

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

Die Expression und Funktion von NRG1 und ErbB3 in der Cochlea von Mäusen

Dissertation

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

vorgelegt von
Diana Lang
2020

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. Jan F. Cornelius

Zusammenfassung

Hintergrund

Schwannzellen spielen als Gliazellen eine wichtige Rolle bei der Nerven-Gliazell-Interaktion. Sie ummanteln Axone und sezernieren Neurotrophine, welche bei der Regeneration und dem Wachstum von Axonen z.B. nach Schädigung von Bedeutung sind. Neuregulin-1 (NRG1) gehört zu der Gruppe der Neurotrophine und ist ein wichtiges Axon-Gliazell Signalprotein, das an den Tyrosinkinase Rezeptor ErbB als Ligand bindet.

Ziele

In dieser Arbeit soll die Rolle von NRG1/ErbB3 im Innenohr untersucht werden, um dessen möglichen Einfluss auf die Entwicklung, Degeneration und Regeneration des Hörnervs im Hinblick auf Ertaubung zu erfassen.

Material und Methoden

Mithilfe immunhistochemischer Verfahren wurden die Expressionsmuster von NRG1 und ErbB3 im Innenohr von Mäusen untersucht. Weiterhin wurden Zellkulturen von Spiralganglienexplantaten aus neugeborenen Mäusen angelegt, um die dosisabhängige Wirkung von NRG1 als Liganden und des Pan-ErbB-Inhibitors Canertinib (CI-1033) auf die Interaktion der nicht-neuronalen Zellen und Neuriten sowie das Überleben und Wachstumsverhalten der Spiralganglienneurone zu untersuchen.

Ergebnisse

Die Auswertungen zeigten unterschiedliche Expressionsmuster von NRG1 und ErbB3 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Innenohrs. Ferner konnte in Spiralganglien-Organokulturen ein durch NRG1 induziertes konzentrationsabhängiges Wachstum von Spiralganglienzellen und Schwannzellen sowie eine konzentrationsabhängige Inhibition dieser beiden Zellen durch den Pan-ErbB-Rezeptor-Inhibitor Canertinib demonstriert werden.

Fazit

NRG1 und ErbB scheinen eine essentielle Rolle bei der Neuronen-Schwannzell-Interaktion des Innenohrs zu spielen und könnten damit eine wichtige Rolle in zukünftigen Therapiestrategien zum Erhalt und der Regeneration des Hörnervs spielen.

Abstract

Background

Schwann cells are glia cells that play a key role in the nerve-glia cell interaction. They enwrap axons and secrete neurotrophic factors and are involved in regeneration and outgrowth of axons after nerve injury. Neuregulin-1 (NRG1) belongs to the group of neurotrophic factors and is an important axon-glia signaling protein that binds to the tyrosine kinase receptor ErbB as a ligand.

Objective

The objective of this study is to investigate the role of NRG1/ErbB in the inner ear, which may provide important evidence for the development, degeneration and regeneration of the auditory nerve regarding deafness.

Material and methods

For this purpose, the expression patterns of NRG1 and ErbB3 in the inner ear of mice have been analysed by immunohistochemistry. In addition, cell cultures have demonstrated how NRG1 affects the interaction of non-neuronal cells and neurites as well as the survival and growth behaviour of spiral ganglion neurons through the pan-ErbB receptor inhibitor canertinib (CI-1033). Additionally, the effects of NRG1 and canertinib on the spiral ganglion cell culture were investigated on a dose-dependent manner.

Results

The immunohistochemistry showed different expression patterns of NRG1 and ErbB3 depending on the developmental stage of the inner ear. Furthermore, in spiral ganglion organ cultures a NRG1-induced dose-dependent growth of spiral ganglion cells and Schwann cells and a dose-dependent inhibition by the ErbB receptor inhibitor canertinib could be demonstrated.

Conclusion

NRG1 and ErbB appear to play an essential role in the neuron-schwann cell interaction of the inner ear and may be important for future therapies to maintain or regenerate the auditory nerve.

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
Anti-Myo	7a. Anti-Myosin VIIa
Anti-NGF	Anti-Nerve Growth Faktor Rezeptor
CI-1033	Canertinib
DAPI.....	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNQX.....	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
DPBS	dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF.....	epidermal growth factor
GlutaMAX.....	L-glutamin, L-alanyl-L-glutamin
HCL.....	Chlorwasserstoff
HEPES.....	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure- Puffer
HRG1	Heregulin1
HSD	Honestly Significant Difference
IBM.....	International Business Machines
JPEG.....	Joint Fotographics Experts Groups
M	Molar
mm	Milimeter
NT-3	Neurotrophin 3
O.C.T.	optimum cutting temperature
p75NTR.....	p75 Neurotrophin Rezeptor
PBS.....	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ZNS.....	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter
µM.....	Mikromolar
µm.....	Mikrometer
µm².....	Quadratmikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Physiologie des auditiven Systems	1
1.1.1	Die Cochlea	2
1.1.2	Das Spiralganglion	3
1.1.3	Gliazellen im Innenohr und ihre Funktion	4
1.2	Neuregulin-1	5
1.3	NRG1/ErbB Signalweg	6
1.3.1	Unterschiede in der Proliferation und Überleben von Schwannzellen	8
1.3.2	Einfluss von NRG1 auf die Regeneration und das Wachstum von Neuriten	9
1.4	Die Rolle des NRG1/ErbB Signalweges im Innenohr	10
1.4.1	Einfluss des Pan-ErbB-Inhibitor Canertinib (CI-1033) auf NRG1/ErbB im Innenohr	11
1.5	Sensorineurale Schwerhörigkeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Organkulturen	13
2.1.1	Versuchstiere	13
2.1.2	Präparation der Cochlea und der Spiralganglienzellen	13
2.1.3	Spiralganglienzellkultur und Kultivierung der Neuriten	14
2.1.4	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung	16
2.1.5	Mikroskopie der Explantate	18
2.1.6	Dokumentation des Wachstumsverhaltens von Neuriten und Schwannzellen	18
2.1.7	Messung der Zelldichte	19
2.1.8	Statistische Auswertung	20
2.2	Kryoschnitte Cochlea	20
2.2.1	Präparation und Kryokonservierung	20
2.2.2	Anfertigen der Kryoschnitte	21
2.2.3	Immunfluoreszenz	21
3	Ergebnisse	24
3.1	Expression von NRG1 und ErbB3 in der Cochlea	24
3.1.1	Expression von NRG1 in der Cochlea	24
3.2	Expression von ErbB3 in der Cochlea	30

3.2.1	Überblick.....	33
3.3	Organkulturen.....	35
3.3.1	Expression von NRG1 und ErbB3 in Organkulturen von Spiralganglienzellen	35
3.3.2	Einfluss von NRG1 auf das Auswachsen von Neuriten in Organkulturen von Spiralganglienzellen	36
3.3.3	Einfluss des Pan-ErbB-Inhibitors CI-1033 auf das Auswachsen von Neuriten in Organkulturen von Spiralganglienzellen.....	40
3.3.4	Einfluss von NRG1 und CI-1033 auf das Migrationsverhalten von p75NTR-positiven und p75NTR-negativen Zellen in Organkulturen von Spiralganglienzellen	44
4	Diskussion.....	47
4.1	Expression von NRG1 und ErbB3 in der Cochlea.....	47
4.1.1	Der Einfluss von NRG1 auf nicht-neuronale Zellen und Neuriten in der Spiralganglienzell-Organkultur	50
4.1.2	Der Einfluss von CI-1033 auf nicht-neuronale Zellen und Neuriten in der Spiralganglienzell-Organkultur.....	53
4.2	Material und Methoden	56
4.3	Klinische Relevanz und Ausblick	56

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des auditiven Systems

Zum auditiven System des Innenohrs gehören insbesondere das Corti-Organ, Nervengewebe in Form von Spiralganglienneuronen sowie nicht-neuronale Gliazellen. Das Innenohr stellt eine wichtige Schnittstelle zwischen peripherem und zentralem Nervensystem dar und nimmt ferner eine zentrale Stellung in der Forschung der Ertaubung ein.



Abb. 1: Innenohr

(Paulsen, Friedrich und Waschke, Jens. (2010). Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 3, 138).

Anatomische Verhältnisse des äußeren Gehörgangs, des Mittelohrs (Trommelfell, Gehörknöchelchen und Paukenhöhle (Cavitas tympani), welche über die Tuba auditiva belüftet wird) sowie des Innenohrs (Cochlea, Vestibularorgan (Canales semicirculares), Maculaorgane (Utrikulus und Sacculus) und N. vestibulocochlearis).

Die akustischen Informationen werden im Säugerohr detektiert, verarbeitet und anschließend an das zentrale Nervensystem weitergeleitet. Das Ohr gliedert sich in drei Teile; das äußere Ohr, das Mittelohr sowie das Innenohr. Das äußere Ohr dient aufgrund seiner Form der Aufnahme, Reflexion und Bündelung von Schallwellen. Die dorthin gelangenden Schallwellen werden über den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell (Membrana tympanica) weitergeleitet. Es bildet die Grenze zum Mittelohr. Der Schalldruck wird über das Trommelfell und die im

Mittelohr befindliche Gehörknöchelchenkette (*Malleus*, *Incus* und *Stapes*) auf das Innenohr übertragen.

1.1.1 Die Cochlea

Das Innenohr grenzt unmittelbar an das Mittelohr und besteht aus der Cochlea und dem Vestibularorgan. Sie befinden sich beide in der Pars petrosa ossis temporalis im Felsenbein an der Basis des Schläfenbeins und liegen dort als empfindliche Sinnesorgane besonders gut geschützt. In der Cochlea lässt sich die Schneckenbasis (*Basis cochleae*) von der Schneckenspitze (*Cupula cochleae*) unterscheiden. An der *Basis cochleae* befindet sich der *Modiolus cochleae*, die knöcherne Achse der Cochlea, welche zugleich als Leitstruktur für den *N. cochlearis* dient. Das häutige Labyrinth der Cochlea bildet den *Canalis spiralis cochleae*; eine röhrenförmige Spirale, die sich um den *Modiolus* windet.

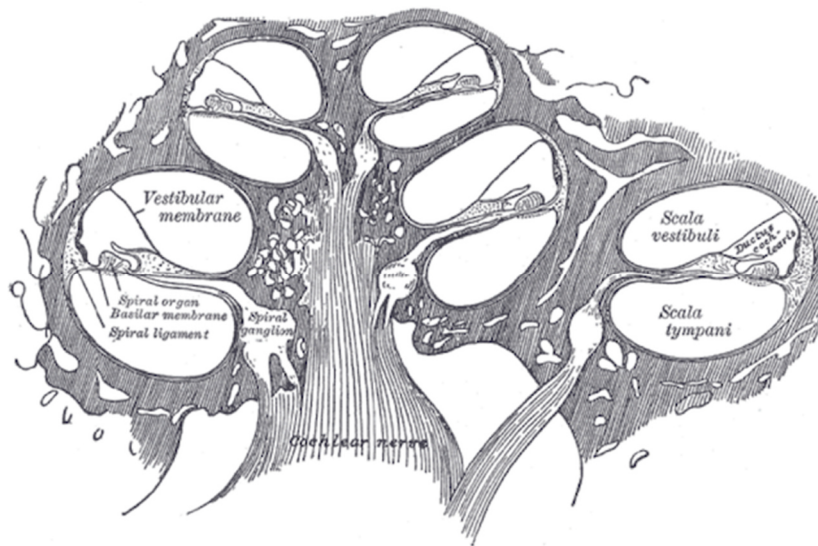


Abb. 2: Cochlea

(Gray, Henry. (1918). *Anatomy of the Human Body*, figure 928). Längsschnitt durch die Cochlea.

Der *Canalis spiralis cochleae* enthält den aus Endolymphe bestehenden *Ductus cochlearis* (*Scala media*), welcher durch die *Reissner-Membran* (*Membrana vestibularis*) von der *Scala vestibularis* und durch die *Basilarmembran* von der *Scala tympani* getrennt ist.

Der *Ductus cochlearis* wird nach außen vom *Ligamentum spirale* und der *Stria vascularis* begrenzt und beinhaltet das *Corti-Organ* (*Spiral organ* in Abb. 2).

Das Corti-Organ besteht aus den Stützzellen, die sich aus den Pfeilerzellen, die den Corti-Kanal begrenzen, den basalen Deiters-Zellen sowie den lateralen Hensen-Zellen und Claudius-Zellen zusammensetzen. Sie stützen die inneren und äußeren Haarzellen und umfassen die unmyelinisierten distalen Fortsätze der Spiralganglienneuriten.

Die inneren Haarzellen befinden sich im Vergleich zu den äußeren Haarzellen weiter proximal zu den Spiralganglienneuriten lokalisiert. Es handelt sich bei diesen Zellen um Mechanorezeptoren, welche die akustischen Informationen detektieren und als elektrische Impulse in Form von Aktionspotentialen an den Nervus cochlearis weiterleiten. Die inneren Haarzellen sind hierbei die eigentlichen sensorischen Rezeptoren, welche von den äußeren Haarzellen in Form von Schallverstärkung unterstützt werden. Die Dysfunktion der Haarzellen in den basalen Abschnitten der Cochlea ist ein häufiger Grund für Ertaubung im höheren Alter. So führt eine Degeneration der dortigen Zellen zunächst zu einer Schwerhörigkeit für höhere Frequenzen (Kommareddi et al., 2015) wie sie bei einer Presbyakusis typisch ist.

1.1.2 Das Spiralganglion

Die Haarzellen dienen als Sinneszellen der Reizverarbeitung. Sie leiten elektrische Impulse an die Dendriten des Ganglion spirale weiter, welches sich im Rosenthalkanal des Corti-Organs in der Nähe des Modiolus befindet. Die peripheren Dendriten erreichen und verlassen das Corti-Organ durch die Basilarmembran über die Habenula perforata.

Im Ganglion spirale befinden sich die Somata der bipolaren Spiralganglienneurone. Sie sind die ersten Neurone des auditorischen Systems. Mit ihren zentralen Axonen bilden sie den Nervus cochlearis, welcher die elektrischen Impulse an die Hörnervenkerne im Hirnstamm weiterleitet. Es lassen sich zwei Arten von Spiralganglienneuronen unterscheiden. Typ I Spiralganglienneurone bilden mit einem Anteil von 90-95% die Mehrheit der Zellen. Sie sind relativ groß, myelinisiert und innervieren die inneren Haarzellen. Den Rest bilden mit 5-10 % die kleineren Typ II Spiralganglienneurone. Diese entsenden ihre dünnen, unmyelinisierten Dendriten zu den äußeren Haarzellen. (Spoendlin, 1972)

1.1.3 Gliazellen im Innenohr und ihre Funktion

Gliazellen sind nicht-neuronale Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems und entstammen wie Neurone aus der Neuralleiste. Zu Ihren Aufgaben gehören unter anderem die Myelinisierung und Isolation der Neurone, die Stützfunktion des Nervengewebes, die Modulation von Transport- und Entzündungsprozessen sowie eine Ernährungs- und Regenerationsfunktion.

Weiterhin sind Gliazellen am Aufbau von funktionellen Barrieren zwischen peripherem und zentralem Nervensystem wie der Glia limitans beteiligt. Die Glia limitans markiert den Übergang zwischen peripherem und zentralem Myelin des Nervus cochlearis (Toesca, 1996). Sie wird von Oligodendrozyten und Schwannzellen gebildet (Fraher and Kaar, 1984, Fraher, 2000). Oligodendrozyten gehören mit Astrozyten, Mikroglia und Ependymzellen zu den Gliazellen des zentralen Nervensystems. Schwannzellen und Satellitenzellen hingegen gehören zu den Gliazellen des peripheren Nervensystems und gehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervor (Locher et al., 2014).

Satellitenzellen umhüllen die Somata von sensorischen und autonomen Ganglienzellen und scheinen miteinander und mit den Neuronen zu kommunizieren, welche sie umhüllen (Hanani, 2010). Die Somata von Ganglienzellen des Spiralganglions von Ratten beispielsweise werden von vielen dünnen Schichten Myelin umhüllt, welches sich von der normalen Myelinschicht der Axone, die durch Schwannzellen gebildet wird, unterscheidet (Rosenbluth, 1962).

Die Schwannzellen stellen die Hauptgruppe der Gliazellen des peripheren Nervensystems dar. Es lassen sich nicht-myelinisierende von myelinisierenden Schwannzellen differenzieren. Nicht-myelinisierende Schwannzellen können mehrere sensorische Neurone umschließen und scheinen eine wichtige Rolle für das Überleben der sensorischen Neurone des Ganglion spirale zu spielen (Chen et al., 2003).

Die myelinisierenden Schwannzellen sind unter anderem für die Bildung der Myelinschicht von peripheren Axonen zuständig. Hierbei wird stets ein Axon von einer Schwannzelle umschlossen.

Die Myelinisierung der Neurone beginnt ausgehend von den Somata der Spiralganglienzellen bereits ab dem postnatalen Tag 0 und schreitet peripher in

Richtung Corti-Organ und zentral in Richtung Glia limitans fort. Die Neuriten des zentralen Nervensystems werden ab dem postnatalen Tag 7-8 myelinisiert und erreichen im Bereich der Glia limitans eine ausgereifte und vollständige Myelinisierung ab dem postnatalen Tag 14. Die Myelinisierung der Dendriten und Axone des Spiralganglions von Mäusen beginnt allmählich postnatal ab Tag 8-10 und erreicht ebenfalls am postnatalen Tag 14 ein ausgereiftes Stadium. (Wang et al., 2013)

Insgesamt sind jedoch die genauen Prozesse der Myelinisierung der peripheren Neuriten, der Glia limitans sowie der Axone des zentralen Nervensystems und der Gliazellen, welche diese initiieren, noch nicht vollständig verstanden.

Die Schwannzell-Differenzierung und Proliferation aus ihren unreifen Vorläuferzellen benötigt die Anwesenheit von Neuronen (Jessen and Mirsky, 2005), welche auf der Oberfläche ihrer Axone Neuregulin-1 (NRG1) exprimieren (Morrissey et al., 1995). NRG1 ist für das Überleben der unreifen Vorläufer-Schwannzellen essentiell (Dong et al., 1995). Reife Schwannzellen können im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen auch ohne neuronale Signale überleben. Sie umgehen den programmierten Zelltod durch einen autokrinen Regelkreislauf mithilfe der Faktoren *insulin-like growth factors* (IGFs), *platelet derived growth factor* (PDGF) und *neurotrophin-3* (NT-3) (Meier et al., 1999).

Untersuchungen der letzten Zeit haben gezeigt, dass Neuregulin und sein Rezeptor ErbB als Schlüsselmediatoren in der Schwannzell-Entwicklung fungieren.

1.2 Neuregulin-1

Neureguline sind Wachstumsfaktoren und Signalproteine, die eine tragende Rolle in der Zell-Zell-Interaktion des Nervensystems (Buonanno and Fischbach, 2001), des Herzens wie in Kardiomyozten (Kuramochi et al., 2004) und in anderen Organsystemen spielen (Falls, 2003).

Neuregulin-1 gehört zu der Familie der Neureguline, welche aus vier verschiedenen Proteinen (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4) besteht und weist gleichermaßen zahlreiche Isoformen auf. Alle Isoformen werden durch das NRG1 Gen codiert (Holmes et al., 1992, Peles et al., 1992). Sie entstehen durch alternatives Spleißen im Rahmen der Transkription (Nave and Salzer, 2006).

Dabei wurde bereits in der Vergangenheit in Bezug auf das zentrale Nervensystem insbesondere dem NRG1-Gen eine zentrale Rolle bei Schizophrenie zugeschrieben (Harrison and Law, 2006).

NRG1 wurde ursprünglich als 44 kd Glycoprotein identifiziert (Peles et al., 1992) und ist auch unter den Namen *Neu differentiation factor* (NDF) (Pinkas-Kramarski et al., 1997), Heregulin (Holmes et al., 1992) und *Glial Growth Factor* (GGF), da es auch als Mitogen für Schwannzellen fungiert, (Marchionni et al., 1993) bekannt. Die Isoformen von NRG1 unterscheiden sich durch ihren N-Terminus (Wang et al., 2001). Hierdurch lassen sich drei Haupt-Typen von NRG1 Isoformen unterscheiden. NRG1 Typ I trug ursprünglich die Namen *Neu differentiation factor* und Heregulin. Der *Glial Growth Factor* lässt sich der Isoform NRG1 Typ II zuordnen. NRG1 Typ III wurde ursprünglich als *Sensory and Motor Neuron-derived Factor* (SMDF) klassifiziert (Ho et al., 1995).

NRG1 Typ III wird in sensorischen und motorischen Neuronen des peripheren Nervensystems (Birmingham-McDonogh et al., 1997) exprimiert, welche von Schwannzellen umhüllt werden. Es liegt membrangebunden entlang der Axone vor und ist essentiell für die Proliferation und das Überleben der Schwannzell-Vorläuferzellen (Birchmeier and Nave, 2008).

