlea sind bei einer Infiltration gelöster Wachstumsfaktoren eine Verdünnung und somit eine Wirkungsabschwächung bis hin zum Wirkungsverlust möglich, im Falle zell-basierter Therapien besteht die Gefahr einer Diffusion implantierter Zellen von ihrem Zielort (Coleman et al., 2006). Die Vorteile des Behandlungskonzepts mit viralen Vektoren, bestehend aus einer nur einmaligen Applikation mit anschließender stabiler, langandauernder und regulierbarer Genexpression und Sezernierung der Neurotrophine, werden limitiert durch die Gefahr einer mutagenen Integration in das Zielerbgut sowie das Einbringen eines Virus in ein zum Liquor offenes System (Seow and Wood, 2009). Eine weitere potenzielle Einschränkung ist der dosisabhängige Effekt applizierter Wachstumsfaktoren. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ergab sich zwar beispielsweise für das Neuritenlängenwachstum bei steigenden Konzentrationen von FGF-1, FGF-2 und NRG-1 ein verlängertes Neuritenwachstum. Dennoch ist eine ototoxische Wirkung bei sehr hohen Neurotrophinkonzentrationen denkbar, denn sehr hohe Konzentrationen von Neurotrophinen können letale Effekte auf Zellen haben (Lee et al., 2001; Reichardt, 2006).

Zudem stellt sich bei der Umsetzung des Tiermodells auf den Menschen die Frage, ob wiederauswachsende Spiralganglienzellen die Fähigkeit besitzen, in funktionell adäquater Weise auf eine elektrische Stimulation zu reagieren. Hierfür ist die korrekte Expression von Ionenkanälen sowie eine entsprechende Myelinisierung für die Weiterleitung der Impulse nötig. So könnte eine Neurotrophintherapie zu

Veränderungen der nervalen Länge, Dicke, Ionenkanaldichte und –funktion führen und dadurch zu funktionellen Einschränkungen während der Stimulation durch ein CI führen. Schließlich ist durch eine unkontrollierte Vermehrung der auswachsenden Nervenfasern oder ein ungerichtetes Wachstum eine Verschlechterung der CI Funktion denkbar (Wise and Gillespie, 2012a). Zusammenfassend stellt jedoch die Anwendung neurotropher Faktoren für die Therapie des sensorineuralen Hörverlustes unter Berücksichtigung potenzieller Einschränkungen und Risiken ein vielversprechendes Therapiekonzept dar.

#### **4.7 Schlussfolgerungen**

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Interaktionsverhalten von Spiralganglienzellen und nicht-myelinisierenden Schwannzellen unter Einfluss der Neurotrophine FGF-1, FGF-2 und NRG-1 zu untersuchen. Die morphologischen und quantitativen Ergebnisse sprechen für eine starke Neurotrophin-vermittelte Interaktion zwischen den beiden Zelltypen. Es zeigte sich für FGF-1 ein repulsiver und womöglich regulativer Einfluss auf das Neuritenwachstum, welcher durch eine molekulare Wechselwirkung mit den glialen Zellen ausgelöst sein könnte. FGF-2 betreffend konnte ein eindeutiger trophischer Einfluss auf beide Zellarten festgestellt werden und das morphologische Bild macht auch hier eine Interaktion sehr wahrscheinlich. Es ergab sich durch die Zugabe des Faktors NRG-1 der stärkste quantifizierte Effekt im Sinne des längsten Neuritenwachstums und der größten Neuritenanzahl. Auch das Kommunikationsmuster der beiden Zellarten und die im Vergleich zu den anderen Faktoren veränderte Morphologie der nicht-myelinisierenden Schwannzellen weisen auf ein enges zelluläres Zusammenspiel hin.

Die Ergebnisse zeigen also eine Modulation der Neurit-Schwannzell-Interaktion durch den Einfluss extern applizierter Neurotrophine. Die Applikation einer optimalen Kombination von neurotrophen Faktoren in geeigneter Konzentration in die menschliche Cochlea könnte somit das Überleben residueller Spiralganglienzellen sichern, das Auswachsen der Neuriten zur Cochlea-Implantatelektroden fördern und dadurch zu verbesserten therapeutischen Ergebnissen führen. Von klinischer Bedeutung ist weiterhin ein optimales technisch-funktionelles Design des Cochlea-Implantats, die sinnvolle Oberflächenbeschichtung der Elektroden sowie die Vermeidung Implantations- und Neurotrophin-assoziiierter Risiken. Durch die Weiterentwicklung der

erhobenen Ergebnisse in Kombination mit einer geeigneten Applikationsmethode ist eine klinische Umsetzung vorliegender Resultate im Sinne einer optimierten bioaktiven Cochlea-Implantat Versorgung nach sensorineuralem Hörverlust denkbar.

## 5 Literaturverzeichnis

Adamson, C.L., Reid, M.A., Davis, R.L., 2002. Opposite Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 on Firing Features and Ion Channel Composition of Murine Spiral Ganglion Neurons. *J. Neurosci.* 22, 1385–1396.

Aguayo, A.J., Epps, J., Charron, L., Bray, G.M., 1976. Multipotentiality of Schwann cells in cross-anastomosed and grafted myelinated and unmyelinated nerves: Quantitative microscopy and radioautography. *Brain Res.* 104, 1–20. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90643-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90643-0)

Aletsee, C., Völter, C., Brors, D., Ryan, A.F., Dazert, S., 2000. Die Wirkung von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 (FGF-1) auf Spiralganglienzellen der Säugetiercochlea. *HNO* 48, 457–461. <https://doi.org/10.1007/s001060050597>

Archbold, S., Harris, M., O'Donoghue, G., Nikolopoulos, T., White, A., Lloyd Richmond, H., 2008. Reading abilities after cochlear implantation: The effect of age at implantation on outcomes at 5 and 7 years after implantation. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72, 1471–1478.

