

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

Expression und Funktion des Nogo-Rezeptors in der Cochlea der Maus

Dissertation

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

vorgelegt von

Katharina Lisa Schulz

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. med. Jan Frederick Cornelius

Zusammenfassung

Das regenerative Neuritenwachstum des peripheren Nervensystems (PNS) nach einer axonalen Schädigung wird maßgeblich durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch die nicht-myelinisierenden Schwannzellen gesteuert. Ein Mechanismus, welcher sich im zentralen Nervensystem (ZNS) bisher nicht wiederfinden lässt. Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass ein Wachstumsinhibitor mit der Bezeichnung Nogo-A und sein entsprechender Rezeptor einen wichtigen Bestandteil dieser ausbleibenden Regeneration darstellen. Nogo-A beinhaltet unter anderem ein 66-Aminosäuren-Segment, welches mit dem Nogo-Rezeptor (NgR) interagiert und diesen inhibiert (Nogo-66). Außer mit Nogo selbst agiert der Rezeptor unter anderem mit dem Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) und dem oligodendrozytären myelinen Glycoprotein (OMgp). Die Aktivierung des Rezeptors durch diese Liganden bewirkt die Inhibition des Neuritenwachstums. Konsekutiv hat die Blockade des Rezeptors ein verstärktes Neuritenwachstum zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression des Nogo-Rezeptors sowie seiner Liganden im Innenohr der Maus untersucht werden und außerdem deren Interaktion in organotypischen Spiralganglienneuronenkulturen (SGN) evaluiert werden. Die Expression des NgR wurde zunächst in Cryoschnitten der Mäusecochlea während der Hörentwicklung im postnatalen Alter von 2 bis 22 Tagen sowie von 4 Monaten nachgewiesen. Weiterhin wurden SGN-Kulturen aus der Cochlea von 4-8 Tage alten Mäusen angefertigt, welche zum einen mit MAG als Aktivator und zum anderen mit Nogo-66(1-40) als Inhibitor des NgR kultiviert wurden. Anschließend wurde das Neuritenlängenwachstum und das Schwannzellwachstum bestimmt.

Die Expression des NgR zeigte sich in jeder untersuchten Altersstufe der Mäuse im Innenohr, hier primär im Spiralganglion in den darin befindlichen Neuronen. Außerhalb des Spiralganglions zeigte sich eine deutliche Expression des NgR in den inneren Stützzellen des Cortiorgans. MAG zeigte sich vor allem in den Neuronen des Spiralganglions, den Axonen und den Böttcherzellen. In der SGN-Kultur konnte unter Blockade des NgR durch Nogo-66(1-40) ein signifikant verstärktes Längenwachstum der Neuriten im Vergleich zur Kontrollreihe und außerdem eine erhöhte Anzahl an Schwannzellen festgestellt werden. Die Rezeptoraktivierung durch MAG zeigte hingegen eine signifikante Längenreduktion der Neuriten in Verbindung mit einer verminderten Anzahl von Schwannzellen.

Die Untersuchungen brachten eine mit dem Mechanismus des NgR im ZNS vergleichbare Funktionsweise hervor, welche einer Neuritenregeneration nach einer Schädigung entgegensteht. Dies ist insofern beachtenswert, als dass die Spiralganglionneurone als erstes Neuron der Hörbahn in der Cochlea Teil des PNS sind, der größte Anteil des Hörnervs jedoch Teil des ZNS ist.

Die Funktion des NgR und seiner Liganden im Innenohr könnte folglich eine wichtige Rolle bei der Regeneration nach einer Ertaubung spielen und stellt somit einen potenziell neuen, kausalen Therapieansatz der Nervenrehabilitation für die Zukunft dar. Da die Studien bezüglich des NgR im Bereich des Rückenmarks schon deutlich fortgeschrittener sind, bleibt zu klären, in wie weit diese Ergebnisse auf das Innenohr übertragen werden können.