Es ließen sich darüber hinaus drei weitere NRG1 Isoformen identifizieren (IV-VI), welche jedoch nicht näher klassifiziert worden sind (Steinhorsdottir et al., 2004, Nave and Salzer, 2006). Weiterhin lassen sich die Neureguline auch über ihre *epidermal-growth-factor-like domain* in eine α oder β Isoform unterscheiden (Falls, 2003).

1.3 NRG1/ErbB Signalweg

Neureguline binden als Liganden an den ErbB Tyrosinkinase Rezeptor. Hierzu zählen vier Rezeptoren (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4), von denen explizit die Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 durch NRG1 gebunden werden. Die Bindung an ErbB2 kann nur nach einer Bindung mit ErbB3 oder ErbB4 als aktivierte Heterodimere (Nave and Salzer, 2006) erfolgen. NRG1 bindet an die extrazelluläre Domäne der ErbB3 und ErbB4 Rezeptoren. Diese Bindung führt zu einer Homo- oder Heterodimerbildung, welche den intrazellulären Signalweg aktiviert. (Falls, 2003)

Ferner ist die Expression des ErbB4 Rezeptors in Schwannzellen jedoch gering, so dass insbesondere ErbB2 und ErbB3 oder ErbB2-ErbB3 Heterodimere in der Neuron-Gliazell-Interaktion des peripheren Nervensystems von Bedeutung sind. Der Ligand NRG1 Isoform Typ III, welcher in der Membran der Axone exprimiert wird, bindet an ErbB2 und ErbB3 und induziert die Entwicklung von Schwannzell-Vorläuferzellen, welche sich in reife Schwannzellen entwickeln und entweder mehrere kleinere Axone umhüllen und sogenannte Remakbündel bilden oder große Axone ummanteln und diese myelinisieren (Nave and Salzer, 2006). Im Vergleich zu den Schwannzellen werden in den Oligodendrozyten des ZNS alle drei ErbB-Rezeptoren (ErbB2, ErbB3 und ErbB4) exprimiert (Nave and Salzer, 2006). Eine Expression von ErbB4 in der Cochlea konnte nicht nachgewiesen werden (Stankovic et al., 2004).

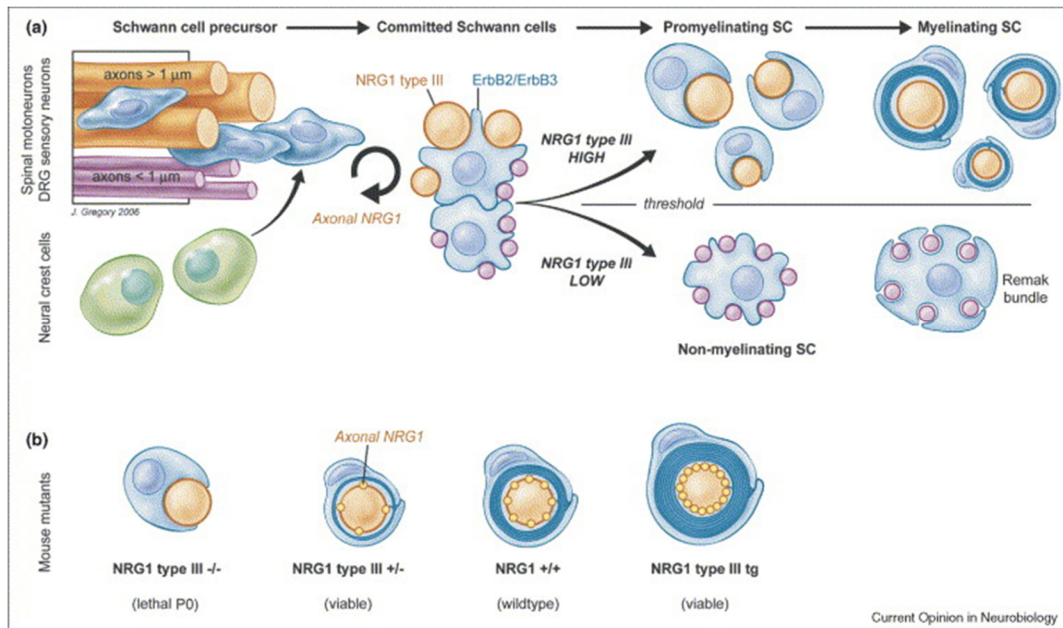


Abb. 3: Myelinisierung

(Nave, Klaus-Armin und Salzer, James L. (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1, figure 2.).

a) Schwannzell-Vorläuferzellen, welche aus der Neuralleiste stammen, kommunizieren mit kleinen $<1\mu\text{m}$ und großen $>1\mu\text{m}$ Axonen der Motoneurone und mit sensorischen Neuronen von Spinalganglien. Mithilfe des ErbB2/ErbB3 Rezeptors der Schwannzellen kann NRG1 Isoform Typ III (Expression in der Membran der Axone) über den NRG1/ErbB Signalweg die Differenzierung und Proliferation der Schwannzellen vermitteln. Je nach Dichte der NRG1 Expression entlang der Axone erfolgt die Differenzierung in myelinisierende Schwannzellen, welche große Axone einzeln ummanteln, oder in nicht-myelinisierende Schwannzellen, welche mehrere kleine Axone ummanteln und sogenannte Remakbündel bilden.

b) Die Myelinisierung variiert je nach Ausmaß der NRG1 Expression entlang der Axone. Von links nach rechts zeigt sich das Ausmaß der Myelinisierung in Maus-Mutanten ohne NRG1 (-/-), in heterozygoten Mäusen NRG1 (+/-), im Wildtyp NRG1 (+/+) sowie in transgenen Mäusen mit NRG1 Überexpression. (Nave and Salzer, 2006)

1.3.1 Unterschiede in der Proliferation und Überleben von Schwannzellen

In mehreren Arbeiten konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Auswirkungen des NRG1/ErbB-Signalweges auf Proliferation und Überleben von Schwannzellen abhängig vom Alter waren, sowie abhängig davon ob es sich um myelinisierende oder nicht-myelinisierende Schwannzellen handelte. Der NRG1/ErbB-Signalweg bewirkte eine Induktion der Proliferation in Schwannzell-

Vorläuferzellen. In adulten nicht-myelinisierenden Schwannzellen hingegen fungierte der NRG1/ErbB-Signalweg als Inhibitor ihrer Proliferation; gewährleistete jedoch zu gleich ihr Überleben in einem Ruhezustand. Dies konnte mithilfe von transgenen Mäusen, welche einen dominant-negativen ErbB4 (DN-erbB4) Rezeptor exprimierten, gezeigt werden. So konnten durch den DN-erbB4 Rezeptor die Signalwege von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 vollständig geblockt werden (Chen et al., 2003), was einen Untergang der nicht-myelinisierenden Schwannzellen und ihrer unmyelinisierten Axone zur Folge hatte.

In einer weiterführenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des DN-erbB4 Rezeptors in transgenen Mäusen ab dem postnatalen Tag 28 und somit die Unterbrechung des NRG1/ErbB-Signalweges in adulten myelinisierenden Schwannzellen keinen Einfluss auf das Überleben oder die Proliferation der Schwannzellen hatte. Ferner war ein intakter NRG1/ErbB-Signalweg für eine normale Myelinisierung der Neuriten notwendig. Die Expression des DN-erbB4 Rezeptors führte zu einer Reduktion des axonalen Durchmessers, der Länge zwischen den Ranvierschen Schnürringen sowie der Nervenleitgeschwindigkeit. Es zeigte sich eine Dysfunktion der sensorischen Neurone sowie eine Reduktion in der Genexpression des Myelin Gens, aus welcher eine Hypomyelinisierung der Axone resultierte. (Chen et al., 2006)

1.3.2 Einfluss von NRG1 auf die Regeneration und das Wachstum von Neuriten

Ein weiterer Aspekt des NRG1/ErbB Signalweges ist seine mögliche Schlüsselrolle bei der Regeneration von Nerven nach einer Schädigung. NRG1 α sowie NRG1 β werden in der Regel beide von Schwannzellen exprimiert (Nicolino et al., 2003). Nach Nervenschädigung (sowie Kontaktverlust der Schwannzellen zu den Axonen) konnte eine erhöhte Expression von NRG1 α sowie ErbB2/ErbB3 in Schwannzellen festgestellt werden. Das axonale NRG1 β wurde zugleich herunterreguliert. Infolge der Nervenregeneration fand eine erneute Hochregulation von NRG1 β und zugleich eine kompensatorische Herunterregulation von ErbB2/ErbB3 in Schwannzellen statt. So kann von einem parakrinen Regelkreislauf der Schwannzellen und Neuriten ausgegangen

werden, welcher möglicherweise Einfluss auf die Neuritenregeneration hat. (Geuna et al., 2007)

1.4 Die Rolle des NRG1/ErbB Signalweges im Innenohr

In einigen Arbeiten ließen sich bereits NRG1 und die ErbB Rezeptoren in Strukturen des Innenohrs mithilfe immunhistochemischer Verfahren nachweisen. Es zeigte sich in Cochleae von adulten Mäusen eine Expression von NRG1 in Spiralganglienneuronen (Stankovic et al., 2004).

In Cochleae von adulten Chinchillas wurde in den äußeren und inneren Haarzellen sowie in den Pfeilerzellen eine hohe bis moderate Expression des ErbB2 Rezeptors nachgewiesen. ErbB3 wurde hingegen in den äußeren, inneren Haarzellen und in den Spiralganglienneuronen nur schwach exprimiert. (Zhang et al., 2002)

Ferner konnte auch eine Expression von NRG in Spiralganglienneuronen und ErbB2/ErbB3 in Schwannzellen von Ratten am postnatalen Tag 5 nachgewiesen werden. Durch eine Behandlung mit NRG ließ sich eine Proliferation der Schwannzellen *in vitro* induzieren. (Hansen et al., 2001)

Mit postnatalen transgenen Mäusen konnte ebenfalls die ErbB2 und ErbB3 Expression in den Stützzellen des Corti-Organes gezeigt werden. Diese wurde als stärker beschrieben als in Schwannzellen. Infolge der Unterbrechung des NRG1/ErbB-Signalweges durch die Expression eines DN-ErbB4-Rezeptors in den Stützzellen wurde der Untergang von 80 % Spiralganglienneuronen festgestellt. Die Neurone degenerierten innerhalb weniger Wochen nach der Geburt. Die Entwicklung der Cochlea verlief regelrecht und die Degeneration der Spiralganglienneurone ging ohne Haarzellverlust einher. Stützzellen waren ebenfalls nicht von der Degeneration betroffen, sodass das Corti-Organ intakt blieb. Der NRG1/ErbB-Signal Weg hatte demzufolge lediglich Einfluss auf die Funktion der Stützzellen und nicht auf ihre Proliferation oder ihr Überleben. Es wurde ferner eine verminderte Expression des Neurotrophins NT3 festgestellt. Insgesamt scheinen die Stützzellen mittels reziproker Neuron-Stützzell-Interaktion via NRG1/ErbB-Signalweg ähnlich wie Gliazellen einen Einfluss auf die Integrität und das Überleben der Spiralganglienneurone zu haben. (Stankovic et al., 2004)

Die Stützzellen exprimieren wie Gliazellen verschiedene Glia-Marker wie S100 (Pack and Slepecky, 1995).

1.4.1 Einfluss des Pan-ErbB-Inhibitor Canertinib (CI-1033) auf NRG1/ErbB im Innenohr

Es wurde gezeigt, dass ein irregulärer NRG1/ErbB Signalweg nicht nur eine Dysregulation in Nervengewebe zur Folge hat, sondern auch einige Arten von Tumoren wie das Mammakarzinom oder das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom induzieren kann. Canertinib (CI-1033), ein irreversibler Inhibitor des ErbB-Rezeptors (Slichenmyer et al., 2001), wurde initial für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms in klinischen Studien getestet (Majem and Pallares, 2013). Ferner konnte für den Einsatz des Pan-ErbB-Inhibitors Canertinib für verschiedene Tumore eine antitumorale Wirkung nachgewiesen werden. So ließ sich unter dem Einfluss von Canertinib der Untergang von malignen Melanomzellen verzeichnen (Djerf Severinsson et al., 2011).

Darüber hinaus wurde in der Vergangenheit auch die Wirkung einer NRG1/ErbB-Inhibition durch ErbB-Inhibitoren auf das Hörvermögen untersucht. In einer Arbeit mit adulten Cochleae von Meerschweinchen *in vivo* wurde der Einfluss eines ErbB2-Inhibitors auf das Hörorgan getestet. Dort hatte sich eine Beeinträchtigung des Hörvermögens, gemessen über otoakustische Emissionen, gezeigt. Dies wurde mittels Hirnstammaudiometrie untersucht. Eine ErbB2-Inhibition führte bereits nach einigen Tagen zu einer Hörschwellenverschiebung bei hohen Frequenzen und nach einiger Zeit dann auch bei niedrigen Frequenzen. Dies führte letztlich zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Hörvermögens, welche sich langsam entwickelte. Dies hatte jedoch keine Degeneration der Neurone oder der inneren Haarzellen zur Folge. Sie zeigten sich nicht vermindert. Die äußeren Haarzellen waren weder morphologisch noch funktionell von der Inhibition betroffen. Sie zeigten normale otoakustische Emissionen. Mittels *real-time-PCR* wurde ferner eine vermehrte Genexpression des ErbB2 Rezeptors als kompensatorische Gegenregulation nachgewiesen. (Watanabe et al., 2010)

1.5 Sensorineurale Schwerhörigkeit

Hypakusis hat in Deutschland eine Prävalenz von 16 Prozent (von Gablenz et al., 2017). Es lassen sich Schallleitungsstörungen und Schallempfindungsstörungen unterscheiden, wobei sich die Schallempfindungsstörung insbesondere auf Ebene der Sinneszellen und auf neuronaler Ebene abspielt. Die sogenannte sensorineurale Schwerhörigkeit kann durch eine Degeneration der Spiralganglienneurone oder ihrer peripheren Neuriten bedingt sein. Spiralganglienneurone können bereits bei der Geburt oder zu einem späteren Zeitpunkt durch beispielsweise otoakustische Überstimulation sekundär in Folge einer Haarzellendegeneration geschädigt werden. (Lin et al., 2011).

Für die sensorineurale Schwerhörigkeit gibt es bisher nur die Möglichkeit des Cochlea-Implantats als Hörsatz über Umgehung von geschädigten Haarzellen. Die Implantate erfordern funktionsfähige Spiralganglienneurone (Wei et al., 2007). Problematisch ist in diesem Zusammenhang jedoch die vorangegangene Degeneration des Corti-Organs, die über einen Mangel an Wachstumsfaktoren sekundär zu einer Degeneration der Spiralganglienneurone führt (Versnel et al., 2007, Ramekers et al., 2012). Protektive Wachstumsfaktoren sind unter anderem Neurotrophin-3 und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Ramekers et al., 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Organkulturen

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse eines Wurfes des Inzuchtstammes C57BL/6J verwendet.

Die Mäuse wurden von der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bereitgestellt. Der Transport und die Haltung der Tiere erfolgte gemäß TSchV sowie den Vorgaben des Tierschutz-Beauftragten der HHU Düsseldorf.

Die für die Tötung zur Organentnahme notwendige Tierversuchsanzeige (Aktenzeichen 0/13/2010) sowie der Nachweis über eine Teilnahme am Tierversuchskundekurs sind erbracht worden und liegen gemäß Tierschutzgesetz § 11 vor.

Die für die Kulturen notwendigen Spiralganglienzellen müssen frisch entnommen werden und sind als entdifferenzierte Zellen nicht kommerziell als Zelllinie erhältlich, sodass die Tötung und anschließende sofortige Organentnahme der postnatalen Versuchstiere notwendig war.

2.1.2 Präparation der Cochlea und der Spiralganglienzellen

Die Tiere wurden ordnungsgemäß transportiert und im Labor der HNO-Forschung zur Entnahme der Spiralganglienpräparate durch Dekapitation getötet.

Alle für die Dekapitation und anschließende Präparation des Gewebes benötigten Instrumente wurden vorher mit Alkohol desinfiziert um eine Kontamination der Organkulturen zu vermeiden.

Es wurden Tiere im postnatalen Alter von fünf (P5) bis sieben Tagen (P7) verwendet, da sich dieses Alter als besonders günstig für die Extraktion und Kultivierung der Spiralganglienzellen herausgestellt hat.

Nach der Dekapitation wurden die Haut und das überschüssige Gewebe von der Schädelkalotte der Mäuse entfernt. Anschließend wurde der knöcherne Schädel im Bereich des Foramen magnum inzisiert und entlang der Sutura sagittalis in zwei Hälften gespalten. Das Gehirn wurde makroskopisch mithilfe einer Pinzette

entfernt. Die Schädelhälften wurden anschließend in einer gekühlten (+4°C) D-PBS-Lösung (Thermo Fisher Scientific, USA) in Petrischalen auf Eis gelegt, um sie für die weitere Präparation unbeschadet zu erhalten.

Daraufhin begann die Feinpräparation, indem die Cochlea mithilfe eines Operationsmikroskopes (Carl Zeiss, Oberkochen) und den nötigen Präparationsinstrumenten aus seiner knöchernen Umgebung entnommen wurde. Die knöcherne Hülle um die Cochlea wurde dann entfernt, sodass der Modiolus mitsamt der Spiralganglienzellen, des Corti-Organes sowie der Stria vascularis übrigblieb. Nun ließen sich von der Cochleabasis zur Cochleaspitze hin die beiden Schichten bestehend aus Stria vascularis und Corti-Organ vom Modiolus und den Spiralganglienzellen lösen. Häufig ließen sich beide Schichten gleichzeitig abziehen, sodass es nur noch nötig war die knöchernen Überreste zu entfernen und die verbliebenen Spiralganglienzellen mithilfe eines Skalpell in drei äquivalente Stücke zu schneiden. Die Spiralganglienzellpräparate wurden anschließend in das bei +37°C vorgewärmte Kulturmedium überführt und bis zum Abschluss der Präparation, welche je nach Wurf aus sechs bis neun Mäusen bestand, im Brutschrank gelagert.

2.1.3 Spiralganglienzellkultur und Kultivierung der Neuriten

2.1.3.1 Beschichtung der Kulturplatten

Um optimale Bedingungen für die Organkultur zu schaffen, war es notwendig die Platten für die Kulturen vorher mit Mäuse-Kollagen Typ IV (BD Biosciences, USA) zu beschichten, da eine mangelnde Adhäsion das Neuritenwachstum unmöglich machte. Die Beschichtung der Platten erfolgte in der Regel kurz vor der Präparation oder am Vorabend.

Die Kollagenbeschichtung wurde bei allen Präparationen verwendet, bei denen dem Kulturmedium NRG1 und CI-1033 zugesetzt wurden.

Hierfür wurde gekühltes (-80°C) Kollagen und 0,05M filtrierte Salzsäure verwendet. Die Lösung wurde im Verhältnis 1:100 Kollagen und HCL angesetzt. Auf die Objektträger (Thermo Fisher Scientific, USA), bestehend aus jeweils acht separaten Kammern (*well*), wurden jeweils 120µl der HCL/Kollagen-Lösung pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten

zweimal mit DPBS und einmal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Platten luftgetrocknet.

2.1.3.2 Kulturmedium

Das verwendete Kulturmedium setzte sich zusammen aus 10ml DMEM (+GlutaMAX, +Glucose, +HEPES, -Pyruvat) (Thermo Fisher Scientific, USA), 100µl Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA), 20µl NT-3 (Sigma-Aldrich, USA) und 200µl B27-Supplement (Thermo Fisher Scientific, USA). Das Kulturmedium wurde für jede Präparation frisch und steril angesetzt.

Dem Nährmedium wurden je nach Versuchsbedingung die jeweiligen Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt.

Nach Abschluss der Präparation wurden die im Inkubator gelagerten Spiralganglienzellpräparate nun auf die bereits beschichteten Platten gesetzt. Diese wurden möglichst atraumatisch auf die Platten gesetzt und in der jeweiligen Kammer zentriert. Nach einer Kontrolle mit dem Operationsmikroskop wurde dann vorsichtig in jede Kammer jeweils 200µl Medium pipettiert. Nach Abschluss dieses Vorganges wurden alle Organkulturen bei 37°C für 72h bebrütet. Nach zwei Tagen im Inkubator musste das Nährmedium gewechselt werden.

Um den Einfluss von NRG1 und den Inhibitor CI-1033 auf das Wachstum der Neuriten zu untersuchen wurden pro Versuch jeweils zwei Platten pro Bedingung verwendet. Es wurde das Wachstum der Neuriten im Hinblick auf die Expression von NRG1 oder die Inhibition des ErbB-Rezeptors mittels CI-1033 und in Abhängigkeit ihrer Konzentrationen untersucht. Dafür wurden beide Einflussfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen zum Nährmedium hinzugegeben. Zur Kontrolle der Versuchsumstände wurden zu jeder Zeit als Kontrolle zwei Kulturplatten mit Nährmedium ohne Zusätze zu den gleichen Bedingungen verwendet.