Arthur-Farraj, P., Wanek, K., Hantke, J., Davis, C.M., Jayakar, A., Parkinson, D.B., Mirsky, R., Jessen, K.R., 2011. Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia* 59, 720–733.

Audisio, C., Mantovani, C., Raimondo, S., Geuna, S., Perroteau, I., Terenghi, G., 2012. Neuregulin1 administration increases axonal elongation in dissociated primary sensory neuron cultures. *Exp. Cell Res.* 318, 570–577.

Audisio, C., Nicolino, S., Scevola, A., Tos, P., Geuna, S., Battiston, B., Perroteau, I., 2008. ErbB receptors modulation in different types of peripheral nerve regeneration. *NeuroReport* 19, 1605–1609.

Barbacid, M., 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25, 1386–1403.

Blamey, P., Arndt, P., Bergeron, F., Bredberg, G., Brimacombe, J., Facer, G., Larky, J., Lindström, B., Nedzelski, J., Peterson, A., Shipp, D., Staller, S., Whitford, L., 1996. Factors Affecting Auditory Performance of Postlinguistically Deaf Adults Using Cochlear Implants. *Audiol. Neurotol.* 1, 293–306.

Blits, B., Dijkhuizen, P.A., Boer, G.J., Verhaagen, J., 2000. Intercostal Nerve Implants Transduced with an Adenoviral Vector Encoding Neurotrophin-3 Promote Regrowth of Injured Rat Corticospinal Tract Fibers and Improve Hindlimb Function. *Exp. Neurol.* 164, 25–37.

Boeninghaus, H.-G., Lenarz, T., 2006. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, 12th ed. Springer-Verlag.

Bothwell, M., 1995. Functional Interactions of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 223–253.

Bredberg, G., Engstrom, H., Ades, H.W., 1965. Cellular Pattern and Nerve Supply of the Human Organ of Corti. *Arch Otolaryngol* 82(5), 462–469.

Britsch, S., 2007. *The Neuregulin-1/ErbB signaling system in development and disease.* Springer Berlin Heidelberg, pp. 3–4.

Brors, D., Aletsee, C., Schwager, K., Mlynski, R., Hansen, S., Schäfers, M., Ryan, A.F., Dazert, S., 2002. Interaction of spiral ganglion neuron processes with alloplastic materials in vitro. *Hear. Res.* 167, 110–121.

Buettner, H.M., Pittman, R.N., 1991. Quantitative effects of laminin concentration on neurite outgrowth in vitro. *Dev. Biol.* 145, 266–276.

Buonanno, A., Fischbach, G.D., 2001. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 287–296.

Chao, M.V., 1994. The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 25, 1373–1385.

Chen, J.-K., Yao, L.-L., Jenq, C.-B., 1991. Mitogenic response of rat schwann cells to fibroblast growth factors is potentiated by increased intracellular cyclic AMP levels. *J. Neurosci. Res.* 30, 321–327.

Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S.J., Johnson, S.L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J.K., Andrews, P.W., Marcotti, W., Moore, H.D., Rivolta, M.N., 2012. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* 490, 278–282.

Chen, Y., Stevens, B., Chang, J., Milbrandt, J., Barres, B.A., Hell, J.W., 2008. NS21: Re-defined and Modified Supplement B27 for Neuronal Cultures. *J. Neurosci. Methods* 171, 239–247.

Chiu, A.Y., Espinosa De Los Monteros, A., Cole, R.A., Loera, S., De Vellis, J., 1991. Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia* 4, 11–24.

Citri, A., Skaria, K.B., Yarden, Y., 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp. Cell Res.* 284, 54–65.

Cochlear GmbH & Co.KG, Cochlea-Implantat System mit intracochleärem Elektrodenträger in der Scala tympani, Nucleus® Cochlear Implant System, verfügbar unter: <https://hoer-wunder.de/cochlea-implantat/>, zuletzt geprüft 25.07.2019

Coleman, B., Hardman, J., Coco, A., Epp, S., de Silva, M., Crook, J., Shepherd, R., 2006. Fate of embryonic stem cells transplanted into the deafened mammalian cochlea *Cell Transplant.* 15, 369–380.

Corrales, C.E., Pan, L., Li, H., Liberman, M.C., Heller, S., Edge, A.S.B., 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. *J. Neurobiol.* 66, 1489–1500.

Davis, J.B., Stroobant, P., 1990. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth

factors are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* 110, 1353–1360.

Dazert, S., Baird, A., Ryan, A., 1998. Receptor-targeted delivery of an intracellular toxin to outer hair cells by fibroblast growth factor. *Hear. Res.* 115, 143–148.

Dazert, S., Kim, D., Luo, L., Aletsee, C., Garfunkel, S., Maciag, T., Baird, A., Ryan, A.F., 1998. Focal delivery of fibroblast growth factor-1 by transfected cells induces spiral ganglion neurite targeting in vitro. *J. Cell. Physiol.* 177, 123–129.

Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., Jessen, K.R., 1995. Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat schwann cell precursors. *Neuron* 15, 585–596.

Dreesmann, L., Mittnacht, U., Lietz, M., Schlosshauer, B., 2009a. Nerve fibroblast impact on Schwann cell behavior. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 285–300.

D'Sa, C., Gross, J., Francone, V.P., Morest, D.K., 2007. Plasticity of synaptic endings in the cochlear nucleus following noise-induced hearing loss is facilitated in the adult FGF2 overexpressor mouse. *Eur. J. Neurosci.* 26, 666–680.