Abstract

The neuronal regeneration in the peripheral nervous system (PNS) after axonal injuries depends mostly on the non-myelinating Schwann cells with their dumping of growth factors. The central nervous system (CNS) doesn't have the potential to operate like that. The last decades showed that an inhibitory growth factor, named Nogo-A and its receptor are important parts of the absence regeneration. Nogo-A consists of a 66-amino acid segment which inhibits and interacts with the receptor (NgR). Beside Nogo-66 there are two more ligands of the NgR, namely myelin associated glycoprotein (MAG) and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp). By activating the NgR the complex induces a growth cone collapse. Consequently, the blockage of the receptor or its interacting partners supports neurite outgrowth and enhances regeneration after CNS injuries.

In our study, we demonstrate the expression of NgR and its ligands in cryosections of the mouse cochlea from P2 to P22 and 4 months old mice. Furthermore, we showed the interaction of Nogo-A and the receptor in cultured spiral ganglion neurons (SGN). Additionally, we cultured spiral ganglion neurons of newborn mice (P4-8) and analyzed the growth behavior by activation (via MAG) and blockage of the NgR (via Nogo-66(1-40)). We elaborated the neurite outgrowth and the behavior of the Schwann cells. The expression of the NgR was present during hearing development mainly in the spiral ganglion neuron soma. Especially the inner pillar cells in the organ of corti showed a strong expression of the receptor. Similarly, MAG was present in the neuron soma, the axons and the cells of Boettcher. After blocking of the NgR (via Nogo-66(1-40)) the SGN showed a significant increased neurite outgrowth and an increased number of Schwann cells compared to the references. In contrast, after the activation (via MAG) the SGN reduced the length of the neurites notably and decreased the number of Schwann cells.

The study showed, that the mechanism of the Nogo-System in the CNS is comparable to the mode of operation in the PNS and is opposed to the neurite regeneration after injuries. This is notable because the spiral ganglion neuron somas are the first neurons in the auditory pathway of the cochlea and belong to the PNS. In contrast to the bigger part of the auditory nerve which belongs to the CNS.

The behavior of NgR and its interaction partners in the inner ear could play a major role in the field of regeneration and outspreading neurites after the loss of hearing. For example, in the range of sensorineural hearing loss and furthermore proclaiming as a new possible causal therapy. Because of the advanced studies relating to the function and the expression of the NgR in the spinal cord, it is necessary to clarify whether these results can be transferred to the inner ear.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abb. – Abbildung

Abk. – Abkürzung

AK – Antikörper

ANOVA – Varianzanalyse

AS – Aminosäure

BSA – Bovines Serum Albumin

bzw. – beziehungsweise

°C – Grad Celsius

ca. – circa

C-Terminus – Carboxy-Terminus

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

GIP – Glycosylphosphatidylinositol

GTPase – kleine Guanosintriphosphatase

HCl – Salzsäure

IN-1 – *Neurite growth inhibitor 1*, Neuriten Wachstumsinhibitor 1

kDa – Kilodalton

LINGO-1 – *Leucin-rich-repeat and Ig domain-containing, Nogo receptor interacting protein*, Leucin reiches und eine Ig Domäne enthaltendes Protein, welches mit dem Nogo-Rezeptor interagiert

MAG – Myelin-assoziiertes Glycoprotein

ml – Milliliter

µl – Mikroliter

mm – Millimeter

µm – Mikrometer

MOG – Myelin oligodendrozytäres Glycoprotein

mRNA – *messenger ribonucleic acid*, Boten-Ribonukleinsäure

NEP1-40 – *Nogo extracellular peptide, residues 1-40*, Nogo extrazelluläres Peptid, Rückstände 1-40