Der Einfluss von NRG1 ((NRG1-α/HRG1-α EGF) R&D Systems, USA) auf das Wachstum der Neuriten wurde hierfür in den Konzentrationen 100ng/ml, 200ng/ml sowie 400ng/ml untersucht. CI-1033 (Sigma-Aldrich, USA) hingegen wurde in den Konzentrationen 0,25µM, 0,5µM und 1µM verwendet.

Tabelle 1: Konzentration der Faktoren

Konzentration NRG1	Konzentration CI-1033
100ng/ml	0,25µM
200ng/ml	0,5µM
400ng/ml	1µM

Aus mindestens fünf Würfeln wurden jeweils insgesamt sechs Platten (bestehend aus jeweils zwei Platten mit NRG1 und CI-1033 Zusatz sowie ohne Zusatz als Kontrolle) kultiviert.

Durch eine ausreichende Menge an Würfeln sollte zum einen gewährleistet werden, dass anschließend genügend Explantate vorhanden waren um den Einfluss von NRG1 und CI-1033 auf die Neuriten zu untersuchen und die beiden Faktoren miteinander und mit der Kontrolle zu vergleichen, sowie zum anderen, damit eine ausreichende Anzahl N an Neuriten vorhanden war, um eine belastbare statistische Analyse durchzuführen.

Wichtig war in jedem Falle, dass pro Bedingung mindestens zwei voneinander unabhängige Präparationen von zwei voneinander unabhängigen Würfeln von Tieren durchgeführt wurden um Einflüsse durch den Präparationsvorgang und die Tiere zu vermeiden.

2.1.4 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung

2.1.4.1 Fixierung und Vorbehandlung der Kulturplatten

Es erfolgte die Fixierung der Spiralganglienzellpräparate auf den Objektträgern mit 4% PFA (Sigma-Aldrich, USA) zu jeweils 200µl je Kammer 20 Minuten lang bei 4°C. Im Anschluss wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und es erfolgte eine dreimalige Spülung der *well* mit 300 µl PBS.

Die *Blocking Solution* setzte sich zusammen aus 10% *Chicken Serum* (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,1 % *Tween-20* (Sigma-Aldrich, USA) und 1% Bovinem Serum Albumin (Dade Behring, USA), welche zu je 200µl in die Kammern pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur wirkten. Die *Blocking Solution* war notwendig, um eine unspezifische Proteinbindung zu vermeiden.

2.1.4.2 Immunfluoreszenzfärbung der Organkulturen

Es erfolgte im Anschluss die Inkubation der Primärantikörper verdünnt mit *Blocking Solution* zu je 200µl je *well* bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Tabelle 2: Primärantikörper Organkulturen

Primärantikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-NRG1	Kaninchen	1:800	Sigma-Aldrich, USA
Anti-phospho-ErbB3	Kaninchen	1:200	Sigma-Aldrich, USA
neuronenspezifisches β-III-Tubulin	Maus	1:400	R&D Systems, USA
Anti-NGFR/TNFRSF 16 (p75NTR)	Ziege	1:400	R&D Systems, USA

Zum Nachweis von NRG1 wurde der Primärantikörper Anti-NRG1 verwendet. Neuronale Zellen ließen sich mit neuronenspezifischen β-III-Tubulin von nicht-neuronalem Gewebe unterscheiden.

Der Nachweis des Rezeptors ErbB3 erfolgte mit Anti-phospho-ErbB3.

Die Expression von NRG1 und seinem Inhibitor CI-1033 in Schwannzellen wurde mithilfe des Primärantikörpers Anti-NGFR/TNFRSF 16 (p75NTR) untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Neurotrophin-Rezeptor, welcher der Unterscheidung von Schwannzellen von anderen nicht-neuronalen Zellen dient (Tan et al., 2010).

Im Anschluss an die Inkubation der Primärantikörper wurden die Kulturkammern zur Vorbereitung für die Behandlung mit den Sekundärantikörpern abgesaugt und dreimal mit PBS gespült.

Tabelle 3: Sekundärantikörper Organkulturen

Sekundärantikörper	Verdünnung		Hersteller		
<i>Chicken Anti-Rabbit</i>	594	1:400	Thermo	Fisher	Scientific, USA
<i>Chicken Anti-Mouse</i>	488	1:400	Thermo	Fisher	Scientific, USA
<i>Chicken Anti-Goat</i>	594	1:400	Thermo	Fisher	Scientific, USA

Alle Sekundärantikörper wurden 1:400 mit PBS verdünnt und die Platten eine Stunde bei 37°C unter Lichtschutz inkubiert.

Dann erfolgten das Absaugen und Spülen der Kulturkammern mit PBS.

Schließlich konnten die Kammern von den Objektträgern mit sogenannten „Schlitten“ entfernt werden und die Zellkerne konnten mit *Mounting Medium* + DAPI (Konzentration 1,5µg/ml) (Vector Laboratories, USA) gefärbt und eingedeckt werden.

Die Objektträger wurden mit zwei Deckgläsern à 21x26mm versehen und konnten nun unter Lichtschutz bei 4°C bis zur Mikroskopie gelagert werden.

2.1.5 Mikroskopie der Explantate

Mithilfe des Fluoreszenz Durchlichtmikroskopes BX40 (Olympus, Japan) ließen sich die Explantate und die aus ihnen gewachsenen Neuriten examinieren.

NRG1, ErbB3 und Schwannzellen wurden markiert und ließen sich mittels Emissionsfilter in der Wellenlänge des Sekundärantikörpers 594nm (rot-fluoreszierend) detektieren. B-III-Tubulin wurde durch seinen Sekundärantikörper in der Wellenlänge 488nm (grün-fluoreszierend) detektiert. DAPI fluoreszierte blau in der Wellenlänge 365nm.

Die Dokumentation erfolgte mit der Kamera D5000 12,3 Megapixel (Nikon, Japan), welche an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen war und über die Computersoftware Sofortbild Version 1.3 (Sofortbild, Oberhaching) gesteuert werden konnte. So war es möglich, die Belichtung richtig einzustellen und die Bilder anhand eines großen Bildschirmes zu betrachten.

Die Bilddateien standen dann als JPEG-Dateien zur weiteren Bearbeitung und Auswertung zur Verfügung.

2.1.6 Dokumentation des Wachstumsverhaltens von Neuriten und Schwannzellen

2.1.6.1 Bildbearbeitung

Die entstandenen Bilder ließen sich schließlich mithilfe der Software ImageJ 1.47v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) darstellen. Die Bilder wurden kalibriert und mit Maßstabsbalken versehen. Weiterhin ließen sich z.B.

Collagen erstellen oder die Bilder konnten zusammengeführt werden. Hierfür wurden die einzelnen Bilder mithilfe der Funktion *merge* überlagert, indem die Farbkanäle Rot, Grün und Blau ausgewählt wurden. So ließen sich die Bilder der drei Emissionsfilter zusammenführen und alle fluoreszenzmarkierten Strukturen konnten überlagert betrachtet werden.

2.1.6.2 Bestimmung der Neuritenlänge

Anhand der Bilder konnten die Neuriten ausgehend von einem Explantat manuell mithilfe der Software ImageJ gemessen werden. Durch die vorherige Kalibrierung wurden die Längen in μm angegeben und konnten als Excel-Tabellen gespeichert werden (Microsoft Excel für Mac 2011 Version 14.5.2 (Microsoft, USA)).

Darüber hinaus wurden auch die morphologischen Aspekte der Neuriten beschrieben. So wurde abgesehen von ihrer Länge, ihr Proliferationsverhalten in Bezug auf das Explantat sowie die Tendenz zur Verzweigung, Abspaltung oder Gruppierung in Faszikel in Abhängigkeit der Einflussfaktoren NRG1 und CI-1033 betrachtet.

2.1.7 Messung der Zelldichte

Weiterhin wurde das Migrationsverhalten der Schwannzellen unter dem Einfluss von NRG1 und CI-1033 untersucht. Hierfür wurde mithilfe von ImageJ ein Gitter (*grid*) basierend auf der vorher durchgeführten Kalibrierung erstellt. Die hieraus entstandenen Kästchen hatten eine Größe von $10.000\mu\text{m}^2$. Je nach Übersichtlichkeit konnten dafür Bilder in allen Vergrößerungen (10x 20x 40x) verwendet werden. Es wurden zu einer besseren Objektivierung vier, beziehungsweise acht (in Abhängigkeit der Vergrößerung), Kästchen an unterschiedlichen Stellen des Präparates betrachtet.

Man konnte in den Kästchen zwei unterschiedliche Arten von Zellen bzw. deren Zellkernen, welche mit DAPI dargestellt werden konnten, identifizieren. Zum einen diejenigen, die frei und nicht anliegend in der Nähe der Neuriten zu finden waren und welche, die sich an die Neuriten anlagerten und p75NTR-positiv waren (Schwannzellen).

Die Zellkerne konnten mithilfe der Funktion *cell counter* von ImageJ manuell innerhalb der Kästchen gezählt werden. So konnten die p75NTR-negativen

Zellen und die p75NTR-positiven Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen verglichen werden.

Darüber hinaus wurde das Migrationsverhalten der Zellen in Bezug auf die Neuritenlänge betrachtet.

2.1.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Neuritenlängen im Hinblick auf den Einfluss der Faktoren NRG1 und CI-1033 erfolgte mit der Software SPSS Statistics Version 21 (IBM, USA). Es wurden die Mittelwerte der Neuritenlängen berechnet, welche anhand einer deskriptiven Statistik dargestellt und anschließend mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) miteinander verglichen werden konnten. Anhand des *Post-Hoc* Tests Tukey-HSD wurden Unterschiede zum Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$) festgestellt.

Die Dichte der Zellen konnte mittels deskriptiver Statistik beschrieben werden und wurde anschließend anhand einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) miteinander verglichen.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse waren mithilfe von SPSS Statistics, ImageJ, Excel und Word Version 15.21.1 (Microsoft, USA) möglich.

2.2 Kryoschnitte Cochlea

2.2.1 Präparation und Kryokonservierung

Es wurden für die Herstellung der Kryoschnitte Mäuse des gleichen Stammes (C57BL/6J) wie für die Herstellung der Organkulturen verwendet. Hierfür wurden Mäuse im Alter von zwei Tagen (P2) vierzehn Tagen (P14) und vier Monaten (adult) verwendet. Die Präparationsweise gestaltete sich bis zur Entnahme der Cochlea identisch.

Die Cochlea Präparate wurden in 4% PFA und 0,1M PBS eingelegt und über Nacht bei 4°C gelagert. Sie wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine 10 % EDTA-Entkalkung bei 4°C über einen Zeitraum von fünf bis zehn Tagen; je nach Verknöcherung der Cochlea. Hierbei musste das EDTA täglich gewechselt werden. Anschließend wurden die Präparate zur Kryoprotektion mit 30% Sucrose bei 4°C über Nacht behandelt.

Zur Einbettung der Präparate wurden Kryoeinbettformen Tissue-Tek (Sakura Finetek, Japan) mit O.C.T *compound* (Sakura Finetek, Japan) Gefriermedium am Boden blasenfrei bedeckt.

Die eingebetteten Präparate wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.2.2 Anfertigen der Kryoschnitte

Die gelagerten kryokonservierten Präparate wurden mithilfe eines Gefriermikrotoms (Leica Microsystems, Wetzlar) bei -20°C in 10µm-12µm dicke Schnitte geschnitten und auf die jeweiligen Adhäsionsobjektträger SuperFrost (Carl Roth, Karlsruhe) aufgetragen.

Die Objektträger wurden anschließend luftgetrocknet und danach bei -80° gelagert.

2.2.3 Immunfluoreszenz

Nach dem langsamen Auftauen wurden die Kryoschnitte fünf Minuten in PBS gebadet und bei -20°C in frisches Methanol gelegt. Nach dreiminütiger Lufttrocknung wurden die Präparate auf den jeweiligen Objektträger mit einem *Liquid blocker PEN* (Science Services, München) umrandet und die Negativkontrolle von den übrigen Präparaten räumlich getrennt.

Die in der Tabelle 5 angezeigten Primärantikörper wurden in jeweiliger Verdünnung in *Blocking solution* (siehe oben) gelöst und auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4°C gelagert.

Tabelle 4: Primärantikörper Kryoschnitte

Primärantikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-NRG1	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-NRG1	Kaninchen	1:800	Sigma-Aldrich
neuronenspezifisches β-III-Tubulin	Maus	1:400	R&D Systems
Anti-phospho-ErbB3	Kaninchen	1:200	Sigma-Aldrich

Im Anschluss an die Inkubation über Nacht wurden die Objektträger dreimal mit PBS 5 Minuten gewaschen und sogleich für das Auftragen der Sekundärantikörper vorbereitet. Die Sekundärantikörper wurden in PBS angesetzt und mussten in einer Dunkelkammer eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Objektträger einwirken.

Tabelle 5: Sekundärantikörper Kryoschnitte

Sekundärantikörper	Verdünnung		Hersteller		
<i>Chicken Anti-Rabbit</i>	594	1:400	Thermo	Fisher	Scientific, USA
<i>Chicken Anti-Mouse</i>	488	1:400	Thermo	Fisher	Scientific, USA

Es wurde anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden genauso wie bei den Organkulturen mit DAPI gefärbt (siehe oben) und die Präparate konnten mit 50mm Deckgläsern eingedeckt werden. Die Objektträger konnten schließlich unter Lichtschutz bei 4°C gelagert werden. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie wie unter 2.1.5 beschrieben.

2.2.3.1 Auswertung der Kryoschnitte

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Präparate wurden diese im Hinblick auf die Expression und Ko-Expression von NRG1 und seinem Rezeptor ErbB3 analysiert. Hierfür wurden mindestens 30 Schnitte untersucht. Zur Objektivierung der Intensität der Fluoreszenzsignale wurden mittels ImageJ RGB-Farbwerte bestimmt. Bei RGB handelt es sich um ein Farbmodell, welches sich aus der Addition der Farben Rot, Grün und Blau zusammensetzt. Hierbei wird die Menge des roten, grünen und blauen Lichts gemessen und als Intensität angegeben. Die Farbwerte können dabei in Prozent oder gängiger wie bei ImageJ und anderen Computerprogrammen in ganzen Zahlen zwischen 0 und 255 angegeben werden. Es handelt sich hierbei um relative Werte. Die relative Bezugsgröße bezogen auf die Intensität ist 0.

So ließen sich die mikroskopischen Aufnahmen der unterschiedlichen Explantate objektiver miteinander vergleichen. Dabei wurden die Messungen exemplarisch im Bereich der relevanten Strukturen durchgeführt. Diskrete Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzintensität ließen sich auf diese Weise genauer

auswerten. Die Expression von NRG1 und ErbB3 wurde anschließend mithilfe der Farbwerte in die unten dargestellten Kategorien eingeteilt.

Tabelle 6: Einteilung der Expression von NRG1 und ErbB3 anhand der Farbwerte

Kategorie	Farbwerte
Hohe Expression	106-166
Mittlere Expression	74-105
Geringe Expression	13-73

Die Ergebnisse wurden schließlich mithilfe von ImageJ, Excel und Word graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von NRG1 und ErbB3 in der Cochlea

3.1.1 Expression von NRG1 in der Cochlea

NRG1 wies eine hohe Expression in den Spiralganglienzellen (relativer Farbwert = 124) und eine mittlere Expression in den Axonen (relativer Farbwert = 75) auf (Abb. 4).

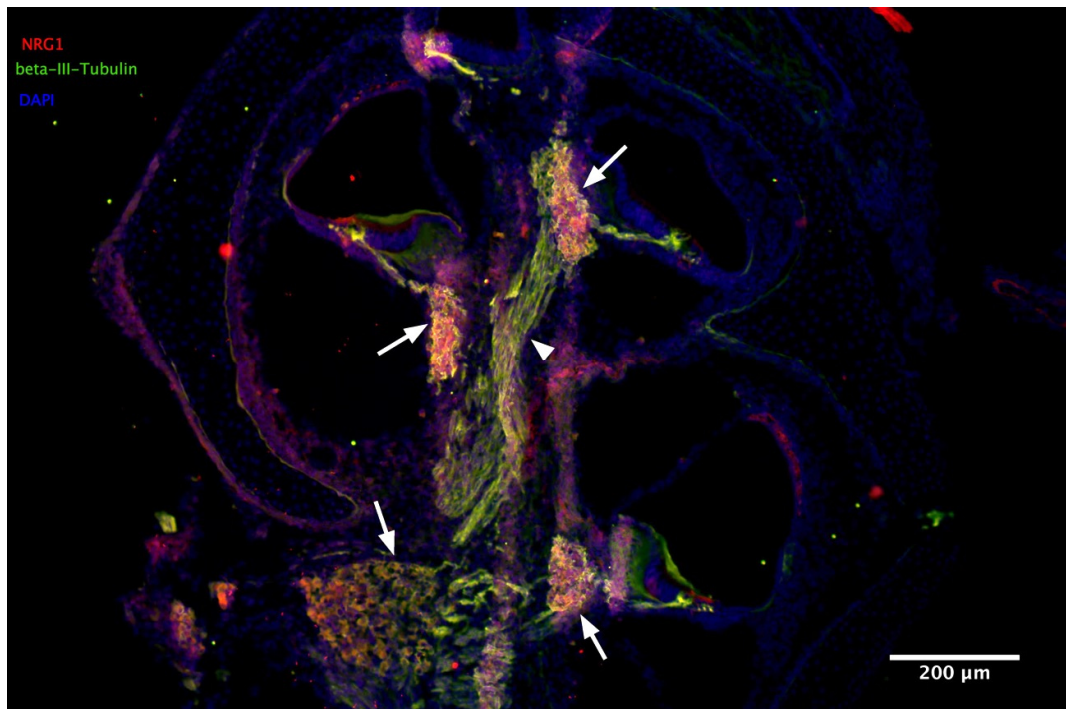


Abb. 4: Kryschnitt durch die Cochlea der Maus im Alter P2 nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine hohe Expression von NRG1 in den Spiralganglien (Pfeile) und eine mittlere Expression in den Axonen (Pfeilkopf) entlang des Modiolus. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Weiterhin zeigte sich eine hohe Expression von NRG1 im Bereich des Corti-Organ (relativer Farbwert = 126) (Abb. 5).

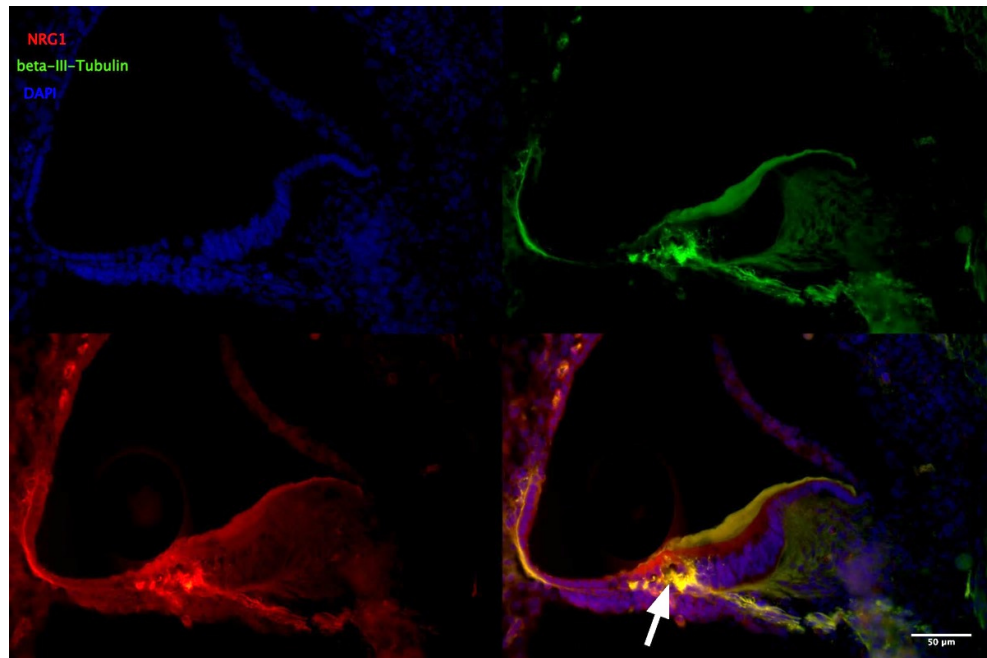


Abb. 5: Kryoschnitt durch die Cochlea der Maus im Alter P2 nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine hohe Expression von NRG1 im Bereich des Corti-Organ (Pfeil). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Die Präparate der 14 Tage alten Cochleae, welche ebenfalls mit den Immunfluoreszenzantikörpern NRG1/ β -III-Tubulin/DAPI markiert wurden, stellten die neuronalen Strukturen bereits etwas genauer dar. Es zeichnete sich deutlich die Abzweigung der Axone von den Spiralganglien und ihr anschließender gemeinsamer Verlauf zur basalen Cochlea in Richtung zentrales Nervensystem ab.