Ernst, A., Battmer, R.-D., Todt, I., 2009. *Cochlear Implant heute*. Springer Berlin Heidelberg.

Esper, R.M., Loeb, J.A., 2004. Rapid Axoglial Signaling Mediated by Neuregulin and Neurotrophic Factors. *J. Neurosci.* 24, 6218–6227.

Esper, R.M., Pankonin, M.S., Loeb, J.A., 2006a. Neuregulins: Versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res. Rev.* 51, 161–175.

Falls, D.L., 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell Res.* 284, 14–30.

Fetoni, A.R., Picciotti, P.M., Paludetti, G., Troiani, D., 2011. Pathogenesis of presbycusis in animal models: A review. *Exp. Gerontol.* 46, 413–425.

- Folkman, J., Klagsbrun, M., 1987. Angiogenic factors. *Science* 235, 442–447.
- Frade, J.M., Rodriguez-Tebar, A., Barde, Y.-A., 1996. *c.* *Nature* 383, 166–168.
- Fritsch, B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L.M., Fariñas, I., 1997. The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci.* 20, 159–164.
- Frostick, S.P., Yin, Q., Kemp, G.J., 1998. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18, 397–405.
- Funakoshi, H., Frisén, J., Barbany, G., Timmusk, T., Zachrisson, O., Verge, V.M., Persson, H., 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J. Cell Biol.* 123, 455–465.
- Furusho, M., Dupree, J.L., Bryant, M., Bansal, R., 2009. Disruption of Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling in Nonmyelinating Schwann Cells Causes Sensory Axonal Neuropathy and Impairment of Thermal Pain Sensitivity. *J. Neurosci.* 29, 1608–1614.
- Fu, S.Y., Gordon, T., 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* 14, 67–116.
- Gantz, B.J., Woodworth, G.G., Knutson, J.F., Abbas, P.J., Tyler, R.S., 1993. Multivariate Predictors of Audiological Success with Multichannel Cochlear Implants. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 102, 909–916.
- Garratt, A.N., Britsch, S., Birchmeier, C., 2000. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell. *BioEssays* 22, 987–996.
- G. Després, I. Jalenques, Romand, R., 1991. Basic FGF-like protein in the lower stato-acoustic system of the neonatal and adult rat. *NeuroReport* 2(11), 639–642.
- Gerecke, K.M., Wyss, J.M., Carroll, S.L., 2004. Neuregulin-1 $\beta$  induces neurite

extension and arborization in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 379–393.

Geuna, S., Nicolino, S., Raimondo, S., Gambarotta, G., Battiston, B., Tos, P., Perroteau, I., 2007. Nerve regeneration along bioengineered scaffolds. *Microsurgery* 27, 429–438.

Gillespie, L.N., Clark, G.M., Marzella, P.L., 2004. Delayed neurotrophin treatment supports auditory neuron survival in deaf guinea pigs. *NeuroReport* 15(7), 1121–1125.

Gimenez-Gallego, G., Conn, G., Hatcher, V.B., Thomas, K.A., 1986. Human brain-derived acidic and basic fibroblast growth factors: Amino terminal sequences and specific mitogenic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 541–548.

Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L., Johnson Jr., E.M., 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303–315.

Grinspan, J.B., Marchionni, M.A., Reeves, M., Coulaloglou, M., Scherer, S.S., 1996. Axonal Interactions Regulate Schwann Cell Apoptosis in Developing Peripheral Nerve: Neuregulin Receptors and the Role of Neuregulins. *J. Neurosci.* 16, 6107–6118.

Grothe, C., Haastert, K., Jungnickel, J., 2006. Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration—Lessons from in vivo studies in mice and rats. *Brain Res. Rev.* 51, 293–299.

Grothe, C., Meisinger, C., Hertenstein, A., Kurz, H., Wewetzer, K., 1996. Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion. *Neuroscience* 76, 123–135.

Grothe, C., Meisinger, C., Holzschuh, J., Wewetzer, K., Cattini, P., 1998. Overexpression of the 18 kD and 21/23 kD fibroblast growth factor-2 isoforms in PC12 cells and Schwann cells results in altered cell morphology and growth. *Mol. Brain Res.* 57, 97–105.

Grothe, C., Nikkhah, G., 2001. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat. Embryol. (Berl.)* 204, 171–177.

Guest, J.D., Hesse, D., Schnell, L., Schwab, M.E., Bunge, M.B., Bunge, R.P., 1997. Influence of IN-1 antibody and acidic FGF-fibrin glue on the response of injured corticospinal tract axons to human Schwann cell grafts. *J. Neurosci. Res.* 50, 888–905.

Gundersen, R.W., 1987. Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev. Biol.* 121, 423–431.

Gunewardene, N., Dottori, M., Nayagam, B.A., 2012. The Convergence of Cochlear Implantation with Induced Pluripotent Stem Cell Therapy. *Stem Cell Rev. Rep.* 8, 741–754.

Haastert, K., Lipokatic', E., Fischer, M., Timmer, M., Grothe, C., 2006. Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms. *Neurobiol. Dis.* 21, 138–153.

Hall, S., 2005. The response to injury in the peripheral nervous system. *Bone Jt. J.* 87-B, 1309–1319.

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. *Hear. Res.* 161, 87–98.

Hartshorn, D.O., Miller, J.M., Altschuler, R.A., 1991. Protective Effect of Electrical Stimulation in the Deafened Guinea Pig Cochlea. *Otolaryngol. -- Head Neck Surg.* 104, 311–319.