NgBR – Nogo-B-Rezeptor

NgR – Nogo-66-Rezeptor

- NI-250** – *neurite growth inhibitor 250*, Neuritenwachstumsinhibitor 250
- Nogo-R-AK** – Nogo-Rezeptor-Antikörper
- Nr.** – Nummer
- N-Terminus** – Amino-Terminus
- OMgp** – Oligodendrozytäres myelines Glycoprotein
- P0** – Protein null
- P75NTR** – Neurotrophin Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor Familie
- PBS** – *Phosphate Buffered Salin*, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
- PFA** – Paraformaldehyd
- PNS** – Peripheres Nervensystem
- RTN** – Reticulon
- Rho-A** – Ras homologue A
- ROCK** – Roh-Kinase
- RT-PCR** – *Reverse-Transcriptase-Polymerase Cain Reaction*, Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
- SD** – Standardabweichung
- SGN** – Spiralganglienneurone
- SGN-Kultur** – Spiralganglienneuronenkultur
- TNF** – Tumor Nekrose Faktor
- TNFRSF19** – *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 (TROY)*, Mitglied Nummer 19 der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie
- vgl.** – vergleiche
- ZNS** – Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Aufbau des Nervensystems.....	1
1.2	Das Innenohr.....	4
1.2.1	Struktur und Aufbau des Innenohres.....	4
1.2.2	Der Nervus vestibulocochlearis	7
1.2.3	Wachstum und Degeneration von Spiralganglienneuriten	8
1.2.4	Sensorineurale Schwerhörigkeit und ihre Behandlung.....	8
1.3	Der Nogo-Rezeptor und seine Liganden	9
1.3.1	Der molekulare Aufbau der Nogo-Familie	9
1.3.1.1	Nogo-A, -B, -C.....	9
1.3.1.2	Der Nogo-66-Rezeptor.....	10
1.3.1.3	Der Signaltransduktionsweg des Nogo-Rezeptorkomplexes	11
1.3.2	Funktion und Expression von Nogo im Zentralnervensystem.....	12
1.3.3	Inhibitoren des Rezeptorkomplexes und Antikörper gegen Nogo-A ...	13
1.3.4	Funktion und Expression von Nogo im Innenohr	15
1.4	Ziele der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Materialien und Geräte	17
2.1.1	Chemikalien.....	17
2.1.2	Lösungen	17
2.1.3	Antikörper.....	18
2.1.4	Faktoren.....	18
2.1.5	Geräte.....	18
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	19
2.2	Ethikvotum und Tierversuchsgenehmigung	19
2.3	Methoden.....	20
2.3.1	Präparation der Cochlea.....	20
2.3.2	Immunhistochemische Markierung und Färbung des Nogo-Rezeptors in Cryoschnitten	21
2.3.3	Die organotypische Kultur der Spiralganglienneurone	22
2.3.4	Immunfluoreszenzmarkierung von Schwannzellen und Spiralganglienneuronen.....	23
2.4	Bestimmung der Neuritenlänge und statistische Auswertung.....	24
2.5	Wachstumsverhalten der Schwannzellen.....	26

2.5.1	Anzahl der Schwannzellen	26
2.5.2	Migrationsweite der Schwannzellen	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Expression des Nogo-Rezeptors in der Cochlea der Maus	28
3.2	Charakterisierung der organotypischen Kultur der Spiralganglienneurone	34
3.2.1	Länge und Anzahl der ausgewachsenen Neuriten	34
3.2.2	Verhältnis der Schwannzellen zu den Zellkernen	41
3.2.3	Migrationsweite der Schwannzellen	46
3.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
4	Diskussion	51
4.1	Expression des Nogo-Rezeptors im Innenohr	51
4.1.1	Die organotypische Spiralganglienneuronenkultur	53
4.1.1.1	Wachstumsverhalten der Nervenfasern.....	53
4.1.1.2	Wachstumsverhalten der Schwannzellen.....	58
4.2	Klinische Relevanz und Perspektiven	60
4.3	Schlussfolgerung.....	63
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	65
6	Anhang.....	71
7	Danksagung.....	73