So war sowohl in den Spiralganglien (relativer Farbwert = 58) als auch in den Neuriten (relativer Farbwert = 29) eine geringe Expression von NRG1 nachweisbar. Das Signal schwächte sich im weiteren Verlauf der Axone im Bereich der Glia limitans Richtung basale Cochlea noch weiter ab. In den Habenula perforata und in den Haarzellen konnte ebenfalls ein NRG1 Signal detektiert werden. Dieses war jedoch geringer ausgeprägt als in den Spiralganglienzellen. (Abb. 6 und 7)

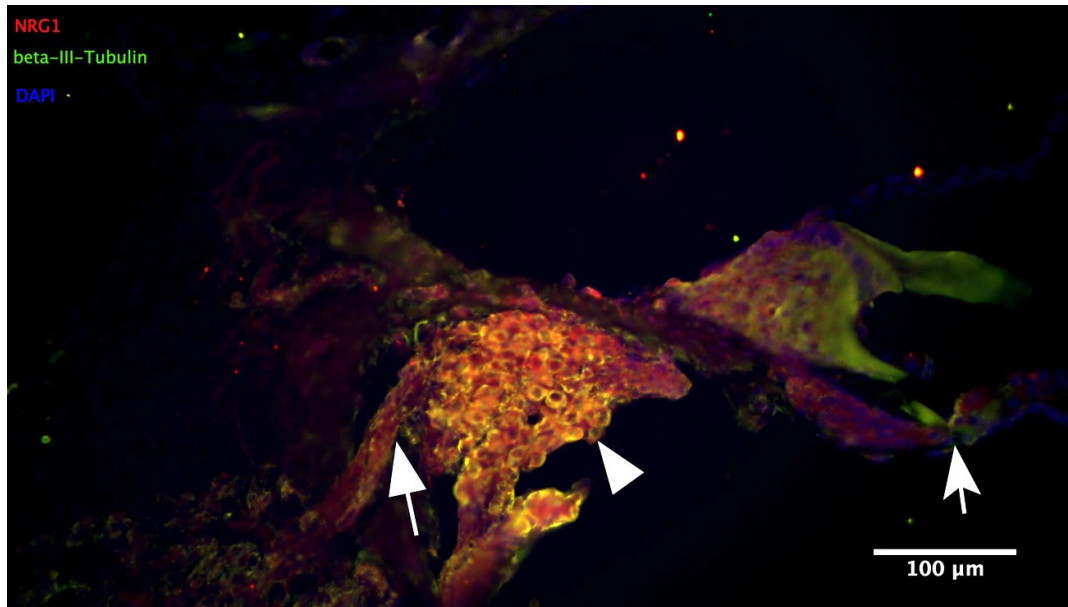


Abb. 6: Kryoschnitt durch die Cochlea der Maus im Alter P14 nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine geringe Expression von NRG1 in den Spiralganglienzellen (Pfeilkopf) und entlang der abzweigenden Axone (Pfeil) sowie eine noch geringere Expression von NRG1 im Bereich der Habenula perforata und der Haarzellen (eingekerbter Pfeil). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

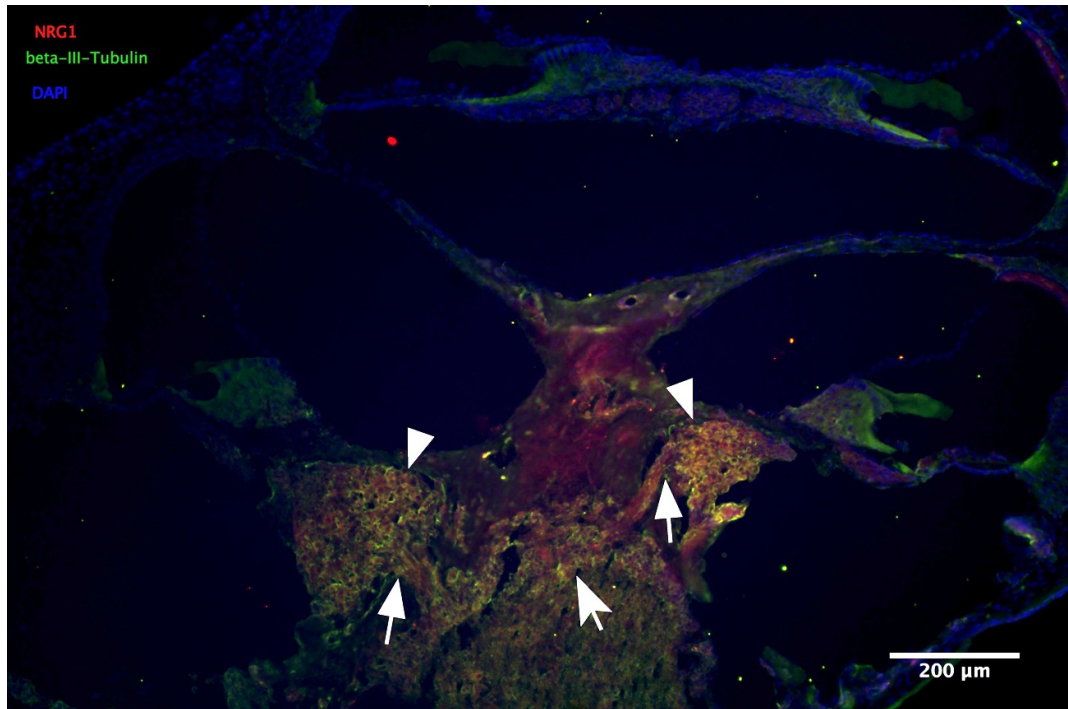


Abb. 7: Kryoschnitt durch die Cochlea der Maus im Alter P14 nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine geringe Expression von NRG1 im Bereich der Spiralganglien (Pfeilköpfe) und in den abzweigenden Axonen (Pfeile) sowie in den Axonen entlang des Modiolus (eingekerbter Pfeil) in der basalen Cochlea. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Im Spiralganglion von adulten Cochleae fiel eine mittlere Expression von NRG1 in den Perikarya (relativer Farbwert = 83) und ihren abzweigenden Neuriten auf. Gleichzeitig zeichnete sich ein hohes Rotfluoreszenzsignal (relativer Farbwert = 143) in Form von kleinen punktförmigen Zellen zwischen den Perikarya der großen Spiralganglienzellen ab, die am ehesten Satellitenzellen entsprachen. Es zeigte sich ferner eine mittlere NRG1 Expression im Bereich der Axone (relativer Farbwert = 104). Diese war im Vergleich zu der Expression in den Dendriten (relativer Farbwert = 75) und in den Spiralganglienzellen stärker ausgeprägt. Ferner imponierte die NRG1 Expression in den Habenula perforata (relativer Farbwert = 70) von adulten Cochleae gering, jedoch stärker als im Alter von P14. Im Vergleich zu neugeborenen Mäusen war das NRG1 Signal in den Habenula perforata der adulten Cochleae allerdings deutlich geringer ausgeprägt. Es zeigte sich jedoch eine höhere Zellkerndichte entlang der

Neuriten und im Spiralganglion in adulten Cochleae im Vergleich zu neugeborenen Cochleae. (Abb. 8 und 9)

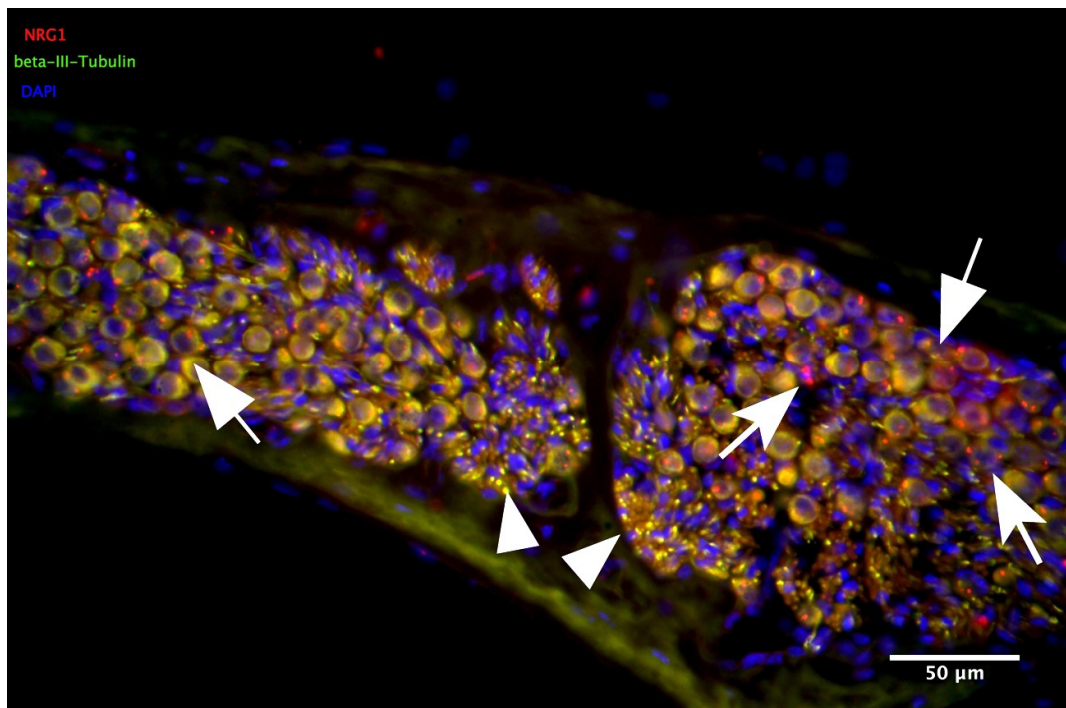


Abb. 8: Kryoschnitt durch die Cochlea von adulten Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine mittlere Expression von NRG1 in den Perikarya der Spiralganglienzellen (Pfeile) und im Bereich der abzweigenden Neuriten (Anschnitte) (Pfeilköpfe). Weiterhin imponierte ein punktförmiges, hohes Expressionssignal von NRG1 zwischen den Perikarya, am ehesten Satellitenzellen entsprechend (eingekerbte Pfeile). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

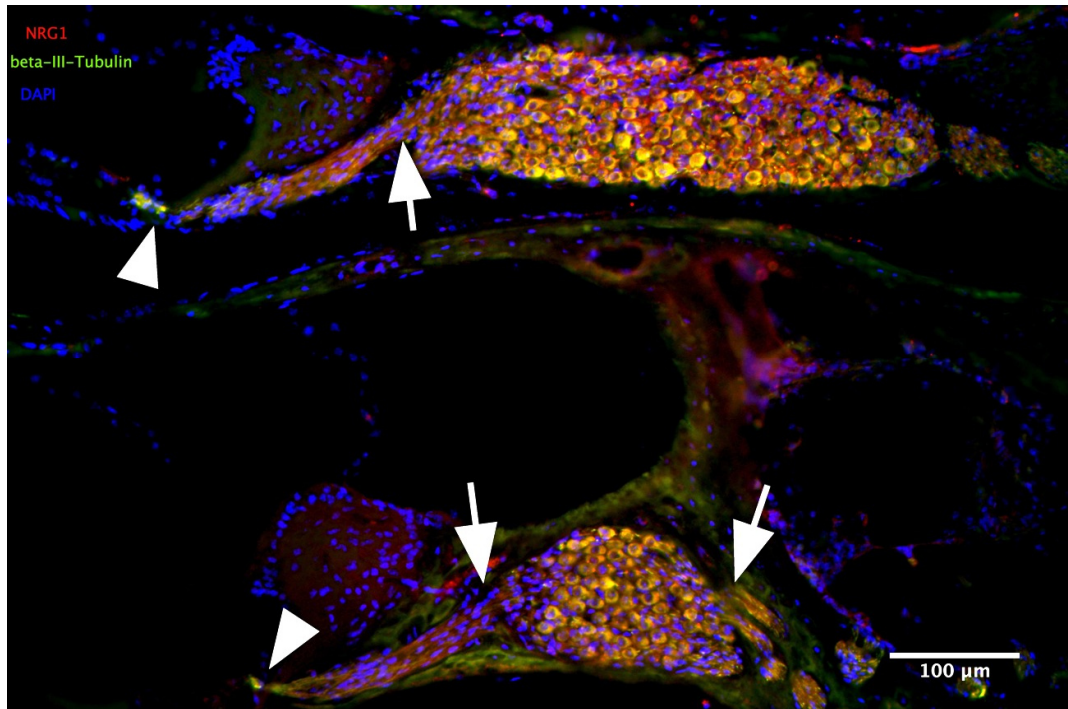


Abb. 9: Kryoschnitt durch die Cochlea von adulten Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine mittlere Expression von NRG1 in den Dendriten und eine hohe Expression in den Perikarya nahen Axonen (Pfeile). Es imponierte weiterhin eine geringe Expression von NRG1 in den Habenula perforata (Pfeilköpfe). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

3.2 Expression von ErbB3 in der Cochlea

Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper Anti-Phospho ErbB3 zeigte in Cochleae von Mäusen im Alter von P2, abgesehen von den Habenula perforata, ein ähnliches Verteilungsmuster der Antikörper wie die Färbung mit Anti-NRG1. Es zeigte sich eine geringe Expression von ErbB3 entlang der Neuriten und eine mittlere Expression im Bereich des Spiralganglions (relativer Farbwert = 75). Das RGB Histogramms zeigte, dass die Intensität der Rotfluoreszenz des Spiralganglions im Vergleich zu der Intensität der Neuriten (relativer Farbwert = 33) und der Habenula perforata höher ausfiel. Das Expressionssignal im Bereich der Habenula perforata war im Vergleich zu der Versuchsreihe mit neugeborenen Mäusen im Alter von P2 mit NRG1 nur gering (relativer Farbwert = 16) ausgeprägt. (Abb.10)

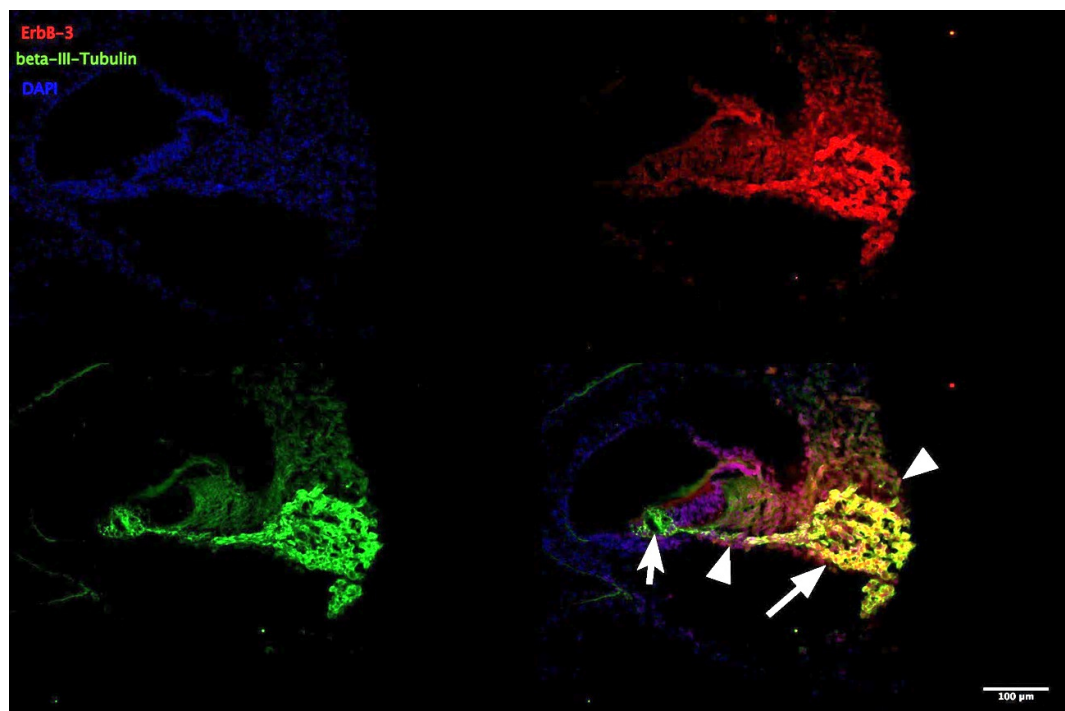


Abb. 10: Kryoschnitt durch die Cochlea von Mäusen im Alter von P2 nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine mittlere Expression des ErbB3 Rezeptors im Spiralganglion (Pfeilkopf) sowie eine geringe Expression von ErbB3 entlang der Neuriten (Pfeilköpfe). Im Bereich der Habenula perforata imponierte ebenfalls eine geringe Expression des ErbB3 Rezeptors (eingekerbter Pfeil). Im *merge*-Bild (rechts unten) ließ sich die Co-Expression von ErbB3 und beta-III-Tubulin darstellen. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: ErbB3 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Es zeigte sich in den Cochleae von Mäusen im Alter von P14 eine mittlere Expression von ErbB3 im Bereich des Spiralganglions (relativer Farbwert = 87). Ferner konnte in den Neuriten und im Bereich der Habenula perforata nur eine geringe Expression von ErbB3 (relativer Farbwert = 26) nachgewiesen werden. Im Bereich des Corti-Organs und der Haarzellen war das Expressionssignal kaum vorhanden. (Abb. 11)

Im Vergleich zur NRG1 Expression im Alter von P14 zeigte sich eine insgesamt höhere ErbB3 Expression in den Spiralganglien.

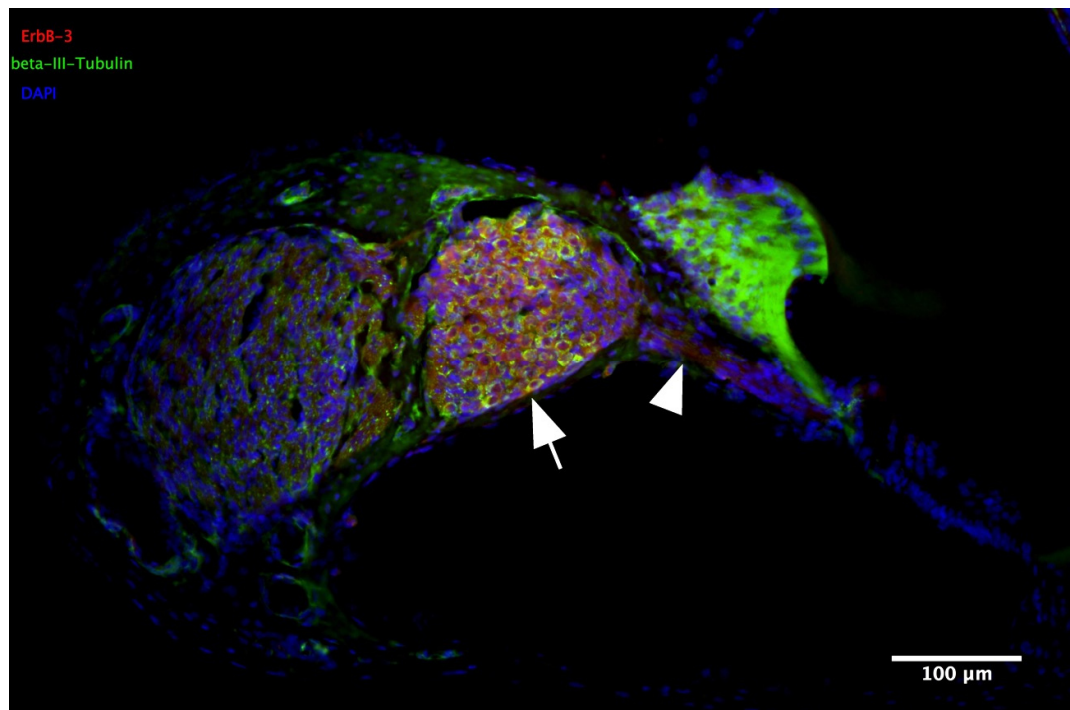


Abb. 11: Kryschnitt durch die Cochlea von Mäusen im Alter von P14 nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine mittlere Expression des ErbB3 Rezeptors im Spiralganglion (Pfeil) sowie eine geringe Expression von ErbB3 entlang der Neuriten (Pfeilkopf). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: ErbB3 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Auch in den adulten Cochleae gelang der Nachweis des ErbB3 Rezeptors. Dieser wurde vor allem in den Spiralganglienzellen sowie in den peripheren und zentralen Neuriten exprimiert. Es zeigte sich eine hohe Expression des Rezeptors in den Spiralganglienzellen (relativer Farbwert = 122), in den peripheren Neuriten sowie in den Neuriten im Bereich der Glia limitans (relativer Farbwert = 110). Gleichzeitig nahm die ErbB3 Expression im Verlauf des Nervus

cochlearis nach zentral immer mehr ab. In den weiter proximal verlaufenden zentralen Neuriten zeigte sich eine geringe Expression (relativer Farbwert = 65), welche in den zentralen Neuriten im basalen Modiolus lediglich nur noch sehr gering ausgeprägt war. Ferner zeigte sich eine hohe Zelldichte im Bereich der Glia limitans. (Abb. 12)