Hauri, H.P., Bucher, K., 1986. Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal. Biochem.* 159, 386–389.

Heermann, S., Schmücker, J., Hinz, U., Rickmann, M., Unterbarnscheidt, T., Schwab,

M.H., Krieglstein, K., 2011. Neuregulin 1 Type III/ErbB Signaling Is Crucial for Schwann Cell Colonization of Sympathetic Axons. *PLoS ONE* 6.

Heermann, S., Schwab, M.H., 2013. Molecular control of Schwann cell migration along peripheral axons: keep moving! *Cell Adhes. Migr.* 7, 18–22.

Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C., Thoenen, H., 1987. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.* 104, 1623–1631.

Hiebert, G.W., Khodarahmi, K., McGraw, J., Steeves, J.D., Tetzlaff, W., 2002. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant. *J. Neurosci. Res.* 69, 160–168.

Hossain, W.A., Brumwell, C.L., Morest, D.K., 2002. Sequential Interactions of Fibroblast Growth Factor-2, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3, and Their Receptors Define Critical Periods in the Development of Cochlear Ganglion Cells. *Exp. Neurol.* 175, 138–151.

Hossain, W.A., Morest, D. k., 2000. Fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) promote migration and neurite growth of mouse cochlear ganglion cells in vitro: Immunohistochemistry and antibody perturbation. *J. Neurosci. Res.* 62, 40–55.

Hossain, W.A., Zhou, X., Rutledge, A., Baier, C., Morest, D.K., 1996. Basic Fibroblast Growth Factor Affects Neuronal Migration and Differentiation in Normotypic Cell Cultures from the Cochleovestibular Ganglion of the Chick Embryo. *Exp. Neurol.* 138, 121–143.

Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736.

Hu, Z., Wei, D., Johansson, C.B., Holmström, N., Duan, M., Frisén, J., Ulfendahl, M., 2005. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the

mature inner ear. *Exp. Cell Res.* 302, 40–47.

Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., Mehlen, P., 2012. Neurotrophins and cell death. *Spec. Issue - Cell Death* 318, 1221–1228.

Incesulu, A., Nadol, J.B., 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, 906–911.

Ishii, T., Toriyama, M., 1977. Sudden Deafness with Severe Loss of Cochlear Neurons. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 86, 541–547.

Jessen, K.R., Mirsky, R., 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671–682.

Jessen, K.R., Mirsky, R., 2002. Signals that determine Schwann cell identity\*. *J. Anat.* 200, 367–376.

Johnson Jr, E.M., Taniuchi, M., DiStefano, P.S., 1988. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.* 11, 299–304.

Jungnickel, J., Claus, P., Gransalke, K., Timmer, M., Grothe, C., 2004. Targeted disruption of the FGF-2 gene affects the response to peripheral nerve injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 444–452.

Jungnickel, J., Haase, K., Konitzer, J., Timmer, M., Grothe, C., 2006. Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. *J. Neurobiol.* 66, 940–948.

J W Fawcett, R. J. Keynes, 1990. Peripheral Nerve Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 43–60.

Key, A., Retzius, G., 1876. Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Samson and Wallin, Stockholm.

Kiryushko, D., Berezin, V., Bock, E., 2004. Regulators of Neurite Outgrowth: Role of Cell Adhesion Molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014, 140–154.

Klagsbrun, M., 1989. The fibroblast growth factor family: Structural and biological properties. *Prog. Growth Factor Res.* 1, 207–235.

Klimaschewski, L., Nindl, W., Feurle, J., Kavakebi, P., Kostron, H., 2004. Basic fibroblast growth factor isoforms promote axonal elongation and branching of adult sensory neurons in vitro. *Neuroscience* 126, 347–353.

Krystosek, A., Seeds, N., 1981. Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science* 213, 1532–1534.

Kühn, M.C., Willenberg, H.S., Schott, M., Papewalis, C., Stumpf, U., Flohé, S., Scherbaum, W.A., Schinner, S., 2012. Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 180–188.

Lang, H., Schulte, B.A., Goddard, J.C., Hedrick, M., Schulte, J.B., Wei, L., Schmiedt, R.A., 2008. Transplantation of Mouse Embryonic Stem Cells into the Cochlea of an Auditory-Neuropathy Animal Model: Effects of Timing after Injury. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 9, 225–240.

Lang, H., Xing, Y., Brown, L.N., Samuvel, D.J., Panganiban, C.H., Havens, L.T., Balasubramanian, S., Wegner, M., Krug, E.L., Barth, J.L., 2015. Neural stem/progenitor cell properties of glial cells in the adult mouse auditory nerve. *Sci. Rep.* 5, 13383.

Laszig, R., Aschendorff, A., Stecker, M., Müller-Deile, J., Maune, S., Dillier, N., Weber, B., Hey, M., Begall, K., Lenarz, T., Battmer, R.-D., Böhm, M., Steffens, T., Strutz, J., Linder, T., Probst, R., Allum, J., Westhofen, M., Doering, W., 2004. Benefits of Bilateral Electrical Stimulation with the Nucleus Cochlear Implant in Adults: 6-Month Postoperative Results. *Otol. Neurotol.* 25.

- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2001. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Lefebvre, P.P., Van De Water, T.R., Weber, T., Rogister, B., Moonen, G., 1991. Growth factor interactions in cultures of dissociated adult acoustic ganglia: neuronotrophic effects. *Brain Res.* 567, 306–312.
- Lenarz, T., 1998. Cochlea-Implantate — Physiologische Grundlagen und klinische Anwendung, in: Lenarz, P.D. med T. (Ed.), *Cochlea-Implantat*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 9–51.
- Levi-Montalcini, R., Hamburger, V., 1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 116, 321–361.
- Lieberman, A.R., 1971. The Axon Reaction: A Review of the Principal Features of Perikaryal Responses to Axon Injury, in: Carl C. Pfeiffer and John R. Smythies (Ed.), *International Review of Neurobiology*. Academic Press, pp. 49–124.
- Li, L., Cleary, S., Mandarano, M.A., Long, W., Birchmeier, C., Jones, F.E., 2002. The breast proto-oncogene, *HRG $\alpha$*  regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland. *Oncogene* 21, 4900–4907.
- Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M., Thoenen, H., 1987. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330, 658–659.
- Linggi, B., Carpenter, G., 2006. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 16, 649–656.
- Lin, L., Koutnouyan, H., Baird, A., Ryan, A.F., 1993. Acidic and basic FGF mRNA expression in the adult and developing rat cochlea. *Hear. Res.* 69, 182–193.
- Liu, H.M., 1974. Schwann Cell Properties. *Am. J. Pathol.* 75, 395–416.

- Liu, Z., Gao, W., Wang, Y., Zhang, W., Liu, H., Li, Z., 2011a. Neuregulin-1 $\beta$  regulates outgrowth of neurites and migration of neurofilament 200 neurons from dorsal root ganglial explants in vitro. *Peptides* 32, 1244–1248.
- Lousteau, R.J., 1987. Increased spiral ganglion cell survival in electrically stimulated, deafened guinea pig cochleae. *The Laryngoscope* 97, 836–842.
- Low, W., Dazert, S., Baird, A., Ryan, A.F., 1996. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. *J. Cell. Physiol.* 167, 443–450.
- Lubinska, L., 1977. Early course of wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res. Volume* 130, 47–63.
- Lundborg, G., 1987. Nerve regeneration and repair: A review. *Acta Orthop. Scand.* 58:2, 145–169.
- Luo, L., Moore, J.K., Baird, A., Ryan, A.F., 1995. Expression of acidic FGF mRNA in rat auditory brainstem during postnatal maturation. *Dev. Brain Res.* 86, 24–34.
- Mahanthappa, N.K., Anton, E.S., Matthew, W.D., 1996. Glial Growth Factor 2, a Soluble Neuregulin, Directly Increases Schwann Cell Motility and Indirectly Promotes Neurite Outgrowth. *J. Neurosci.* 16, 4673–4683.
- Malekpour, M., Shahidi, A., Khorsandi Ashtiani, M.T., Motasaddi Zarandy, M., 2007. Novel syndrome of cataracts, retinitis pigmentosa, late onset deafness and sperm abnormalities: A new Usher syndrome subtype with X-linked inheritance? *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1646–1652.
- Marzella, P.L., Gillespie, L.N., Clark, G.M., Bartlett, P.F., Kilpatrick, T.J., 1999. The neurotrophins act synergistically with LIF and members of the TGF- $\beta$  superfamily to promote the survival of spiral ganglia neurons in vitro. *Hear. Res.* 138, 73–80.
- Ma, Z., Wang, J., Song, F., Loeb, J.A., 2011. Critical Period of Axoglial Signaling

between Neuregulin-1 and Brain-Derived Neurotrophic Factor Required for Early Schwann Cell Survival and Differentiation. *J. Neurosci.* 31, 9630–9640.

McFarlane, S., Cornel, E., Amaya, E., Holt, C.E., 1996. Inhibition of FGF Receptor Activity in Retinal Ganglion Cell Axons Causes Errors in Target Recognition. *Neuron* 17, 245–254.

Meintanis, S., Thomaidou, D., Jessen, K.R., Mirsky, R., Matsas, R., 2001. The neuron–glia signal  $\beta$ -neuregulin promotes Schwann cell motility via the MAPK pathway. *Glia* 34, 39–51.

Miller, J.M., Le Prell, C.G., Prieskorn, D.M., Wys, N.L., Altschuler, R.A., 2007. Delayed neurotrophin treatment following deafness rescues spiral ganglion cells from death and promotes regrowth of auditory nerve peripheral processes: Effects of brain-derived neurotrophic factor and fibroblast growth factor. *J. Neurosci. Res.* 85, 1959–1969.

Montero, J.C., Rodríguez-Barrueco, R., Ocaña, A., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A., Pandiella, A., 2008. Neuregulins and Cancer. *Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 3237–3241.

Morgan, L., Jessen, K.R., Mirsky, R., 1994. Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3. *Development* 120, 1399–1409.

Mou, K., Hunsberger, C.L., Cleary, J.M., Davis, R.L., 1997. Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 386, 529–539.

Mumenthaler, M., Schliack, H., Stöhr, M., 2014. *Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome*, 9. Auflage. ed. Georg Thieme, Stuttgart.

Murphy, P.R., Myal, Y., Sato, Y., Sato, R., West, M., Friesen, H.G., 1989. Elevated Expression of Basic Fibroblast Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid in Acoustic

Neuromas. *Mol. Endocrinol.* 3, 225–231.

Nabel, E.G., Yang, Z., Plautz, G., Forough, R., Zhan, X., Haudenschild, C.C., Maciag, T., Nabel, G.J., 1993. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 362, 844–846.

Nadol, J.B., Young, Y.-S., Glynn, R.J., 1989. Survival of Spiral Ganglion Cells in Profound Sensorineural Hearing Loss: Implications for Cochlear Implantation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 98, 411–416.

Nakagawara, A., 2001. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 169, 107–114.