1 Einleitung

1.1 Der Aufbau des Nervensystems

Das Nervensystem der Wirbeltiere wird in ein zentrales (ZNS) und ein peripheres Nervensystem (PNS) unterteilt. Das ZNS umfasst hierbei das Gehirn und das Rückenmark; das PNS diejenigen Nerven, die zum einen die Informationen aus der Peripherie an das Gehirn weiterleiten und zum anderen Informationen aus dem zentralen System empfangen, sogenannte afferente und efferente Systeme. Das ZNS des Menschen umfasst schätzungsweise 100 Milliarden Neurone, die miteinander interagieren und über sich ändernde, elektrische Potentiale und synaptische Übertragung miteinander kommunizieren. Um diese Funktionalität der Nervenzellen zu gewährleisten ist eine bestimmte Umgebung erforderlich, die durch sogenannte Gliazellen bereitgestellt wird. Es handelt sich um spezialisierte Zellen im Nervensystem, die für die Neuronen einerseits eine Stützfunktion und eine elektrische Isolation übernehmen, andererseits aber auch attraktive und repulsive Faktoren in Bezug auf das Nervenwachstum sezernieren. Diese Art der Zellen übersteigt die Zahl der Neuronen mindestens um das Zehnfache [1]. Jeder Zellkörper eines Neurons besitzt zum einen ein Axon (efferente Faser), welches Synapsen zu anderen Nervenzellen ausbilden kann und zum anderen Dendriten (afferente Fasern), die axodendritische Synapsen mit den Neuriten anderer Zellen bilden. Ein solches Axon kann bis zu einer Länge von einem Meter auswachsen und ist auf dieser Strecke zumeist von einer Myelinschicht, oder auch Markscheide genannt, umgeben. Diese dient zum Schutz des Neuriten und zur Erhöhung der Nervenleitungsgeschwindigkeit zum einen durch die Isolierung und zum anderen durch die saltatorische Erregungsüberleitung, da hier die Erregung im Gegensatz zur kontinuierlichen Fortleitung direkt von einem auf den nächsten Ranvier-Schnürring überspringen kann (Abbildung 1). Die Myelinschicht wird im ZNS von den Oligodendrozyten produziert, bei denen sich der Zellkörper unmittelbar neben den myelinisierten Axonen befindet und im PNS von den Schwannzellen, die jeweils nur einen Neuriten myelinisieren, wobei sich hier der Zellkern direkt am Axon in der umwickelnden Myelinscheide befindet (Abbildung 1).

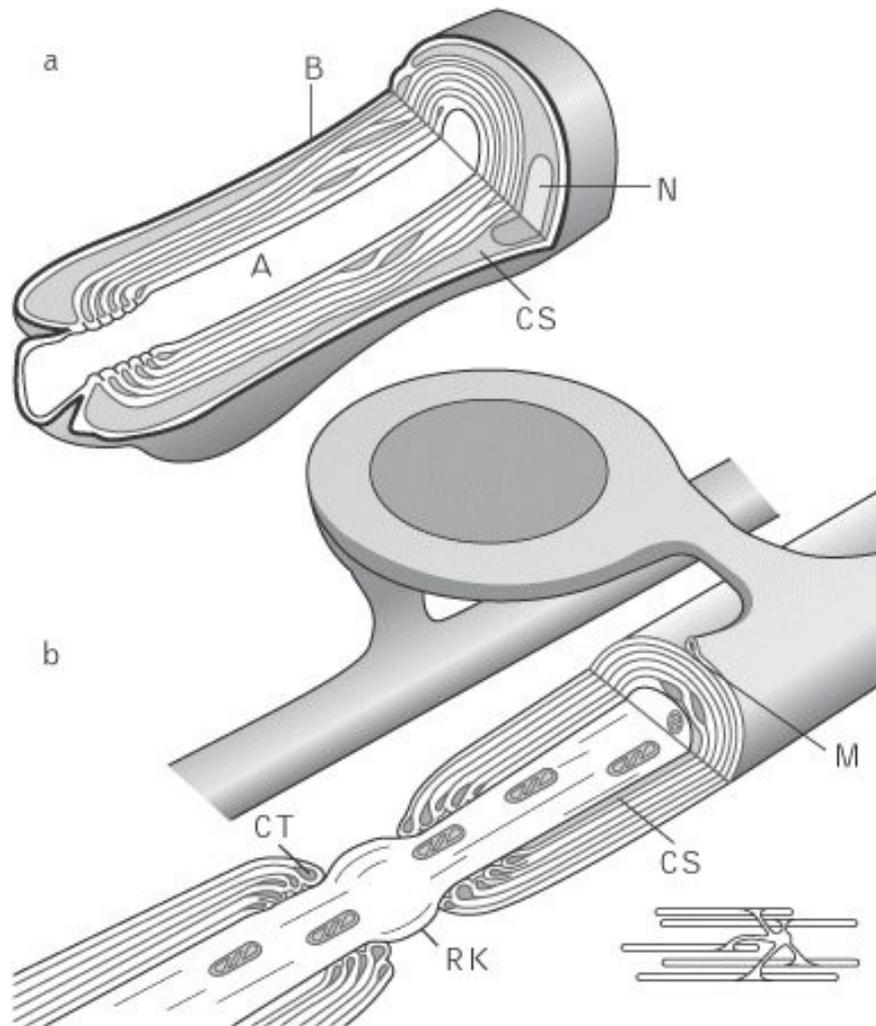


Abbildung 1: a) Myelinisierung eines peripheren Axons durch die Schwannzellen, b) und eines zentralen Axons durch die Oligodendrozyten. A Axon, B Basalmembran, CS Cytoplasma Schwannzelle, CT Cytoplasma gefüllte Taschen, M Lamellen der Markscheide, N Nucleus der Schwannzelle, O Oligodendrozyt, RK Ranvier-Knoten [2].