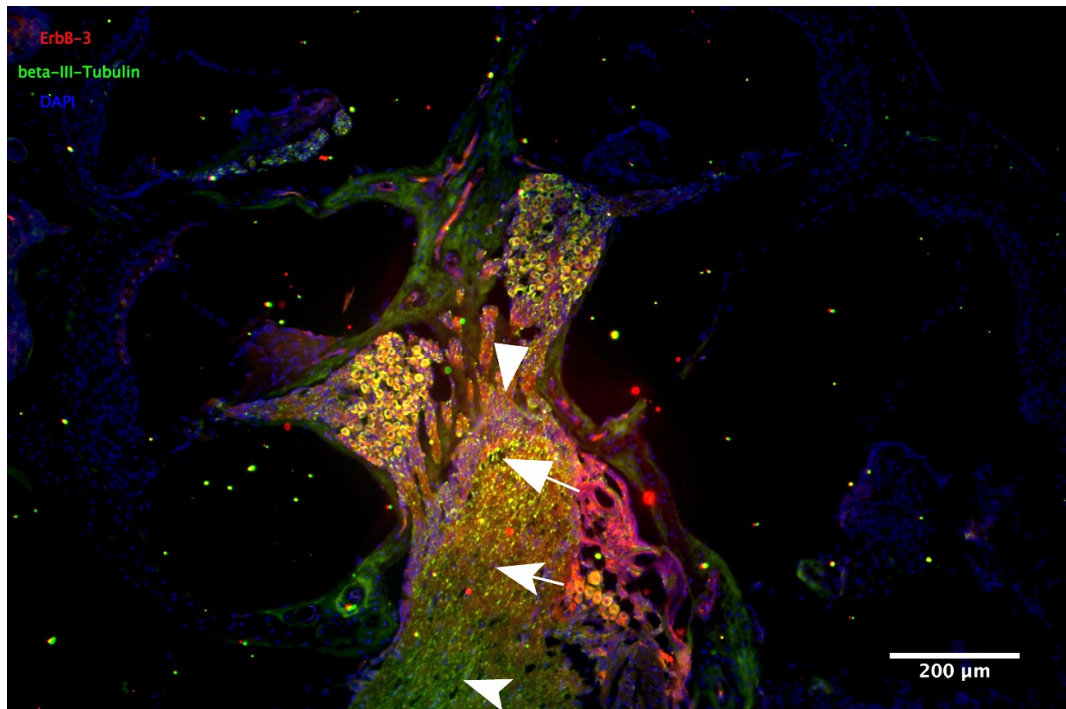


Abb. 12: Kryschnitt durch die Cochlea von adulten Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine hohe Expression des ErbB3 Rezeptors in den Spiralganglien, in den peripheren Neuriten und im Bereich der Glia limitans (Pfeil), eine geringe Expression von ErbB3 in den zentralen Neuriten weiter proximal (eingekerbter Pfeil) sowie eine geringe Expression in den basalen zentralen Neuriten (eingekerbter Pfeilkopf). Es zeigte sich weiterhin eine hohe Zelldichte im Bereich der Glia limitans (Pfeilkopf). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: ErbB3 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Im Bereich der Habenula perforata von adulten Cochleae zeigte sich insgesamt eine hohe Expression des ErbB3 Rezeptors (relativer Farbwert = 110) im Vergleich zu neugeborenen (P2) oder Cochleae im Alter von P14. Die Expression von ErbB3 war nach Durchtritt der Dendriten zum Corti-Organ besonders stark ausgeprägt (relativer Farbwert = 162). (Abb. 13)

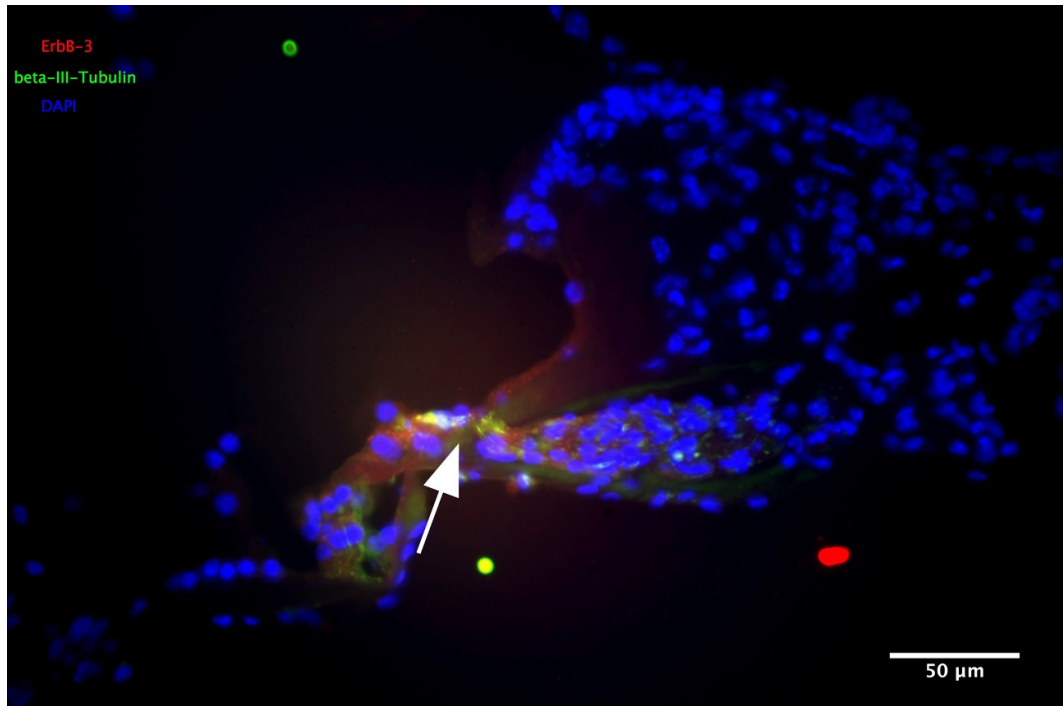


Abb. 13: Kryoschnitt durch die Cochlea von adulten Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich der Durchtritt der Neuriten zum adulten Corti-Organ im Bereich der Habenula perforata (Pfeil). Es imponierte eine hohe Expression von ErbB3 im Bereich der Neuriten proximal vor dem Durchtritt zum Corti-Organ und eine noch höhere Expression von ErbB3 nach dem Durchtritt distal von den Habenula perforata. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: ErbB3 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

3.2.1 Überblick

3.2.1.1 Expression von NRG1 in der Cochlea

Vor allem in den neugeborenen Cochleae in den Spiralganglien und in den Habenula perforata war die Expression von NRG1 stark ausgeprägt. Die Expression schwächte sich im Alter von 14 Tagen zunehmend ab und nahm in den adulten Cochleae erneut etwas zu. Die Expression von NRG1 in den Neuriten war in den meisten Fällen geringer ausgeprägt als in den Spiralganglienzellsomata. Eine Ausnahme bildeten die Axone in adulten Cochleae. Dort wurde NRG1 geringfügig stärker exprimiert als in den Spiralganglienzellsomata. Die stärkste Expression hingegen konnte man in den nicht-neuronalen Satellitenzellen in adulten Cochleae nachweisen.

Tabelle 7: Übersicht Expression von NRG1 in Cochleae von Mäusen

	Satelliten- zellen	Spiralgang- lienzellen	Habenula perforata	Neuriten	Glia limitans
P2		+++	+++	++	
P14		+		+	+
Adult	+++	++	+	++	

+++ hohe Expression von NRG1
 ++ mittlere Expression von NRG1
 + geringe Expression von NRG1

3.2.1.2 Expression von ErbB3 in der Cochlea

Die Expression des ErbB3 Rezeptors war am stärksten in den Habenula perforata von adulten Cochleae und am schwächsten in den Habenula perforata von neugeborenen Cochleae im Alter von P2 ausgeprägt.

In den Spiralganglien von adulten Cochleae zeigte sich die zweithöchste Expression von ErbB3. Es imponierte eine mittlere Expression in Spiralganglien von Cochleae im Alter von P2 und P14. Das Expressionsmuster in den Spiralganglien dieser Altersstufen war vergleichbar. In den Neuriten dieser Altersstufen zeigte sich insgesamt eine deutlich geringere Expression.

Auffällig war ferner die hohe Expression des ErbB3 Rezeptors entlang der Glia limitans in adulten Cochleae.

Tabelle 8: Übersicht Expression von ErbB3 in Cochleae von Mäusen

	Habenula perforata	Spiralganglienzellen	Glia limitans	Neuriten	Distal des Durchtritts der Neuriten zum Corti- Organ
P2	+	++		+	
P14		++		+	
Adult	+++	+++	+++	+++	+++

+++ hohe Expression von ErbB3
 ++ mittlere Expression von ErbB3
 + geringe Expression von ErbB3

3.3 Organkulturen

3.3.1 Expression von NRG1 und ErbB3 in Organkulturen von Spiralganglienzellen

Mithilfe von Immunfluoreszenzantikörpern gelang auch in Organkulturen von Spiralganglienzellen der Nachweis von NRG1 und ErbB3. NRG1 wurde entlang der Spiralganglienneuriten und im Bereich von Zellsomata exprimiert. Die Zellen, in deren Somata NRG1 exprimiert wurde, begleiteten die Neuriten und entsprachen am ehesten Schwannzellen.

Mit einer ähnlichen Intensität und einem ähnlichen Expressionsmuster wie NRG1 wurde auch der ErbB3 Rezeptor entlang der Spiralganglienneuriten und im Bereich der Zellsomata am ehesten von Schwannzellen exprimiert. (Abb. 14 und 15)

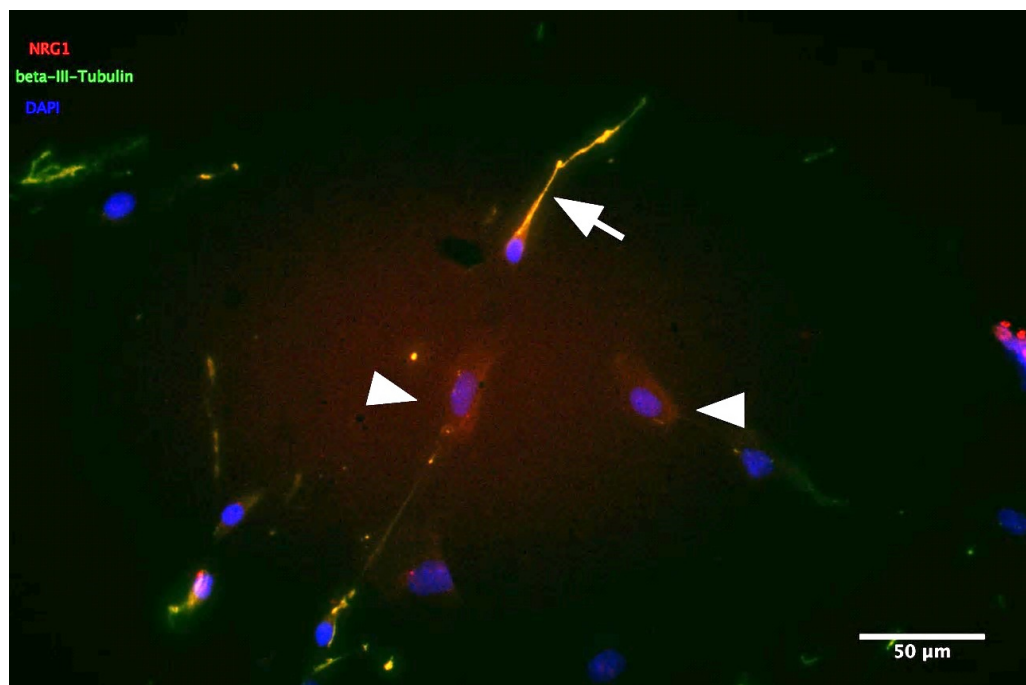


Abb. 14: Organkultur von Spiralganglienzellen von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine Expression von NRG1 in den Spiralganglienneuriten (Pfeil) sowie in den Zellsomata am ehesten von Schwannzellen (Pfeilköpfe). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: NRG1 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

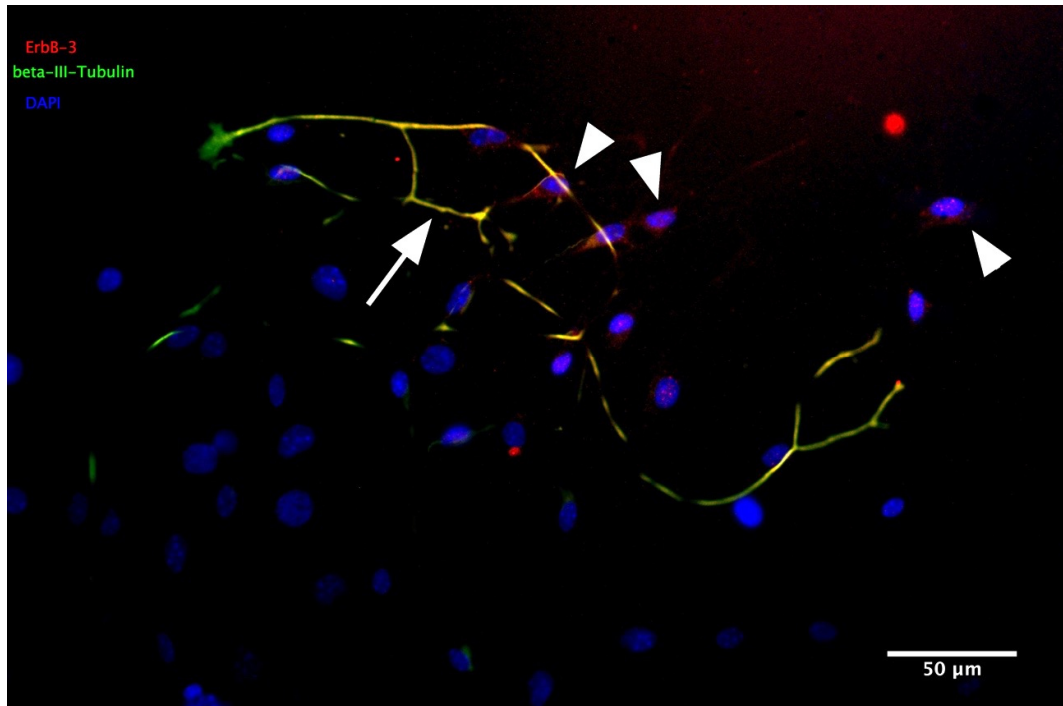


Abb. 15: Organkultur von Spiralganglienzellen von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich eine Expression von ErbB3 in den Spiralganglienneuriten (Pfeil) sowie in den Zellsomata am ehesten von Schwannzellen (Pfeilköpfe). Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: ErbB3 → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

3.3.2 Einfluss von NRG1 auf das Auswachsen von Neuriten in Organkulturen von Spiralganglienzellen

Die Anzahl der Neuriten in der Gesamtstichprobe N (N=1274) war nach Zugabe von NRG1 im Vergleich zur Kontrolle (N=450) und CI-1033 (N=680) signifikant am höchsten.

Die Zugabe von 100ng/ml NRG1 führte zu einem durchschnittlichen Längenwachstum von 265 μm und damit waren diese Neuriten im Durchschnitt 58 μm länger als die Neuriten in der Kontroll-Kultur (Abb.19).

Das Wachstumsmuster der Neuriten bei einer Konzentration von 100ng/ml NRG1 zeigte eine Dichtezunahme der Neuriten, eine ausgeprägte Tendenz zur Verzweigung und Überkreuzung sowie zu einer frühen Faszikulation. Dabei war das Auswachsen der Neuriten konzentrisch betont und vom Explantat ausgehend insgesamt gleichmäßig stark ausgeprägt (Abb. 16).

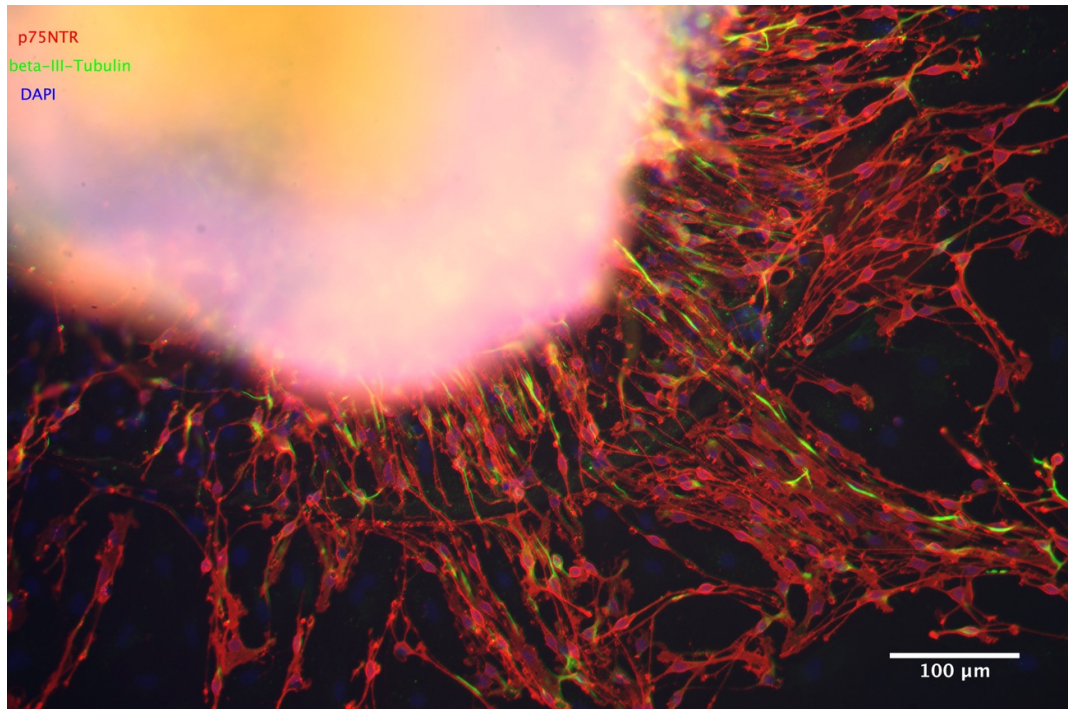


Abb. 16: Organkultur von Spiralganglienexplantaten von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich ein konzentrisches Auswachsen der Neuriten nach Zugabe von 100ng/ml NRG1. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: p75NTR → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Nach Zugabe von 200ng/ml NRG1 zeigte sich ein Längenwachstum der Neuriten von 462 μm. Die Neuriten waren signifikant 197μm länger im Vergleich zu 100ng/ml NRG1 und somit nahezu doppelt so lang. Im Vergleich zur Kontrolle waren die Neuriten signifikant durchschnittlich 256 μm länger (Abb. 19). Weiterhin war die Anzahl der Neuriten (N=515) nach Zugabe von 200ng/ml NRG1 signifikant höher als mit 100ng/ml NRG1 (N=331) und sie zeigten ein homogenes, dichter verzweigtes Wachstumsmuster (Abb. 17).

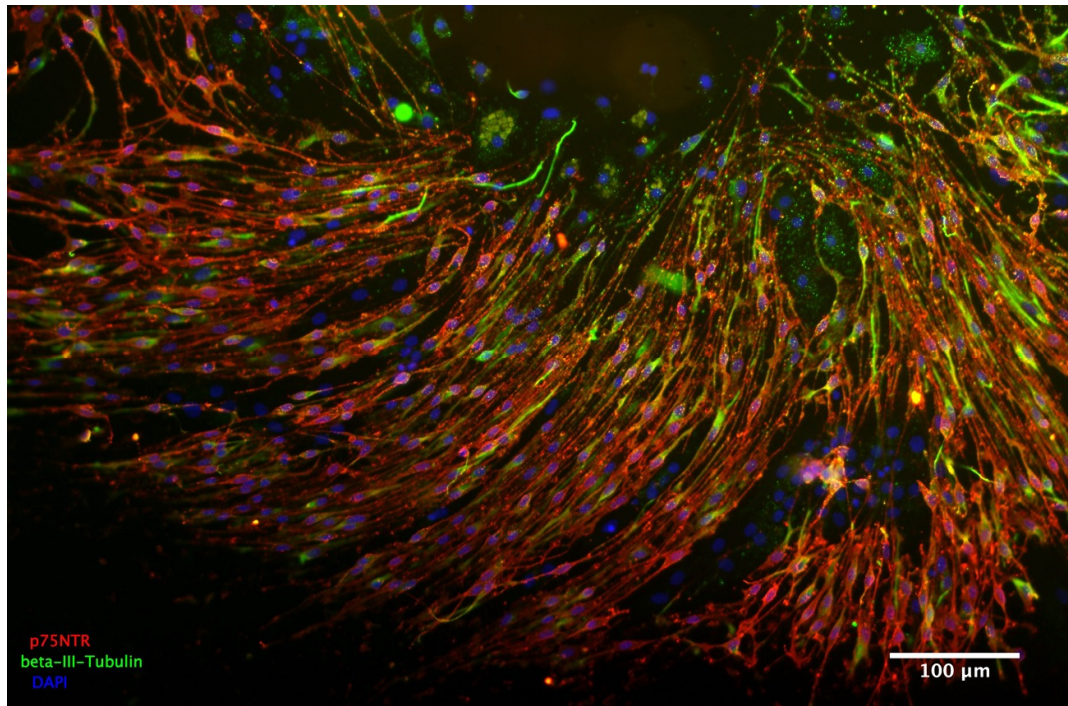


Abb. 17: Organkultur von Spiralganglienexplantaten von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich ein homogen, dicht beieinanderliegendes Auswachsen der Neuriten nach Zugabe von 200ng/ml NRG1. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: p75NTR → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Nachdem NRG1 in einer Konzentration von 400ng/ml hinzugegeben wurde, imponierte ein Längenwachstum von 523 μm und dieses war 60 μm signifikant länger im Vergleich zu 200ng/ml NRG1 (Abb. 19).