Nathaniel, E.J.H., Pease, D.C., 1963. Regenerative changes in rat dorsal roots following wallerian degeneration. *J. Ultrastruct. Res.* 9, 533–549.

Nave, K.-A., Trapp, B.D., 2008. Axon-Glial Signaling and the Glial Support of Axon Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 535–561.

Netter F., *Anatomie des menschlichen Ohres*, Netters Klinische Anatomie, modifiziert nach T. Hansen, R. Lambert, 2. Aufl., 2004, Thieme

Noushi, F., Richardson, R.T., Hardman, J., Clark, G., O’Leary, S., 2005. Delivery of Neurotrophin-3 to the Cochlea using Alginate Beads. *Otol. Neurotol.* 26.

Ohinata, Y., Miller, J.M., Altschuler, R.A., Schacht, J., 2000. Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res.* 878, 163–173.

Okano, T., Nakagawa, T., Endo, T., Kim, T.-S., Kita, T., Tamura, T., Matsumoto, M., Ohno, T., Sakamoto, T., Iguchi, F., Ito, J., 2005. Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *NeuroReport* 16.

Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., Mc Ewen, D.G., MacArthur, C.A., 1996. Receptor

Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *J. Biol. Chem.* 271, 15292–19297.

Otte, J., Schuknecht, H.F., Kerr, A.G., 1978. Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation. *The Laryngoscope* 88, 1231–1246.

Pauler, M., Schuknecht, H.F., Thornton, A.R., 1986. Correlative studies of cochlear neuronal loss with speech discrimination and pure-tone thresholds. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243, 200–206.

Perlin, J.R., Lush, M.E., Stephens, W.Z., Piotrowski, T., Talbot, W.S., 2011. Neuronal Neuregulin 1 type III directs Schwann cell migration. *Development* 138, 4639–4648.

Perry, V.H., Brown, M.C., Gordon, S., 1987. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.* 165, 1218–1223.

Pettingill, L.N., Minter, R.L., Shepherd, R.K., 2008. Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro. *Neuroscience* 152, 821–828.

Pickles, J., 2001. The expression of fibroblast growth factors and their receptors in the embryonic and neonatal mouse inner ear. *Hear. Res.* 155, 54–62.

Pinkas-Kramarski, R., Eilam, R., Alroy, I., Levkowitz, G., Lonai, P., Yarden, Y., 1997. Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* 15, 2803–2815.

Pirvola, U., Cao, Y., Oellig, C., Suoqiang, Z., Pettersson, R.F., Ylikoski, J., 1995. The site of action of neuronal acidic fibroblast growth factor is the organ of Corti of the rat cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9269–9273.

Puel, J.-L., Ruel, J., d’Aldin, C.G., Pujol, R., 1998. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *NeuroReport* 9.

Ramekers, D., Versnel, H., Grolman, W., Klis, S.F.L., 2012. Neurotrophins and their role in the cochlea. *Annu. Rev.* 288, 19–33.

Ramon y Cajal, S., 1928. Degeneration and regeneration of the nervous system.

Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1545–1564.

Reichardt, L.F., Bixby, J.L., Hall, D.E., Ignatius, M.J., Neugebauer, K.M., Tomaselli, K.J., 1989. Integrins and Cell Adhesion Molecules: Neuronal Receptors That Regulate Axon Growth on Extracellular Matrices and Cell Surfaces. *Dev. Neurosci.* 11, 332–347.

Reinhard, S., Vela, E., Bombara, N., DeVries, G.H., Raabe, T.D., 2009. Developmental Regulation of Neuregulin1 Isoforms and erbB Receptor Expression in Intact Rat Dorsal Root Ganglia. *Neurochem. Res.* 34, 17–22.

Richardson, R.T., O’Leary, S., Wise, A., Hardman, J., Clark, G., 2005. A single dose of neurotrophin-3 to the cochlea surrounds spiral ganglion neurons and provides trophic support. *Hear. Res.* 204, 37–47.

Richardson, R.T., Wise, A.K., Thompson, B.C., Flynn, B.O., Atkinson, P.J., Fretwell, N.J., Fallon, J.B., Wallace, G.G., Shepherd, R.K., Clark, G.M., O’Leary, S.J., 2009. Polypyrrole-coated electrodes for the delivery of charge and neurotrophins to cochlear neurons. *Biomaterials* 30, 2614–2624.

Roberson, D.W., Rubel, E.W., 1994. Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *Otol. Neurotol.* 15.

Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Barde, Y.-A., 1991. Neurotrophins: Structural Relatedness and Receptor Interactions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 331, 255–258.

Salzer, J.L., Bunge, R.P., 1980. Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in

tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury. *J. Cell Biol.* 84, 739–752.

Schuknecht H., *Querschnitt durch den Canalis spiralis cochleae* nach Courtesy of Davis, 1962, *Pathology of the ear*, 1974, Harvard University Press

Scott, C.A., Kelsell, D.P., 2011. Key functions for gap junctions in skin and hearing. *Biochem. J.* 438, 245–254.

Seckel, B.R., 1990. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 13, 785–800.

Seiler, N., Schröder, M., 1970. Relations between polyamines and nucleic acids. II. Biochemical and fine structural studies on peripheral nerve during Wallerian degeneration. *Brain Res.* 22, 81–103.

Seow, Y., Wood, M.J., 2009. Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors. *Mol Ther* 17, 767–777.

Shepherd, R.K., Coco, A., Epp, S.B., Crook, J.M., 2005. Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J. Comp. Neurol.* 486, 145–158.

Shepherd, R.K., Javel, E., 1997. Electrical stimulation of the auditory nerve. I. Correlation of physiological responses with cochlear status. *Hear. Res.* 108, 112–144.