Die Nerven in der Peripherie besitzen die Fähigkeit, sich nach Axotomie mit einer Geschwindigkeit von etwa einem Millimeter pro Tag regenerieren zu können [1]. Hierbei spielen verschiedene degenerative und regenerative Mechanismen sowohl im proximalen als auch im distalen Nervenstumpf eine Rolle. Der distale Nervenstumpf folgt dem Prinzip der „Waller-Degeneration“, benannt nach dem Erstbeschreiber Augustus Waller 1850 [3]: Zunächst beginnt die Zersetzung des Axolemmes und des Axoplasmas unter anderem durch Einflüsse von Proteasen und des Kalziumeinstroms. Infolge dessen ändern die Schwannzellen ihre Aufgabe der Myelinisierung und fördern die Migration von Makrophagen und Phagozyten. Sie bauen zusammen mit Makrophagen die restliche Markscheide ab und fördern anschließend die Regeneration durch den Aufbau eines wachstumsfördernden Milieus, unter anderem mit der Herunterregulation der hemmenden Myelinproteine

[4]. Letztendlich bilden sich durch mehrere Vorgänge neue Schwannzellen, welche sich an die noch bestehende Basallamina legen und so eine Hülle für das proximal aussprossende Axon bilden. Sie fördern somit die Regeneration der Nerven und den erneuten Anschluss an die Schwannzellen [5]. Dies bedeutet, solange der Zellkörper der unterbrochenen Axone noch unbeschädigt ist, ist es hier für das Nervengewebe möglich, sich zu regenerieren und seine Funktion wiederaufzunehmen. Diese für die Neuronen und Gliazellen der Peripherie physiologischen Fähigkeiten besitzen weder die Neurone mit ihren Oligodendrozyten im ZNS noch die Neurone der peripheren Nervenfasern des Nervus vestibulocochlearis mit ihren Schwannzellen. Zu diesen Wachstumsinhibitoren im ZNS gehören beispielsweise die Myelinproteine Nogo-A, OMgp (engl.: *Oligodendrocyte myelin glycoprotein*, Oligodendrozytäres Myelin Glycoprotein) und MAG (engl.: *myelin associated glycoprotein*, myelinassoziiertes Glycoprotein). Nogo-A und OMgp sind hierbei ZNS spezifisch, also nicht in den Schwannzellen der peripheren Myelinscheide zu finden sondern in den Oligodendrozyten. Im Gegensatz dazu wird MAG, das nicht nur ein Ligand des Nogo-Rezeptors (NgR) im ZNS ist, auch von den Myelin produzierenden Zellen des PNS exprimiert (Kapitel 1.3.2 Funktion und Expression von Nogo im Zentralnervensystem) [6]. Diese Regulation durch MAG aus den Schwannzellen des PNS hat sich beispielsweise an genetisch veränderten Mäusen mit einer Deletion des MAG-Gens gezeigt (MAG^{-/-}-Mäuse). Nach einer Läsion im PNS haben sich die Nervenfasern des Nervus saphenus der *knockout* Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen um ca. die doppelte Länge regeneriert [7].