Das Auswachsen der Neuriten war bei dieser Konzentration noch dichter beisammen als nach Zugabe von 100ng/ml und 200ng/ml NRG1 (Abb. 18).

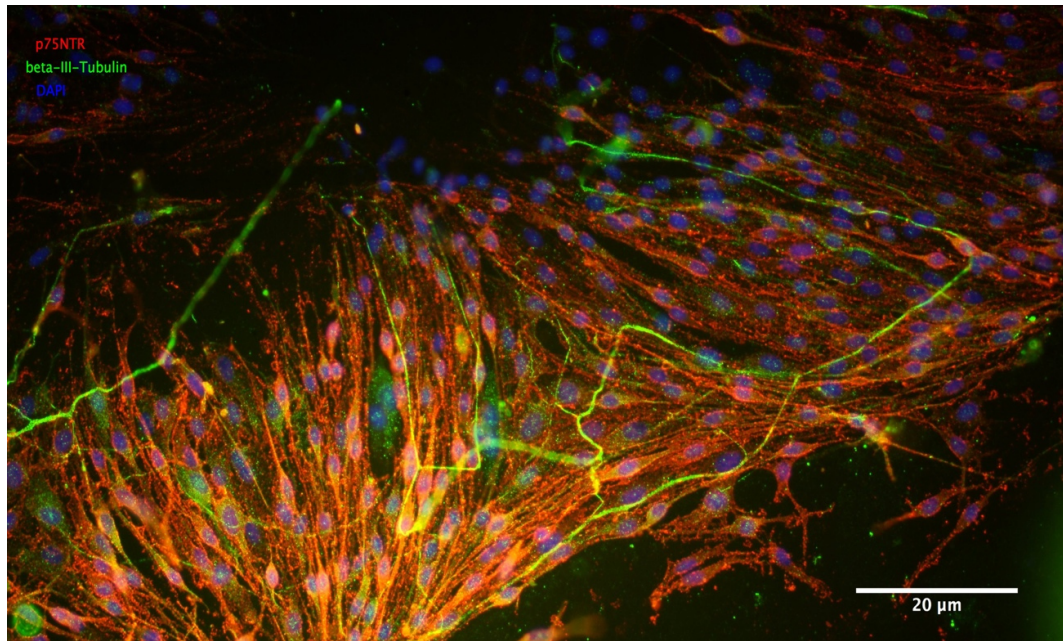


Abb. 18: Organkultur von Spiralganglienexplantaten von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich ein sehr dichtes Auswachsen der Neuriten nach Zugabe von 400ng/ml NRG1. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: p75NTR → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

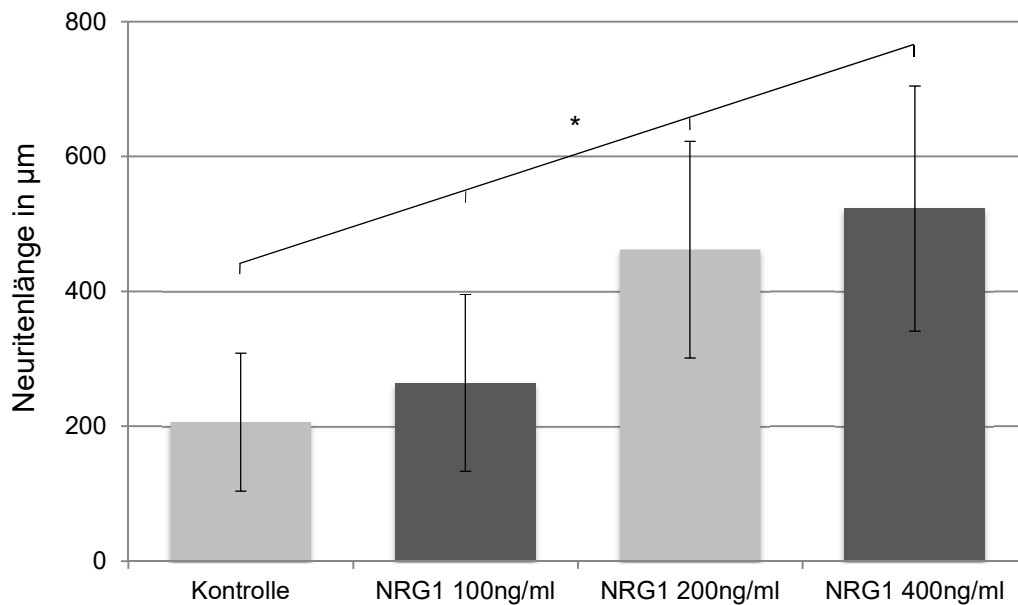


Abb. 19: Balkendiagramm der Neuritenlänge in Spiralganglienexplantaten nach Zugabe von NRG1 in aufsteigender Konzentration im Vergleich zur Kontrolle

Signifikanter Unterschied im Neuritenwachstum nach Zugabe von NRG1 in den Konzentrationen 100ng/ml → 265µm, 200ng/ml → 462 µm sowie 400ng/ml → 523 µm im Vergleich zueinander und zur Kontrolle → 206 µm. *p ≤0,05

3.3.3 Einfluss des Pan-ErbB-Inhibitors CI-1033 auf das Auswachsen von Neuriten in Organkulturen von Spiralganglienzellen

Die Anzahl der Neuriten (N=680) war nach Zugabe von CI-1033 signifikant kleiner im Vergleich zu NRG1 und nicht-signifikant größer im Vergleich zur Kontrolle (N=450).

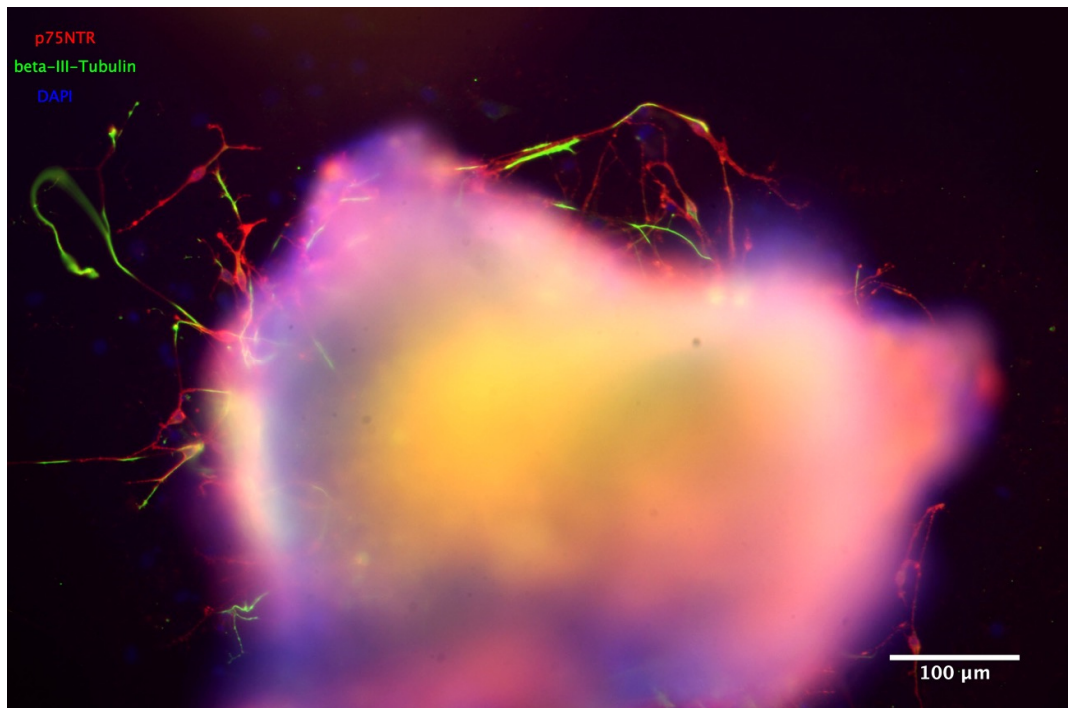


Abb. 20: Organkultur von Spiralganglienexplantaten von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigten sich vereinzelte vom Explantat ausgehende Neuriten nach Zugabe von 1 μ M CI-1033. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: p75NTR $\rightarrow$ rot / beta-III-Tubulin $\rightarrow$ grün / DAPI $\rightarrow$ blau.

Die durchschnittliche Neuritenlänge war nach Zugabe der höchsten Konzentration von 1 μ M CI-1033 163 μ m lang und damit 43 μ m signifikant kürzer als in der Kontroll-Kultur sowie signifikant kürzer als in Kulturen von NRG1 in allen Konzentrationsstufen (Abb. 23).

Weiterhin ließ sich nur ein schwaches Auswachsen sowie eine fehlende Faszikulation der Neuriten im Vergleich zu den Spiralganglienzellkulturen von NRG1 erkennen. Ferner zeigte sich lediglich eine geringe Tendenz zur Verzweigung der Neuriten (Abb. 20).

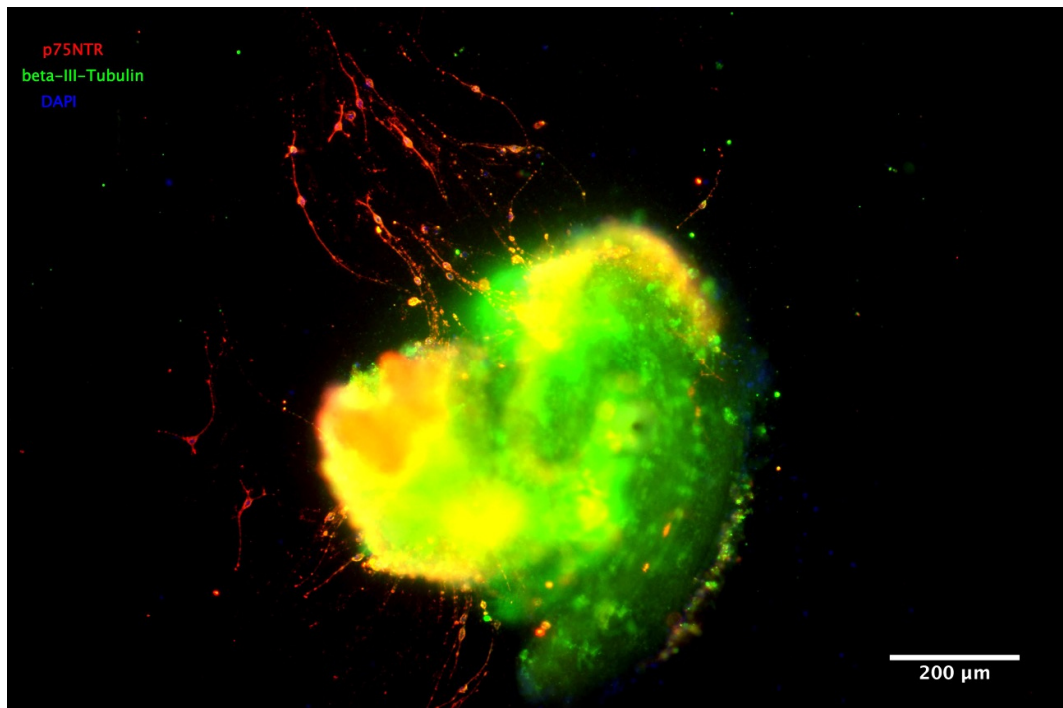


Abb. 21: Organkultur von Spiralganglienzellen von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigten sich vereinzelte, auswachsende Neuriten nach Zugabe von 0,5μM CI-1033. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: p75NTR → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Längenwachstum der Neuriten zwischen 0,5μM CI-1033 und der Kontrolle. Nach Zugabe von 0,5μM CI-1033 waren die Neuriten 154μm lang und damit 52μm signifikant kürzer als in der Kontrolle.

Weiterhin waren sie durchschnittlich 9μm nicht-signifikant kürzer als die Neuriten, welche mit 1μM CI-1033 kultiviert wurden (Abb. 23).

Bezüglich des Wachstumsmusters fiel eine geringe Anzahl sowie geringe Faszikulation der Neuriten auf. Zugleich zeigten sich einzelne, vom Explantat losgelöste, Neuriten (Abb. 21).

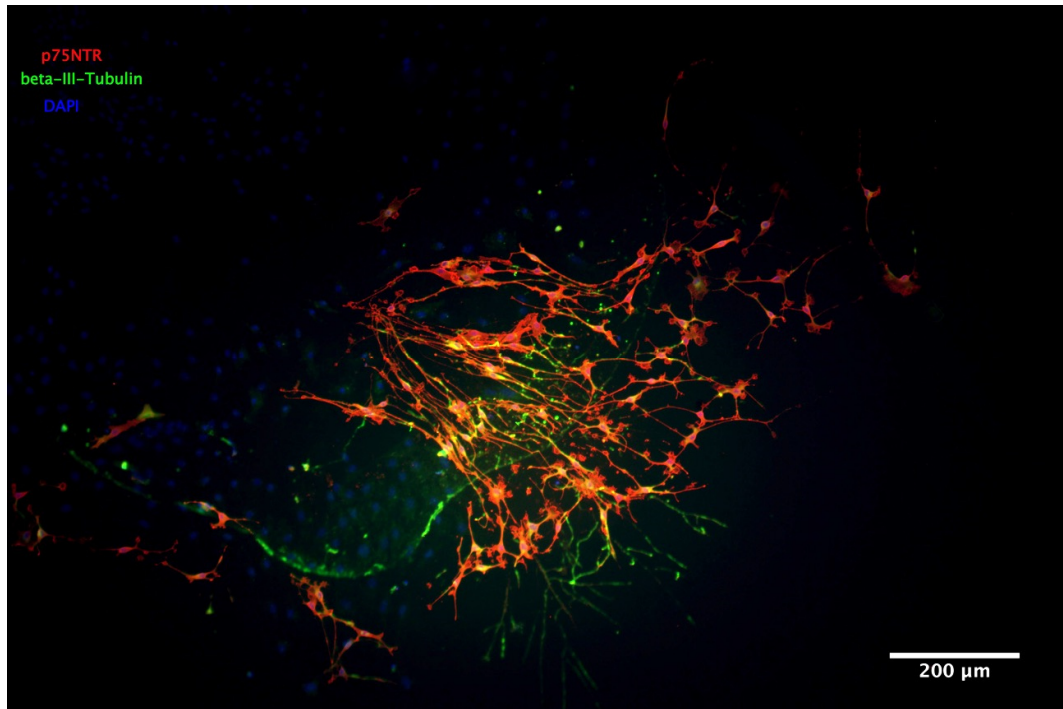


Abb. 22: Organkultur von Spiralganglienexplantaten von neugeborenen Mäusen nach Immunfluoreszenzfärbung

Es zeigte sich ein vom Explantat losgelöstes, mittleres Auswachsen der Neuriten nach Zugabe von $0,25\mu\text{M}$ CI-1033. Die Strukturen wurden wie folgt gefärbt: p75NTR → rot / beta-III-Tubulin → grün / DAPI → blau.

Zwischen der Konzentration $0,25\mu\text{M}$ CI-1033 und der Kontrolle zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Längenwachstum ($226\mu\text{m}$ vs. $206\mu\text{m}$). Die Neuriten waren durchschnittlich $20\mu\text{m}$ länger als in der Kontroll-Kultur.

Im Vergleich zu den Konzentrationen $0,5\mu\text{M}$ und $1\mu\text{M}$ CI-1033 zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Längenwachstum ($226\mu\text{m}$ vs. $155\mu\text{m}$ und 163). (Abb. 23).

Auch zwischen NRG1 und CI-1033 in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Längenwachstum der Neuriten. Die Neuriten waren nach Zugabe von $0,25\mu\text{M}$ CI-1033 durchschnittlich $191\mu\text{m}$ signifikant kürzer im Vergleich zu NRG1. Es zeigte sich ein antiproportionales Neuritenlängenwachstum nach Zugabe von NRG1 sowie CI-1033 in Abhängigkeit von der Konzentration (Abb. 19 und 23).

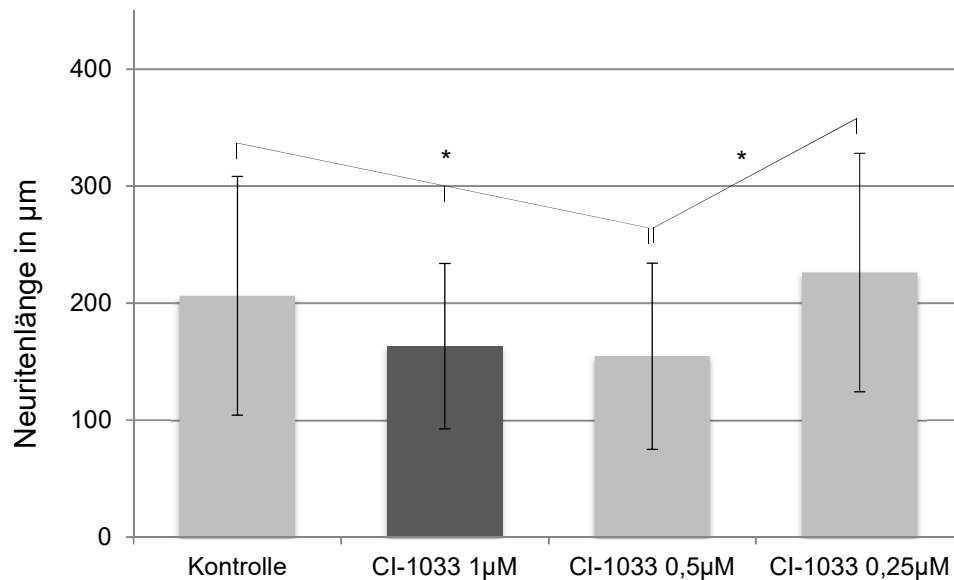


Abb. 23: Balkendiagramm der Neuritenlänge nach Zugabe von CI-1033 in absteigender Konzentration im Vergleich zur Kontrolle

Signifikanter Unterschied im Neuritenwachstum nach Zugabe von CI-1033 in den Konzentrationen 1µM → 163 µm, 0,5µM → 155µm sowie 0,25µM → 226µm im Vergleich zueinander und zur Kontrolle → 206µm. *p ≤ 0,05

3.3.4 Einfluss von NRG1 und CI-1033 auf das Migrationsverhalten von p75NTR-positiven und p75NTR-negativen Zellen in Organkulturen von Spiralganglienzellen

Die meisten Zellen, insbesondere aber die p75NTR-positiven Schwannzellen, traten in der Regel in der Umgebung des Explantats oder in unmittelbarer Nähe zu den Neuriten auf. Die p75NTR-negativen größeren Zellen verteilten sich unabhängig davon.

Die mikroskopische und statistische Auswertung der Zelldichte der nicht-neuronalen Zellen in der Spiralganglienzellkultur ergab eine signifikant höhere Dichte in den mit NRG1 behandelten Kulturen im Vergleich zu denen mit Pan-ErbB-Inhibitor CI-1033 behandelten Kulturen sowie im Vergleich zur Kontrolle. Der Anteil der p75NTR-positiven Zellen an den nicht-neuronalen Zellen betrug bei den NRG1 behandelten Kulturen 82,1 % im Vergleich zu 17,9 % p75NTR-negativen Zellen. Dies war unter Einfluss des Pan-ErbB-Inhibitors genau

gegensätzlich. Dort betrug der Anteil der p75NTR-positiven Zellen lediglich 21,1 % im Vergleich zu 78,9 % p75NTR-negativen Zellen. (Abb. 24).