Sobkowicz, H.M., Loftus, J.M., Slapnick, S.M., 1993. Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 502, 3–36.

Spoendlin, H., 1983. Factors inducing retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.* 112, 76–82.

Spoendlin, H., 1975. Retrograde Degeneration of the Cochlear Nerve. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 79, 266–275.

Staecker, H., Kopke, R., Malgrange, B., Lefebvre, P., Van De Water, T.R., 1996. NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *NeuroReport* 7.

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. *J. Neurosci.* 24, 8651.

Stoll, G., Griffin, J.W., Li, C.Y., Trapp, B.D., 1989. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* 18, 671–683.

Sunderland, S., 1951. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 491–516.

Suzuka, Y., Schuknecht, H.F., 1988. Retrograde Cochlear Neuronal Degeneration in Human Subjects. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*.

Szebenyi, G., Dent, E.W., Callaway, J.L., Seys, C., Lueth, H., Kalil, K., 2001. Fibroblast Growth Factor-2 Promotes Axon Branching of Cortical Neurons by Influencing Morphology and Behavior of the Primary Growth Cone. *J. Neurosci.* 21, 3932–3941.

Tan, J., Wang, Y., Yip, X., Glynn, F., Shepherd, R.K., Caruso, F., 2012. Nanoporous Peptide Particles for Encapsulating and Releasing Neurotrophic Factors in an Animal Model of Neurodegeneration. *Adv. Mater.* 24, 3362–3366.

Teng, K.K., Felice, S., Kim, T., Hempstead, B.L., 2010. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev. Neurobiol.* 70, 350–359.

Thomas, K.A., 1987. Fibroblast growth factors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1, 434–440.

Thornton, S., Mueller, S., Levine, E., 1983. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222, 623–625.

Timmer, M., Müller-Ostermeyer, F., Kloth, V., Winkler, C., Grothe, C., Nikkhah, G., 2004. Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Abstr. Elev. Annu. Conf. Am. Soc. Neural Transplant. Repair* 187, 118–136.

Timmer, M., Robben, S., Müller-Ostermeyer, F., Nikkah, G., C. Grothe, 2003a. Axonal Regeneration Across Long Gaps in Silicone Chambers Filled With Schwann Cells Overexpressing High Molecular Weight FGF-2. *Cell Transplant.* 265–277.

Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R., 1979. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933.

Tomaselli, K.J., Reichardt, L.F., 1988. Peripheral motoneuron interactions with laminin and schwann cell-derived neurite-promoting molecules: Developmental regulation of laminin receptor function. *J. Neurosci. Res.* 21, 275–285.

Torigoe, K., Tanaka, H.-F., Takahashi, A., Awaya, A., Hashimoto, K., 1996. Basic Behavior of Migratory Schwann Cells in Peripheral Nerve Regeneration. *Exp. Neurol.* 137, 301–308.

Trigg, D.J., O'Grady, K.M., Bhattacharyya, T., Reinke, M., Toriumi, D.M., 1998. Peripheral nerve regeneration: comparison of laminin and acidic fibroblast growth factor. *Am. J. Otolaryngol.* 19, 29–32.

Turner, N., Grose, R., 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 116–129.

Unsicker, K., Reichert-Preibsch, H., Schmidt, R., Pettmann, B., Labourdette, G., Sensenbrenner, M., 1987. Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. 84, 5459–5463.

Vahlsing, H.L., Hagg, T., Spencer, M., Conner, J.M., Manthorpe, M., Varon, S., 1991. Dose-dependent responses to nerve growth factor by adult rat cholinergic medial septum and neostriatum neurons. *Brain Res.* 552, 320–329.

Van de Heyning, P., Vermeire, K., Diebl, M., Nopp, P., Anderson, I., De Ridder, D., 2008. Incapacitating Unilateral Tinnitus in Single-Sided Deafness Treated by Cochlear Implantation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 117, 645–652.

Van De Water, T.R., Ruben, R.J., 1971. Organ Culture of the Mammalian Inner Ear. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) 71, 303–312.

Waller, A., 1850. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres, in: *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* pp. 423–429.

Walter, M., R Koruglu, JB Caulfield, 1993. Enhanced peripheral nerve regeneration by acidic fibroblast growth factor. *Lymphokine Cytokine Res.* Vol 12(3), 135–141.

Wang, S.J., Furusho, M., D'Sa, C., Kuwada, S., Conti, L., Morest, D.K., Bansal, R., 2009. Inactivation of fibroblast growth factor receptor signaling in myelinating glial cells results in significant loss of adult spiral ganglion neurons accompanied by age-related hearing impairment. *J. Neurosci. Res.* 87, 3428–3437.

Watabe, K., Fukuda, T., Tanaka, J., Honda, H., Toyohara, K., Sakai, O., 1995. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities. *J. Neurosci. Res.* 41, 279–290.

Watabe, K., Fukuda, T., Tanaka, J., Toyohara, K., Sakai, O., 1994. Mitogenic effects of platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta, and heparin-binding serum factor for adult mouse Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* 39, 525–534.

Wesche, J., Haglund, K., Haugsten, E.M., 2011. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem. J.* 437, 199–213.

Wheeler, E.F., Bothwell, M., Schecterson, L.C., von Bartheld, C.S., 1994. Expression of BDNF and NT-3 mRNA in hair cells of the organ of Corti: Quantitative analysis in developing rats. *Hear. Res.* 73, 46–56.

Widera, D., Heimann, P., Zander, C., Imielski, Y., Heidbreder, M., Heilemann, M., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., 2011. Schwann Cells Can Be Reprogrammed to Multipotency by Culture. *Stem Cells Dev.* 20, 2053–2064.