Im Gegensatz hierzu ist diese Möglichkeit den Neuronen im ZNS nicht gegeben, beziehungsweise in physiologischem Maße unterdrückt. Hierfür ist maßgeblich der Unterschied in der Morphologie und der molekularen Zusammensetzung der Gliazellen verantwortlich. Dieser Unterschied resultiert primär daraus, dass die Zellen einen unterschiedlichen embryonalen Ursprung haben. Die Schwannzellen stammen ursprünglich aus der Neuralleiste, die Oligodendrozyten aus dem Neuralrohr [8]. Das adulte, zentrale Myelin exprimiert verschiedene Faktoren, die unter anderem dazu beitragen, die Regeneration und ein erneutes Wachstum der Nervenfasern zu verhindern. Die Gliazellen behalten und fixieren den im Erwachsenenalter erreichten Funktionszustand, während sie in der frühen Entwicklung noch dafür zuständig sind, das Auswandern und Auswachsen der Nervenzellen zu unterstützen. Da diese Verbindungen im ZNS derart komplex sind, verhindert die

Unterdrückung des Nervenwachstums durch die Ausschüttung von Wachstumshemmern im ZNS das Erstellen falscher Verknüpfungen, ein überschüssiges Wachstum sowie daraus resultierende Fehlfunktionen im Organismus. Jedoch wird auch die Nervenregeneration nach Verletzungen der zentralen Nervenbahnen unterbunden. Zu diesen erwähnten Wachstumshemmern gehört der von den zentralen Oligodendrozyten ausgeschüttete Inhibitor Nogo, der zusammen mit verschiedenen anderen Liganden an seinen, meist in der neuronalen Membran verankerten Rezeptor bindet und so seine wachstumshemmende Wirkung entfalten kann [9].

1.2 Das Innenohr

1.2.1 Struktur und Aufbau des Innenohres

Das Innenohr der Wirbeltiere liegt im Inneren des Felsenbeins und umfasst das Gleichgewichtsorgan mit Sacculus, Utriculus und den Bogengängen und das Hörorgan. Die Hörschnecke, die Cochlea, wird in ein knöchernes (Labyrinthus osseus) und ein häutiges Labyrinth (Labyrinthus membranaceus) eingeteilt. Sie formt eine Basis und eine Spitze, die nach anterolateral zeigt und in ihrem axialen Durchmesser ca. fünf Millimeter misst [10]. Das Labyrinth formt im Inneren der Cochlea einen spiralförmigen Gang, der sich beim Menschen 2,5 mal um seine innere Achse, den knöchernen Modiolus, windet und in seiner vollen Länge 31 bis 33 Millimeter beträgt. Der Gang des häutigen Labyrinthes, auch Ductus cochlearis genannt, enthält das Cortiorgan mit seinen Sinnesepithelzellen und ist von Endolymphe ausgefüllt. Er endet blind an der Spitze der Schnecke. Der basale Anteil des Ganges schließt mit dem runden Fenster ab. Hier besteht die Verbindung zum Vestibularorgan worüber der Gehörgang mit Sacculus und Utriculus kommunizieren kann. Nach kranial wird der Ductus von der Reissnermembran von der sogenannten Scala vestibuli getrennt, einem Teil des häutigen Labyrinthes. Nach lateral findet sich die Stria vascularis mit ihren enthaltenen Blutgefäßen an der knöchernen Wand, welche die kaliumreiche Endolymphe bildet. Das Cortiorgan sitzt am kaudalen Rand des membranösen Schneckenganges auf der Basilarmembran und wird so von der Scala tympani abgegrenzt (Abbildung 2). Die beiden knöchernen Schneckengänge vereinen sich an der Spitze der Cochlea, dem Helicotrema (Schneckenloch) und gehen ineinander über. Sie sind zudem mit Perilymphe gefüllt, entsprechend einem Ultrafiltrat des Blutes [10].