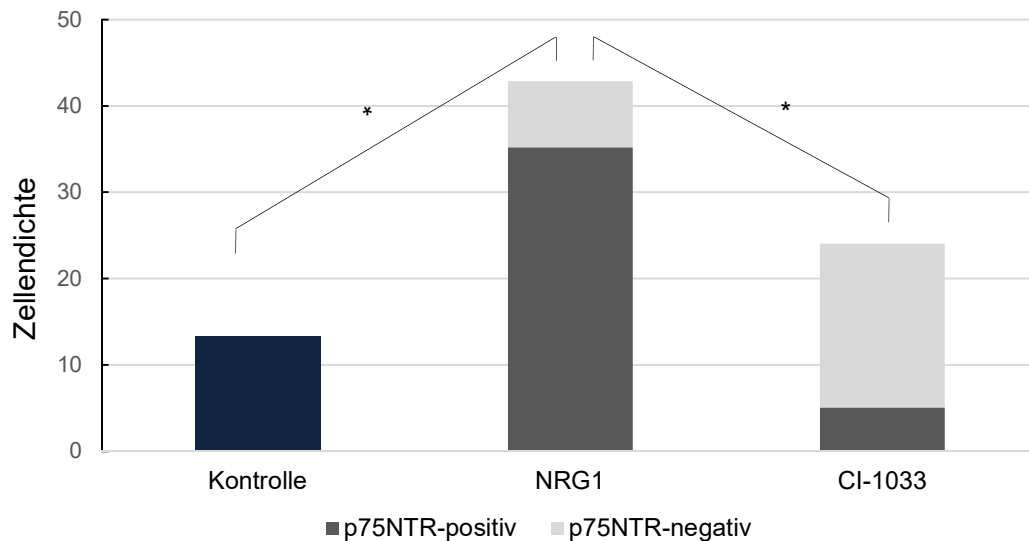


Abb. 24: Säulendiagramm der nicht-neuronalen Zellen in Anteilen in der Spiralganglienzellkultur unter dem Einfluss von NRG1 und CI-1033 im Vergleich * $p \leq 0,05$

Die Zellendichte wurde auch in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration von NRG1 und CI-1033 statistisch ausgewertet. So war die Zellendichte unter dem Einfluss von NRG1 in seiner höchsten Konzentration (400ng/ml) signifikant höher als bei den übrigen Konzentrationen von NRG1, als in der Kontrolle sowie im Vergleich zu CI-1033 in allen Konzentrationen. Weiterhin zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied in der Zellendichte zwischen NRG1 in einer Konzentration von 200ng/ml und CI-1033 in seiner höchsten Konzentration (1 μ M). Alle übrigen Konzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Zellendichte.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Spiralganglienzellkulturen zeigten sich die Abstände zwischen den Schwannzellen bzw. zwischen ihren Zellkernen entlang der Neuriten in Richtung Peripherie in Abhängigkeit der Faktoren NRG1 und CI-1033 unterschiedlich. So fiel auf, dass die Abstände unter Einfluss von CI-1033 länger waren und die Neuriten insgesamt kürzer. Das bedeutet, es ließen sich dort absolut sowie auch relativ (im Verhältnis zu der Länge der

Neuriten) weniger Schwannzellen finden. Die Abstände zwischen den Schwannzellen ließen sich jedoch nur eingeschränkt mikroskopisch beurteilen; da infolge der kurzen Neuriten unter dem Einfluss von CI-1033 nur geringe Mengen an Zellkernen der Schwannzellen für die Auswertung zur Verfügung standen.

4 Diskussion

4.1 Expression von NRG1 und ErbB3 in der Cochlea

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von NRG1 und ErbB3 in der Cochlea von Mäusen gezeigt werden. Es zeigte sich eine hohe Expression von NRG1 in den Somata von Spiralganglienneuronen und im Bereich der Habenula perforata von neugeborenen Mäusen. Es konnte ferner eine geringe Expression von NRG1 in Neuriten und in den Somata der Spiralganglienneurone von Mäusen im Alter von P14 gezeigt werden. Die Expression nahm in adulten Cochleae erneut zu. Es zeigte sich eine mäßige Expression von NRG1 in den Somata von Spiralganglienneuronen und ihren Axonen in adulten Mäusen. Hieraus ließ sich ableiten, dass das Expressionsmuster von NRG1 in Spiralganglienneuronen und im Bereich der Habenula perforata eine altersabhängige Verteilung widerspiegelt. Die Expression von NRG1 entlang der Neuriten (Dendriten und Axone) hingegen war stets mäßig bis gering ausgeprägt und wurde somit nicht altersabhängig hoch- oder herunterreguliert. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit konnte in bisherigen Arbeiten die Expression von NRG1 in Spiralganglienneuronen von neugeborenen Ratten im Alter von 5 Tagen (P5) (Hansen et al., 2001) sowie eine Expression von NRG1 in den Spiralganglienneuronen von adulten Mäusen (Stankovic et al., 2004) gezeigt werden. Eine altersabhängige Untersuchung des Expressionsmusters wie in dieser vorliegenden Arbeit wurde in den genannten Arbeiten jedoch nicht durchgeführt. Ferner wurde durch diese Arbeit die Expression von NRG1 in Spiralganglienneuronen in noch jüngeren Cochleae von Mäusen im Alter von zwei Tagen (P2) nachgewiesen.

Auffällig war weiterhin eine sehr hohe Expression von NRG1 in Satellitenzellen von adulten Cochleae. Da Satellitenzellen mit Neuronen zu kommunizieren scheinen (Hanani, 2010) und eine Rolle für das Überleben der Spiralganglienneurone (Akil et al., 2015) sowie für die Proliferation von geschädigten Nerven der sensorischen Ganglien spielen (Arkhipova et al., 2010) lässt sich daraus ableiten, dass NRG1 auch in diesen Zellen eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktor und Signalprotein erfüllt.

Zusammenfassend spielte NRG1 besonders in den neuronalen Strukturen von unreifen Cochleae im Alter von zwei Tagen (Spiralganglien und Habenula perforata) sowie auch in den Satellitenzellen von adulten Cochleae eine wichtige Rolle.

Eine Expression von NRG1 im Corti-Organ von neugeborenen Mäusen ließ sich mithilfe dieser Arbeit nur indirekt im Bereich der Habenula perforata nachweisen. Die Frage nach Expression von NRG1 in den Haarzellen und den Stützzellen sowie eine Differenzierung dieser Zellen war mit dem angewandten oben beschriebenen Verfahren nicht möglich.

Dies sollte insofern in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, als das Stützzellen des Corti-Organs ähnlich wie Schwannzellen unmyelinisierte Dendriten der Spiralganglienneurone kurz vor der Haarzellsynapse ummanteln und zum Überleben von Spiralganglienneuronen beitragen (Stankovic et al., 2004).

In aktuellen Arbeiten wurden den Stützzellen analog zu den Gliazellen unter anderem eine tragende Rolle bei der Entwicklung und Regeneration, bei der trophischen Unterstützung der Spiralganglienzellen sowie bei der Modulation von Neurotransmittern in der Synapse von Haarzellen und Dendriten der Spiralganglienneurone zugeschrieben (Monzack and Cunningham, 2013). Diesbezüglich wäre die Detektion von NRG1 in den Stützzellen von Interesse.

Im Vergleich dazu wurde in weiteren Arbeiten bisher nur die Expression von ErbB2 und ErbB3 in den Stützzellen, in den inneren Haarzellen sowie in Spiralganglienzellen von adulten Cochleae von Mäusen (Stankovic et al., 2004) und von Chinchillas beschrieben (Zhang et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich die Expression von ErbB3 in den Spiralganglienneuronen von Mäusen bestätigen. Es zeigte sich eine hohe Expression in den Somata von Spiralganglienneuronen und in der Glia limitans von adulten Mäusen. Die Expression in Spiralganglienneuronen der neugeborenen und P14 Mäuse war hingegen nur mäßig ausgeprägt. In den Neuriten der jüngeren Cochleae wurde ErbB3 gering bis mäßig exprimiert, ähnlich wie bei NRG1 in allen Altersklassen.

Interessant war hingegen, dass die Expression von ErbB3 im Bereich der Habenula perforata von adulten Cochleae sehr ausgeprägt war. So fiel auf, dass während der Entwicklung der Cochleae eine Hochregulation des ErbB3-

Rezeptors stattgefunden hat, welcher in adulten Cochleae seine maximale Expression erreicht hatte. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die Expression von ErbB3 von besonderer Bedeutung in neuronalen Zellen der adulten Cochleae zu sein schien, wohingegen NRG1 eine wichtige Rolle in neugeborenen Spiralganglienzellen sowie in adulten Satellitenzellen spielte. Das Expressionsmuster von NRG1 und ErbB3, bezogen auf das Alter und die dortigen Strukturen, schien sich reziprok zu verhalten. Beispielsweise könnte eine mögliche Hochregulation von ErbB3 infolge der Herunterregulation von NRG1 eine stärkere Bindung des Liganden bewirken, was zu einer verbesserten Zell-Zell-Interaktion der Gliazellen und der Spiralganglienneurone führen würde. Möglicherweise spielen bei adulten Tieren dann andere Liganden von ErbB3 eine größere Rolle.

Des Weiteren fiel im Bereich der Habenula perforata von adulten Cochleae eine erhöhte Zelldichte auf. Die im Vergleich zu neugeborenen Cochleae im Alter von P2 vermehrt vorkommenden Zellen ließen sich in den Versuchsreihen mit NRG1 und ErbB3 gleichermaßen detektieren. Hierbei könnte es sich zum Beispiel um Schwannzellen gehandelt haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich im Bereich der Habenula perforata mögliche Schlüsselmediatoren für die Entwicklung und für die Aufrechterhaltung der Integrität der Spiralganglienneurone und des Corti-Organs befinden, welche den NRG1/ErbB-Signalweg hierfür benötigen und in Abhängigkeit vom Alter reguliert werden. Schwannzellen oder Stützzellen, welche ebenfalls Merkmale von Gliazellen aufweisen (Pack and Slepecky, 1995), könnten bei einer solchen Zell-Zell-Interaktion im Bereich der Habenula perforata beteiligt sein.

Weiterhin ergeben sich anhand dieser Arbeit Hinweise darauf, dass NRG1/ErbB auch bei der Myelinisierung der Neuriten des Nervus cochlearis eine Rolle spielen könnte, da NRG1 im Alter der ausgereiften Myelinisierung (P14) in den Somata der Spiralganglienneurone noch sehr gering exprimiert wurde und zuvor im neugeborenen Alter von P2 sehr stark exprimiert war. Möglicherweise ist eine hohe NRG1 Expression für eine adäquate Myelinisierung notwendig. Insgesamt sind die Prozesse der Myelinisierung der peripheren Neuriten, der Glia limitans sowie der Neuriten des zentralen Nervensystems des Nervus cochlearis noch nicht vollständig verstanden, woraus sich insbesondere im Hinblick auf den

NRG1/ErbB-Signalweg der Anlass für weiterführende Forschung auf diesem Gebiet ergibt.

4.1.1 Der Einfluss von NRG1 auf nicht-neuronale Zellen und Neuriten in der Spiralganglienzell-Organokultur

Es zeigte sich unter dem Einfluss von NRG1 eine insgesamt höhere Dichte von nicht-neuronalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle sowie in der Kultur unter Einfluss von CI-1033.

Hansen und al. konnten 2001 eine Proliferationssteigerung von Schwannzellen nach Zugabe von NRG1 in Spiralganglienzellkulturen zeigen. In der vorliegenden Arbeit ließ sich ebenfalls eine Proliferationssteigerung von nicht-neuronalen p75NTR-positiven unreifen Schwannzellen in der Spiralganglienzell-Organokultur infolge einer Behandlung mit NRG1 nachweisen. Die Ursache hierfür könnte eine Hochregulation des p75NTR-Rezeptors in den Schwannzellen nach Zugabe von NRG1 gewesen sein. In vergangenen Arbeiten wurde eine Hochregulation des p75NTR-Rezeptors in sensorischen Hinterwurzelganglien nach peripherer Nervenschädigung beobachtet (Zhou et al., 1996). Der p75NTR-Rezeptor der Schwannzellen hatte darüber hinaus Einfluss auf die Remyelinisierung und Regeneration von Nerven nach Verletzung (Tomita et al., 2007).

Auffällig war ferner eine verringerte Dichte der p75NTR-negativen Zellen sowohl anteilig als auch absolut unter NRG1 Einfluss im Vergleich zur Kontrolle und mit CI-1033 Behandlung. Die Proliferationssteigerung der p75NTR-positiven Schwannzellen könnte eine Verdrängung der anderen nicht-neuronalen Zellen wie z.B. der Fibroblasten durch Entzug von anderen Wachstumsfaktoren bewirkt haben.

Es konnte folglich mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Schwannzellen in der Spiralganglienzell-Kultur mitogene Signale des NRG1/ErbB-Signalweges für ihre Proliferation benötigen. So wurde bereits in der Vergangenheit demonstriert, dass der NRG1/ErbB-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Regeneration von peripheren Nerven nach ihrer Schädigung zu spielen scheint und hierbei auf eine Interaktion von Schwannzellen und Neuronen angewiesen ist (Geuna et al., 2007).

Weiterhin fiel auf, dass die Zelldichte nicht so sehr von der jeweiligen Konzentration von NRG1 abhing, wie dies der Fall bei den Neuriten war. Die

Zellendichte in Abhängigkeit von der Konzentration zeigte zum Teil keine signifikanten Unterschiede. Die Ursache dafür könnte eine geringe Anzahl der nicht-neuronalen Zellen in Bezug zur Konzentration gewesen sein. So konnte die Frage nach einem möglichen Sättigungseffekt von NRG1 in Bezug auf die Proliferation von nicht-neuronalen Zellen nicht geklärt werden. Hierfür wäre eine höhere Anzahl an nicht-neuronalen Zellen notwendig.

In Bezug auf die Neuritenlänge der Spiralganglienneurone in Abhängigkeit von NRG1 konnte mithilfe dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle und zu CI-1033 gezeigt werden.

Es imponierte zudem eine signifikante Dosisabhängigkeit der Neuritenproliferation in Bezug auf die Konzentration von NRG1. Ferner wurde in diesem Zusammenhang ein Sättigungseffekt infolge einer weiteren Dosissteigerung beobachtet. Die Neuritenlänge hatte sich nach Zugabe von 200ng/ml NRG1 deutlich gesteigert und steigerte sich nur noch gering nach einer weiteren Erhöhung der Konzentration, so dass eine Stagnation der Neuritenelongation resultierte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf das Neuritenwachstum und die Proliferation von nicht-neuronalen Zellen waren mit der Arbeit von Audisio und al. aus 2012, welche an sensorischen Hinterwurzelganglien von Ratten durchgeführt wurde, vereinbar. Dort zeigte sich, dass der Zusatz von NRG1 zu den Kulturen ein Neuritenwachstum der Hinterwurzelganglien und eine Proliferation von nicht-neuronalen Zellen zur Folge hatte.

Es konnte mithilfe der vorliegenden Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass nach Zugabe von NRG1 die Menge der Neuriten in der Kultur zunahm und ihr Auswachsen dichter beisammen lag.

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeit von Audisio und al. keinen Einfluss von NRG1 auf die Anzahl der Neuriten nachweisen. Ursächlich für den Unterschied könnte sein, dass Audisio und al. die NRG1 Zugabe im Vergleich zur NGF-Zugabe untersucht hatten. Nach NRG1 Zugabe kam es zu insgesamt weniger, jedoch längeren Neuriten. NGF führte wiederum zur einer größeren Anzahl, jedoch zu kürzeren Neuriten (Audisio et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde die Länge und Menge der Neuriten nach Zugabe von NRG1 nicht im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren wie NGF untersucht. Diese Hypothese ließ sich mit einer weiteren, älteren Arbeit an Hinterwurzelganglien von Ratten

unterstützen. Dort konnte gezeigt werden, dass NRG1 die Proliferation und Migration von Schwannzellen und in höheren Konzentrationen und indirekt über eine vermutliche Schwannzellmigration nach einigen Tagen auch das Auswachsen der Neuriten induzierte. Im Vergleich dazu zeigte sich nach Zugabe von NGF im Vergleich zu NRG1 ein direkter, stärkerer Effekt auf das Auswachsen der Neuriten bereits nach einem Tag (Mahanthappa et al., 1996).

Die Ergebnisse der vergangenen Arbeiten stimmen mit der vorliegenden Arbeit insofern überein, als dass auch hier infolge der Schwannzellmigration, welche einige Tage benötigt, indirekt über parakrine Mechanismen wie Bindung von NRG1 an ErbB-Rezeptoren von Schwannzellen mit resultierender NGF-Sekretion (Audisio et al., 2012, Romano et al., 2015) das Auswachsen der Neuriten und ihre Proliferation gefördert wurde, da die Neuriten mindestens drei Tage bebrütet wurden.

Da periphere Nerven im Allgemeinen die Fähigkeit zur Regeneration besitzen, könnte NRG1 via Schwannzell-Interaktion mithilfe eines positiven Feedback Mechanismus einen enormen Einfluss auf ihre Fähigkeit zur Regeneration haben. Im Hinblick auf die sekundäre Degeneration von Spiralganglienneuronen als gravierende Folge nach Ertaubung, könnten die oben diskutierten Ergebnisse wichtige Hinweise auf eine mögliche Regenerationsfähigkeit des Nervus cochlearis liefern. In diesem Zusammenhang könnte die Integrität des NRG1/ErbB-Signalweg in Bezug auf die Spiralganglienneurone und Schwannzellen eine kritische Rolle spielen. In weiterführenden Arbeiten gilt es zu untersuchen, ob NRG1 auch *in vivo* eingesetzt werden könnte und ob seine Potenz in Bezug auf das Neuritenwachstum gleichermaßen ausgeprägt wäre.

4.1.2 Der Einfluss von CI-1033 auf nicht-neuronale Zellen und Neuriten in der Spiralganglienzell-Organokultur

In den Kulturen unter Einfluss von CI-1033 zeigte sich insgesamt eine geringere Dichte von nicht-neuronalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle und zu NRG1. Zudem fiel eine höhere Dichte von p75NTR-negativen sowie eine geringere Dichte von p75NTR-positiven Zellen im Vergleich zu Kulturen nach Zugabe von NRG1 auf. Der Pan-ErbB Inhibitor CI-1033 inhibierte die Proliferation von p75NTR-positiven Schwannzellen und förderte die Proliferation der p75NTR-negativen Schwannzellen. Da es sich bei den p75NTR-negativen am ehesten um andere Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten handelte, stand die Proliferation dieser Zellen vermutlich nicht unter dem Einfluss von ErbB. Die höhere Dichte dieser Zellen resultierte am ehesten kompetitiv aus der mangelnden Proliferation der p75NTR-positiven Schwannzellen durch ein erhöhtes Angebot von Nährstoffen im Kulturmedium.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf die Inhibition des NRG1/ErbB-Signalweges durch CI-1033 sind vereinbar mit einer Arbeit von Watanabe und al. aus 2010 an Meerschweinchen, welche eine Beeinträchtigung des Hörvermögens *in vivo* durch einen ErbB2 Rezeptor-Inhibitor gezeigt hatte. Eine ErbB2-Inhibition führte zu einer Reduktion der Genexpression von Neurotrophin-3, welches von Schwannzellen ausgeschüttet wird. Weiterhin konnte eine kompensatorische Expression des ErbB2-Rezeptors nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2010). So fiel indirekt eine Reduktion der Schwannzellen nach ErbB3-Inhibition auf, die auch nach Pan-ErbB-Inhibition mit CI-1033 anhand der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Auch nach Zugabe von CI-1033 fiel ähnlich wie nach Zugabe von NRG1 auf, dass die Zelldichte nicht von der jeweiligen Konzentration von CI-1033 abhing, wie das bei den Neuriten der Fall war. Dies ließ sich vermutlich auf die geringe Anzahl der nicht-neuronalen Zellen zurückzuführen, die unter CI-1033 noch geringer ausfiel als unter NRG1.

Es imponierte eine unterschiedliche Verteilung der Schwannzellen in Bezug auf die Neuriten unter NRG1 und CI-1033 Einfluss. Die Abstände zwischen den einzelnen Schwannzellen entlang der Neuriten waren unter dem Einfluss des Inhibitors insgesamt länger. Dadurch, dass die Neuriten insgesamt kürzer waren,

könnte sich die Schwannzell- sowie Neuritenproliferation wechselseitig inhibiert haben. So scheint eine hohe Schwannzelldichte entlang der Neuriten, wie unter dem Einfluss von NRG1, für die Integrität der Neuron-Gliazellinteraktion notwendig zu sein, um eine Neuriten- sowie Schwannzellproliferation zu induzieren. Anhand der vorliegenden Arbeit kann somit die ausgeprägte wechselseitige Interaktion und Co-Abhängigkeit von Neuriten und Schwannzellen in Bezug auf den NRG1/ErbB-Signalweg speziell gezeigt werden.

Analog zur verminderten Schwannzelldichte, fiel unter CI-1033 Einfluss eine verminderte Neuritendichte, geringere Verzweigung der Neuriten sowie das bereits oben erwähnte verminderte Längenwachstum im Vergleich zu den Kontrollkulturen und zu den Kulturen mit NRG1 auf. Watanabe und al. konnten in adulten Cochleae von Meerschweinchen zwar eine Beeinträchtigung des Hörvermögens zeigen, eine Reduktion der Neuriten wurde im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet.

Daraus ließ sich schließen, dass die adulten Spiralganglienzellneurone der Meerschweinchen im Vergleich zu den jungen Spiralganglienzellneuronen der unreifen Mäuse in der vorliegenden Arbeit, resistenter gegen eine Dysregulation des NRG1/ErbB Signalweges gewesen sind. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass die Neuronen-Degeneration unter einer längeren Exposition des ErbB2-Inhibitors langsam voranschreiten könnte, da der Hörverlust mit zunehmender Zeit weiter progredient gewesen war (Watanabe et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass die Neurone unter Pan-ErbB-Inhibition eine deutlich geringere Tendenz zur Faszikulation und Verzweigung im Vergleich zu den Kontroll- und NRG1 Kulturen aufwiesen.

Vereinbar war diese Beobachtung mit einer Arbeit an transgenen Mäusen, in der mithilfe des dominant-negativen ErbB4 Rezeptors (DN-erbB4) (Chen et al., 2003) eine vollständige Inhibition aller ErbB-Rezeptoren in Stützzellen herbeigeführt wurde, woraufhin es sekundär zu einer Degeneration von 80 % der Spiralganglienneurone in jungen Cochleae während der ersten vier Wochen kam (Stankovic et al., 2004).