Winkler, J., Ramirez, G.A., Kuhn, H.G., Peterson, D.A., Day-Lollini, P.A., Stewart, G.R., Tuszynski, M.H., Gage, F.H., Thal, L.J., 1997. Reversible schwann cell hyperplasia and sprouting of sensory and sympathetic neurites after intraventricular administration of nerve growth factor. *Ann. Neurol.* 41, 82–93.

Winkler, J., Thal, L.J., 1995. Effects of Nerve Growth Factor Treatment on Rats with Lesions of the Nucleus Basalis Magnocellularis Produced by Ibotenic Acid, Quisqualic Acid, and AMPA. *Exp. Neurol.* 136, 234–250.

Wise, A.K., Gillespie, L.N., 2012. Drug delivery to the inner ear. *J. Neural Eng.* 9.

Wise, A.K., Hume, C.R., Flynn, B.O., Jeelall, Y.S., Suhr, C.L., Sgro, B.E., O’Leary, S.J., Shepherd, R.K., Richardson, R.T., 2010. Effects of Localized Neurotrophin Gene Expression on Spiral Ganglion Neuron Resprouting in the Deafened Cochlea. *Mol Ther* 18, 1111–1122.

Ylikoski, J., Pirvola, U., Moshnyakov, M., Palgi, J., Arumäe, U., Saarma, M., 1993. Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hear. Res.* 65, 69–78.

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. *Hear. Res.*

298, 1–9.

Zimmermann, C.E., Burgess, B.J., Nadol Jr., J.B., 1995. Patterns of degeneration in the human cochlear nerve. *Hear. Res.* 90, 192–201.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Anatomie des menschlichen Ohres nach F. Netter. ....	2
Abbildung 1.2 Querschnitt durch den Canalis spiralis cochleae .....	4
Abbildung 1.3 Cochlea-Implantat System mit intracochleärem Elektrodenträger in der Scala tympani.....	13
Abbildung 2.1 2 x 8 well chamber slide .....	27
Abbildung 2.2 Screenshot einer digitalen Längenmessung der Spiralganglienneuriten.	31
Abbildung 3.1 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (20 ng/ml). ....	34
Abbildung 3.2 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (1 ng/ml) .....	35
Abbildung 3.3 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (a, b, d: 5 ng/ml, c: 10 ng/ml).....	36
Abbildung 3.4 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (5 ng/ml). ....	37
Abbildung 3.5 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-1 (10 ng/ml) .....	37
Abbildung 3.6 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-2 (5 ng/ml). ....	39
Abbildung 3.7 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-2 (1 ng/ml). ....	40
Abbildung 3.8 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von FGF-2 (5 ng/ml) (a) und FGF-2 (10 ng/ml) (b).....	41
Abbildung 3.9 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (20 ng/ml) .....	43
Abbildung 3.10 a, b Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (200 ng/ml).....	44

Abbildung 3.11 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (20 ng/ml).....	45
Abbildung 3.12 Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (200 ng/ml).....	46
Abbildung 3.13 a, b Immunfluoreszenzaufnahme eines Spiralganglienzell-explantates nach einer Kulturdauer von 72 Stunden und Zugabe von NRG-1 (a: 50 ng/ml, b: 100 ng/ml).....	47
Abbildung 3.14 Mittelwerte der Neuritenlängen in $\mu\text{m}$ und Standardfehler in verschiedenen Konzentrationsstufen unter Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-1 und in der Kontrollgruppe.....	50
Abbildung 3.15 Mittelwerte der Neuritenlängen in $\mu\text{m}$ und Standardfehler in verschiedenen Konzentrationsstufen unter Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 und in der Kontrollgruppe.....	51
Abbildung 3.16 Mittelwerte der Neuritenlängen in $\mu\text{m}$ und Standardfehler in verschiedenen Konzentrationsstufen unter Einfluss von Neuregulin-1 und in der Kontrollgruppe.....	52
Abbildung 3.17 Mittelwerte der Längen glialer Zellausläufer in $\mu\text{m}$ und Standardfehler nach Zugabe von FGF-1 1 ng/ml, FGF-2 10 ng/ml, NRG-1 200 ng/ml und in der Kontrollgruppe.....	54
Abbildung 3.18 Mittelwerte der Anzahl glialer Zellausläufer und Standardfehler unter FGF-1 (5 ng/ml), FGF-2 (5 ng/ml), NRG-1 (20 ng/ml) und in der Kontrollgruppe.....	55
Abbildung 3.19 Mittelwerte des Abstandes glialer Zellkörper in $\mu\text{m}$ und Standardfehler unter FGF-1 (5 ng/ml), FGF-2 (5 ng/ml), NRG-1(20 ng/ml) und in der Kontrollgruppe .....	56

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte mit Herstellerangaben .....	23
Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 2.3 Beschichtungen .....	24
Tabelle 2.4 Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 2.5 Verwendete Puffer und Nährmedien .....	24
Tabelle 2.6 Verwendete Antikörper, Immunfluoreszenz.....	25
Tabelle 2.7 Verwendete Neurotrophine.....	25
Tabelle 3.1 Mittelwerte der Neuritenlängen in $\mu\text{m}$ und Standardfehler in den verschiedenen Konzentrationsstufen .....	48

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med Stefan Hansen, für seine fachliche, wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke Michael für die ständige emotionale Unterstützung und die Hilfe bei diversen Fragen an die digitale Textverarbeitungssoftware.

Zuletzt danke ich besonders meinen Eltern, die immer für mich da sind und mir mein Studium auf Umwegen ermöglicht haben.