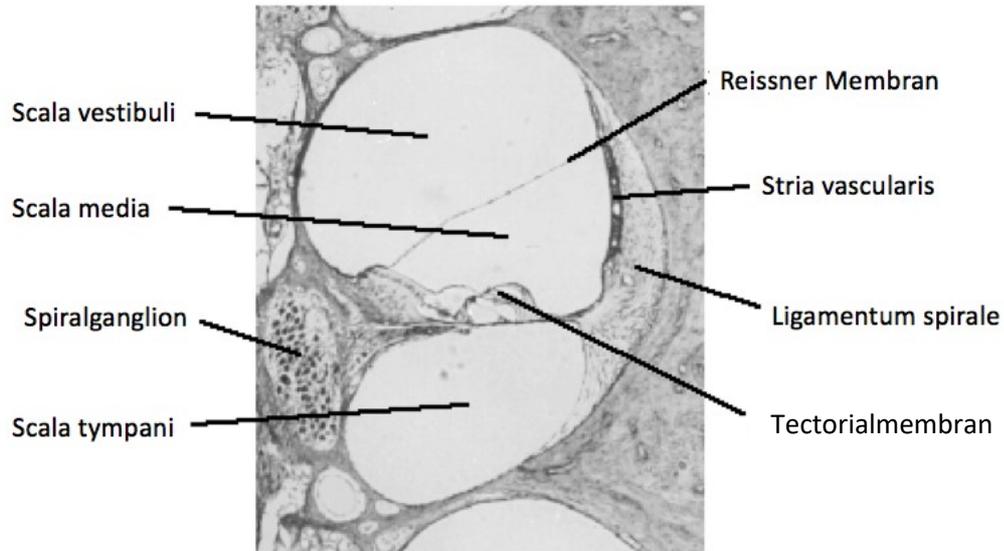


Abbildung 2: Darstellung der Cochlea im Längsschnitt. Unterteilung einer Windung in Scala vestibuli, Scala tympani und Ductus cochlearis mit enthaltenem Cortiorgan; modifiziert nach: [11].

Von dem knöchernen Modiolus aus, der zum einen den Nervus cochlearis und zum anderen das Ganglion spirale mit den Zellkörpern der afferenten Neurone enthält, ziehen die Nervenfasern durch einen knöchernen Gang zu den inneren und äußeren Haarzellen, den Rezeptoren des Cortiorgans. In ihrem basalen Anteil bilden sie Synapsen mit den Neuronen aus. Die efferenten Nervenfasern aus dem ZNS innervieren die Cochlea und enden zumeist an den äußeren Haarzellen. Die afferenten Fasern leiten die elektrischen Impulse über die innere Haarzelle an das ZNS weiter. Der Mensch besitzt ca. 12.000 äußere Haarzellen, die Anzahl der inneren Haarzellen beschränkt sich auf nur ungefähr 3.500 [10]. Diese liegen, zusammen mit den Hensenzellen und den Deiterszellen unterhalb der Tectorialmembran, einer gallertartigen zellfreien Membran, welche von dem Limbus ausgehend über das Cortiorgan zieht, bis in das Randfadennetz hinter den Hensenzellen [10]. Die inneren und äußeren Haarzellen bilden zusammen einen Tunnel, den Cortitunnel, durch den die afferenten Hörnervenfasern zu den äußeren Haarzellen ziehen. Als Stütze für diese dienen die Deiterszellen und Hensenzellen sowie die inneren und äußeren Pfeilerzellen als Begrenzung des Cortitunnels (Abbildung 3).