Bezüglich der Frage nach Dosisabhängigkeit von CI-1033 konnten in der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede in der Neuritenlänge in Abhängigkeit von der Konzentration gezeigt werden. Diese waren jedoch nicht so ausgeprägt

wie bei der Konzentrationssteigerung von NRG1. CI-1033 zeigte in der geringsten Konzentration 0,25µM kaum mehr Wirkung, da die Neuriten im Vergleich zur Kontroll-Kultur sogar nicht-signifikant etwas länger waren. Umgekehrt lässt sich am ehesten auch von einem Sättigungseffekt ausgehen. Die Neuriten zeigten unter der doppelten (0,5µM) und vierfachen Maximalkonzentration (1µM) von CI-1033 kaum Unterschiede in der Neuritenlänge. Die Ursache hierfür könnte, ähnlich wie bei der Auswertung der nicht-neuronalen Zellen, eine zu niedrige Anzahl der Neuriten sein. Die niedrige Anzahl ist wiederum auf den Effekt der Pan-ErbB-Inhibition zurückzuführen, welche nicht nur zu kurzen Neuriten geführt hat, sondern auch zur Folge hatte, dass insgesamt deutlich weniger Neurone überlebten.

In einer vergangenen Arbeit erwies sich CI-1033 (Canertinib) im Zebrafisch-Modell *in vivo* als ototoxisch, ging mit Haarzellverlust einher und zeigte ebenfalls eine dosisabhängige Wirkung, vereinbar mit der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse wurden mithilfe von einem Maus-Modell *in vivo* desselben Inzuchtstammes (C57BL/6J), welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde, sowie mithilfe eines weiteren Stammes (CBA/CaJ), bestätigt. Sie wurde jedoch anders als in dieser Arbeit über otoakustische Emissionen, Hirnstammaudiometrie und das Zählen von Haarzellen gemessen. Analog zur Inhibition des Neuritenwachstums und Überlebens durch CI-1033 in dieser Arbeit zeigte sich in der Zebrafisch-Modell Studie eine Degeneration der Haarzellen betont in den äußeren Haarzellen durch Pan-ErbB-Inhibition. (Tang et al., 2015). Aus diesen konkordanten Ergebnissen bezüglich der dosisabhängigen Ototoxizität ergibt sich der Impuls für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Wirkung und Interaktion von ErbB-Rezeptoren, insbesondere im Hinblick auf eine Interaktion zwischen Neuronen, Haarzellen und Gliazellen mit möglicher konsekutiver Haarzelldegeneration. Diese Untersuchungen sollten *in vivo* erfolgen, denn eine Beurteilung der Haarzellen bzw. der otoakustischen Emissionen ist mithilfe des Spiralganglienzellkultur-Modells nicht möglich.

4.2 Material und Methoden

Das Spiralganglienzell-Organkulturmodell, welches in dieser Arbeit als Grundlage diente, ist eine häufig verwendete und etablierte Methode in der Innenohrforschung. Es handelt sich hierbei um ein *in vitro* Verfahren zur Kultivierung von Neuriten. Als *in vitro* Methode sind die Neuriten entsprechend aus der Gesamtheit der Cochlea herausgelöst worden, so dass eine Gleichsetzung der Ergebnisse *in vivo* nicht vollständig realisierbar ist. Weiterhin werden für dieses Modell ausschließlich unreife Cochleae von neugeborenen Mäusen verwendet, so dass degenerative Prozesse des Innenohrs nicht mitbetrachtet werden können.

Da es unter anderem eine große Übereinstimmung in den Genomen des Menschen und der Maus gibt, ist das Maus-Modell ein etabliertes Verfahren für die Grundlagenforschung. Dennoch ist zu bedenken, dass es sich um unterschiedliche Spezies handelt. Hieraus ergibt sich eine theoretische Übertragbarkeit der erhobenen Ergebnisse im Maus-Modell auf die Humanforschung. Die Ergebnisse dieser Arbeit können gewiss noch keine klinische Anwendung finden, bilden jedoch möglicherweise die Grundlage dafür. Zur besseren Objektivierung der Ergebnisse des *in vitro* Modells an neugeborenen Mäusen, erfolgten mithilfe dieser Arbeit darüber hinaus noch Untersuchungen an kryokonservierten Cochleae. Dies ermöglichte die Betrachtung der Gesamtheit der Cochleae in jeweils unterschiedlichen Altersstufen sowie im Hinblick auf die Expression von NRG1 und ErbB3. So war auf diese Weise auch eine Beurteilung der Haarzellen als Sinneszellen sowie der Stützzellen als gliazellartige Zellen möglich.

4.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Das Ziel ist es die Degeneration der Spiralganglienneurone zu verhindern und ihre Regeneration zu fördern. Spiralganglienneuronen protektive Wachstumsfaktoren sind zum Beispiel Neurotrophin-3 und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Ramekers et al., 2012). Mithilfe der vorliegenden Arbeit konnte auch NRG1 als ein Spiralganglienneuronen protektiver Wachstumsfaktor identifiziert werden. An einer *in vivo* Anwendung von NRG1 im Innenohr, die eine Regeneration der Neurone induziert und ihre Degeneration

stoppt, könnte weiterführend gearbeitet werden. Hierfür müsste ein geeigneter Applikationsweg gefunden werden. Die anatomisch bedingte schwere Zugänglichkeit des Innenohrs für Medikamente sowie die Überwindung der Blut-Labyrinth-Schranke mittels systemischer Applikation und das Erreichen einer entsprechend hohen Konzentration im Innenohr ohne relevante systemische Nebenwirkungen stellt unter anderem eine Schwierigkeit dar, so dass eine Lokalthherapie primär mittels intratympanaler Injektion von Medikamenten z.B. bei plötzlichem Hörsturz etabliert werden konnte (Slattery et al., 2005). Die Blut-Labyrinth-Schranke wurde überwunden, jedoch ließ sich auch mittels intratympanaler Injektion keine ausreichend hohe Medikamentenkonzentration erreichen. Nanopartikel stellen eventuell eine Möglichkeit der Medikamentenapplikation dar (Kim, 2017) und könnten letztlich auch eine Möglichkeit sein NRG1 als Wachstumsfaktor nicht-invasiv lokal anzuwenden. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Nanopartikel Substanzen binden und über das Mittelohr, nicht-invasiv ins Innenohr gelangen können (Li et al., 2017).

Ein weiterer denkbarer, experimenteller Ansatz für eine mögliche Applikation von NRG1 ins Innenohr wäre der Einsatz einer Micropumpe. Eine Micropumpe wurde in einer Arbeit an Meerschweinchen entwickelt (Tandon et al., 2015).

Cochlea-Implantate stellen einen weiteren Focus für eine lokale Medikamentenapplikation dar. So wurden die Elektroden mit Trägern versehen, welche Substanzen freisetzen konnten. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits der Effekt eines Zusatzes von Neurotrophin auf die Spiralganglienneurone untersucht. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Freisetzung von Neurotrophin-3 aus einer ummantelten Elektrode protektive Effekte auf die Neurone hatte und zu einer Wachstumsstimulation der Neuriten geführt hatte (Richardson et al., 2009) (Plontke et al., 2017). Eine Freisetzung von NRG1 aus ummantelten Elektroden wäre dementsprechend denkbar.

Ferner konnte mithilfe von dieser Arbeit gezeigt werden, dass der NRG1/ErbB-Signalweg nicht nur für Proliferationsinduktion verantwortlich ist, sondern dass seine Unterdrückung durch Pan-ErbB-Induktion auch zu Spiralganglienneuronenverlust führen kann. Wie bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte und mithilfe dieser Arbeit bestätigt wurde, sind Pan-ErbB-Inhibitoren dosisabhängig ototoxisch (Tang et al., 2015). Eine klinische

Anwendung zur Therapie von verschiedenen Tumorerkrankungen sollte daher nur mit Vorsicht erfolgen. In der Tumorthherapie besteht bereits eine große Erfahrung mit Nanopartikeln. Die Zelltoxizität spielt in diesem Rahmen nur eine untergeordnete Rolle. Da Nanopartikel im Innenohr ototoxisch sein können (Zhou et al., 2015) und im Innenohr akkumulieren können ist die Sicherheit dieser Applikationsform ein wichtiger Aspekt und noch nicht ausreichend untersucht. (Kim, 2017)

Um eine Dysfunktion des NRG1/ErbB-Signalweges im Rahmen von speziellen genetischen Erkrankungen und angeborener Neuropathie des Nervus cochlearis besser zu verstehen, wären ferner Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene denkbar zielführend sowie von klinischer Bedeutung.

Literaturverzeichnis

- AKIL, O., SUN, Y., VIJAYAKUMAR, S., ZHANG, W., KU, T., LEE, C. K., JONES, S., GRABOWSKI, G. A. & LUSTIG, L. R. 2015. Spiral ganglion degeneration and hearing loss as a consequence of satellite cell death in saposin B-deficient mice. *J Neurosci*, 35, 3263-75.
- ARKHIPOVA, S. S., RAGINOV, I. S., MUKHITOV, A. R. & CHELYSHEV, Y. A. 2010. Satellite cells of sensory neurons after various types of sciatic nerve trauma in the rat. *Neurosci Behav Physiol*, 40, 609-14.
- AUDISIO, C., MANTOVANI, C., RAIMONDO, S., GEUNA, S., PERROTEAU, I. & TERENCEHI, G. 2012. Neuregulin1 administration increases axonal elongation in dissociated primary sensory neuron cultures. *Exp Cell Res*, 318, 570-7.
- BERMINGHAM-MCDONOGH, O., XU, Y. T., MARCHIONNI, M. A. & SCHERER, S. S. 1997. Neuregulin expression in PNS neurons: isoforms and regulation by target interactions. *Mol Cell Neurosci*, 10, 184-95.
- BIRCHMEIER, C. & NAVE, K. A. 2008. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia*, 56, 1491-7.
- BUONANNO, A. & FISCHBACH, G. D. 2001. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 287-96.
- CHEN, S., RIO, C., JI, R. R., DIKKES, P., COGGESHALL, R. E., WOOLF, C. J. & CORFAS, G. 2003. Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. *Nat Neurosci*, 6, 1186-93.
- CHEN, S., VELARDEZ, M. O., WAROT, X., YU, Z. X., MILLER, S. J., CROS, D. & CORFAS, G. 2006. Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci*, 26, 3079-86.
- DJERF SEVERINSSON, E. A., TRINKS, C., GREEN, H., ABDIU, A., HALLBECK, A. L., STAL, O. & WALZ, T. M. 2011. The pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor canertinib promotes apoptosis of malignant melanoma in vitro and displays anti-tumor activity in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 414, 563-8.

- 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, 585-96.
- FALLS, D. L. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res*, 284, 14-30.
- FRAHER, J. P. 2000. The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat*, 196 (Pt 1), 137-58.
- FRAHER, J. P. & KAAR, G. F. 1984. The transitional node of Ranvier at the junction of the central and peripheral nervous systems: an ultrastructural study of its development and mature form. *J Anat*, 139 (Pt 2), 215-38.
- GEUNA, S., NICOLINO, S., RAIMONDO, S., GAMBAROTTA, G., BATTISTON, B., TOS, P. & PERROTEAU, I. 2007. Nerve regeneration along bioengineered scaffolds. *Microsurgery*, 27, 429-38.
- HANANI, M. 2010. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain Res Rev*, 64, 304-27.
- 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.
- HARRISON, P. J. & LAW, A. J. 2006. Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry*, 60, 132-40.
- HO, W. H., ARMANINI, M. P., NUIJENS, A., PHILLIPS, H. S. & OSHEROFF, P. L. 1995. Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem*, 270, 14523-32.
- HOLMES, W. E., SLIWKOWSKI, M. X., AKITA, R. W., HENZEL, W. J., LEE, J., PARK, J. W., YANSURA, D., ABADI, N., RAAB, H., LEWIS, G. D. & ET AL. 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*, 256, 1205-10.
- JESSEN, K. R. & MIRSKY, R. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, 6, 671-82.
- KIM, D. K. 2017. Nanomedicine for Inner Ear Diseases: A Review of Recent In Vivo Studies. *Biomed Res Int*, 2017, 3098230.

- KOMMAREDDI, P., NAIR, T., KAKARAPARTHI, B. N., GALANO, M. M., MILLER, D., LACZKOVICH, I., THOMAS, T., LU, L., RULE, K., KABARA, L., KANICKI, A., HUGHES, E. D., JONES, J. M., HOENERHOFF, M., FISHER, S. G., ALTSCHULER, R. A., DOLAN, D., KOHRMAN, D. C., SAUNDERS, T. L. & CAREY, T. E. 2015. Hair Cell Loss, Spiral Ganglion Degeneration, and Progressive Sensorineural Hearing Loss in Mice with Targeted Deletion of Slc44a2/Ctl2. *J Assoc Res Otolaryngol*, 16, 695-712.
- KURAMOCHI, Y., COTE, G. M., GUO, X., LEBRASSEUR, N. K., CUI, L., LIAO, R. & SAWYER, D. B. 2004. Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem*, 279, 51141-7.
- LI, L., CHAO, T., BRANT, J., O'MALLEY, B., JR., TSOURKAS, A. & LI, D. 2017. Advances in nano-based inner ear delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Adv Drug Deliv Rev*, 108, 2-12.
- LIN, H. W., FURMAN, A. C., KUJAWA, S. G. & LIBERMAN, M. C. 2011. Primary neural degeneration in the Guinea pig cochlea after reversible noise-induced threshold shift. *J Assoc Res Otolaryngol*, 12, 605-16.
- LOCHER, H., DE GROOT, J. C., VAN IPEREN, L., HUISMAN, M. A., FRIJNS, J. H. & CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. 2014. Distribution and development of peripheral glial cells in the human fetal cochlea. *PLoS One*, 9, e88066.
- 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, 4673-83.
- MAJEM, M. & PALLARES, C. 2013. An update on molecularly targeted therapies in second- and third-line treatment in non-small cell lung cancer: focus on EGFR inhibitors and anti-angiogenic agents. *Clin Transl Oncol*, 15, 343-57.
- MARCHIONNI, M. A., GOODEARL, A. D., CHEN, M. S., BERMINGHAM-MCDONOGH, O., KIRK, C., HENDRICKS, M., DANEHY, F., MISUMI, D., SUDHALTER, J., KOBAYASHI, K. & ET AL. 1993. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature*, 362, 312-8.

- MEIER, C., PARMANTIER, E., BRENNAN, A., MIRSKY, R. & JESSEN, K. R. 1999. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci*, 19, 3847-59.
- MONZACK, E. L. & CUNNINGHAM, L. L. 2013. Lead roles for supporting actors: critical functions of inner ear supporting cells. *Hear Res*, 303, 20-9.
- MORRISSEY, T. K., LEVI, A. D., NUIJENS, A., SLIWKOWSKI, M. X. & BUNGE, R. P. 1995. Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1431-5.
- NAVE, K. A. & SALZER, J. L. 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol*, 16, 492-500.
- NICOLINO, S., RAIMONDO, S., TOS, P., BATTISTON, B., FORNARO, M., GEUNA, S. & PERROTEAU, I. 2003. Expression of alpha2a-2b neuregulin-1 is associated with early peripheral nerve repair along muscle-enriched tubes. *Neuroreport*, 14, 1541-5.
- PACK, A. K. & SLEPECKY, N. B. 1995. Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of Corti: cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients. *Hear Res*, 91, 119-35.
- PELES, E., BACUS, S. S., KOSKI, R. A., LU, H. S., WEN, D., OGDEN, S. G., LEVY, R. B. & YARDEN, Y. 1992. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell*, 69, 205-16.
- 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, 2803-15.
- PLONTKE, S. K., GOTZE, G., RAHNE, T. & LIEBAU, A. 2017. Intracochlear drug delivery in combination with cochlear implants : Current aspects. *Hno*, 65, 19-28.
- RAMEKERS, D., VERSNEL, H., GROLMAN, W. & KLIS, S. F. 2012. Neurotrophins and their role in the cochlea. *Hear Res*, 288, 19-33.

- 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, 2614-24.
- ROMANO, N. H., MADL, C. M. & HEILSHORN, S. C. 2015. Matrix RGD ligand density and L1CAM-mediated Schwann cell interactions synergistically enhance neurite outgrowth. *Acta Biomater*, 11, 48-57.
- ROSENBLUTH, J. 1962. The fine structure of acoustic ganglia in the rat. *J Cell Biol*, 12, 329-59.
- SLATTERY, W. H., FISHER, L. M., IQBAL, Z., FRIEDMAN, R. A. & LIU, N. 2005. Intratympanic steroid injection for treatment of idiopathic sudden hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 133, 251-9.
- SLICHENMYER, W. J., ELLIOTT, W. L. & FRY, D. W. 2001. CI-1033, a pan-erbB tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol*, 28, 80-5.
- SPOENDLIN, H. 1972. Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol*, 73, 235-48.
- 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, 8651-61.
- STEINTHORSDDOTTIR, V., STEFANSSON, H., GHOSH, S., BIRGISDOTTIR, B., BJORNSDOTTIR, S., FASQUEL, A. C., OLAFSSON, O., STEFANSSON, K. & GULCHER, J. R. 2004. Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene*, 342, 97-105.
- TAN, J., CLARKE, M., BARRETT, G. & MILLARD, R. 2010. The p75 neurotrophin receptor protects primary auditory neurons against acoustic trauma in mice. *Hear Res*, 268, 46-59.
- TANDON, V., KANG, W. S., SPENCER, A. J., KIM, E. S., PARARAS, E. E., MCKENNA, M. J., KUJAWA, S. G., MESCHER, M. J., FIERING, J., SEWELL, W. F. & BORENSTEIN, J. T. 2015. Microfabricated infuse-withdraw micropump component for an integrated inner-ear drug-delivery platform. *Biomed Microdevices*, 17, 37.

- TANG, J., QIAN, Y., LI, H., KOPECKY, B. J., DING, D., OU, H. C., DECOOK, R., CHEN, X., SUN, Z., KOBEL, M. & BAO, J. 2015. Canertinib induces ototoxicity in three preclinical models. *Hear Res*, 328, 59-66.
- TOESCA, A. 1996. Central and peripheral myelin in the rat cochlear and vestibular nerves. *Neurosci Lett*, 221, 21-4.
- TOMITA, K., KUBO, T., MATSUDA, K., FUJIWARA, T., YANO, K., WINOGRAD, J. M., TOHYAMA, M. & HOSOKAWA, K. 2007. The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia*, 55, 1199-208.
- VERSNEL, H., AGTERBERG, M. J., DE GROOT, J. C., SMOORENBURG, G. F. & KLIS, S. F. 2007. Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res*, 231, 1-12.
- VON GABLENZ, P., HOFFMANN, E. & HOLUBE, I. 2017. Prävalenz von Schwerhörigkeit in Nord- und Süddeutschland. *HNO*, 65, 663.
- WANG, J., ZHANG, B., JIANG, H., ZHANG, L., LIU, D., XIAO, X., MA, H., LUO, X., BOJRAB II, D. & HU, Z. 2013. Myelination of the Postnatal Mouse Cochlear Nerve at the Peripheral-Central Nervous System Transitional Zone. *Frontiers in Pediatrics*, 1.
- WANG, J. Y., MILLER, S. J. & FALLS, D. L. 2001. The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem*, 276, 2841-51.
- WATANABE, F., KIRKEGAARD, M., MATSUMOTO, S., GONT, C., MANNSTROM, P., ULFENDAHL, M. & FRIDBERGER, A. 2010. Signaling through erbB receptors is a critical functional regulator in the mature cochlea. *Eur J Neurosci*, 32, 717-24.
- WEI, D., JIN, Z., JARLEBARK, L., SCARFONE, E. & ULFENDAHL, M. 2007. Survival, synaptogenesis, and regeneration of adult mouse spiral ganglion neurons in vitro. *Dev Neurobiol*, 67, 108-22.
- ZHANG, M., DING, D. & SALVI, R. 2002. Expression of heregulin and ErbB/Her receptors in adult chinchilla cochlear and vestibular sensory epithelium. *Hear Res*, 169, 56-68.

- ZHOU, H., MA, X., LIU, Y., DONG, L., LUO, Y., ZHU, G., QIAN, X., CHEN, J., LU, L., WANG, J. & GAO, X. 2015. Linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles are ototoxic to the cultured sensory epithelium of neonatal mice. *Mol Med Rep*, 11, 4381-8.
- ZHOU, X. F., RUSH, R. A. & MCLACHLAN, E. M. 1996. Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection. *J Neurosci*, 16, 2901-11.

Mein Dank gilt meinen Betreuern, Herrn PD Dr. Stefan Hansen und Herrn Prof. Schipper, für die Unterstützung während dieser Dissertation.

Ferner danke ich meiner Familie und meinem Freund, die mich stets tatkräftig unterstützt haben.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des HNO-Forschungslabors für ihre vielfältige Hilfe.