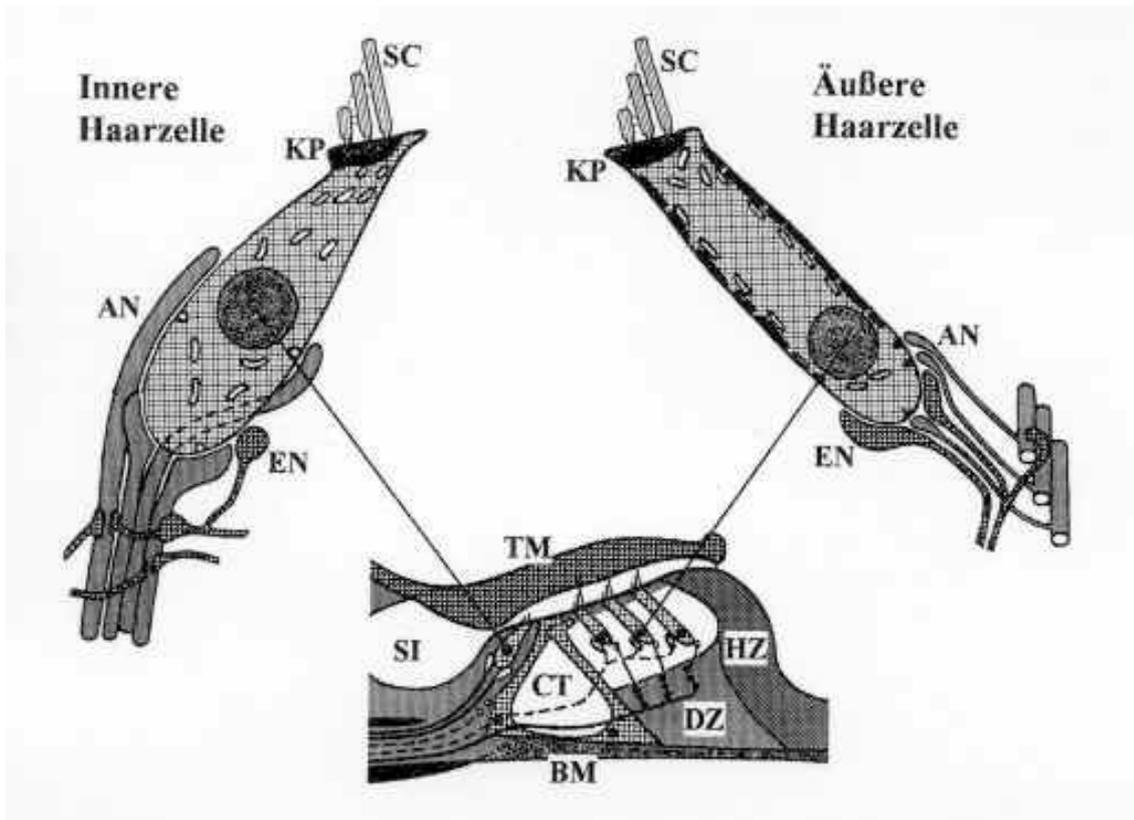


Abbildung 3: Schematische Abbildung eines Cortiorgans sowie einer inneren und äußeren Haarzelle. BM Basilarmembran, TM Tektorialmembran, CT Corti'scher Tunnel, DZ Deiterszellen, HZ Hensenzellen, SI Sulcus internus, SC Stereozilien, KP Kutikularplatte, AN afferente Nervenfasern, EN efferente Nervenfasern [12].

Die inneren Haarzellen sind in einer Reihe angeordnet, die äußeren Haarzellen in drei Reihen hintereinander. Beide weisen an ihrer Spitze senkrecht stehende W-konfigurierte Stereozilien auf, die durch *tip-links* verbunden sind. Jede äußere Haarzelle trägt zwischen 46 und 148 Stereozilien auf ihrer Oberfläche [10]. Der Transduktionsvorgang wird durch einen Schallreiz, vom Mittelohr kommend initiiert, welcher die Basilarmembran durch die sogenannte Wanderwelle in Schwingung versetzt. Je nach Dicke und Steife der Membran (vom Stapes bis zum Helicotrema abnehmend im Verhältnis 100:1) haben die entstehenden Schallwellen mit ihren Frequenzen an unterschiedlichen Punkten in ihrem Verlauf die höchste Amplitude. Hohe Frequenzen bilden ihr Maximum in Basisnähe aus, niedrige Frequenzen in der Nähe des Helicotremas an der Spitze (Tonotopie). Auf diese Weise können sich verschiedene Tonhöhen bilden. Die Schwingung der Basilarmembran führt dann durch die Verbindung der äußeren Haarzellen über die Stereozilien mit der Tektorialmembran ebenfalls zu einer Wellenbewegung. Die beiden Wellenbewegungen der Membranen verlaufen teilweise gegenphasig, was folglich zu einem Abscheren der verbundenen Stereozilien führt. Durch diese Bewegung öffnen sich

Ionenkanäle und es entsteht ein Rezeptorpotential, was über das kontraktile Protein Prestin zu einer aktiven Längenänderung der äußeren Haarzellen führt. Hierdurch wird die Schwingungsamplitude der Basilarmembran vergrößert, sodass nun auch die inneren Haarzellen, welche nicht mit der Tektorialmembran verbunden sind, abgebogen werden. Die inneren Haarzellen öffnen auf diese Bewegung hin ebenfalls Transduktionskanäle, jedoch entsteht hierdurch keine mechanische Bewegung, sondern es kommt zu einer Transmitterausschüttung von Glutamat. Über Synapsen der inneren Haarzelle mit den peripheren Dendriten der Spiralganglienneurone im Modiolus entsteht so ein postsynaptisches Aktionspotential, welches dann über die zentralen Axone (als Gesamtheit der Nervus cochlearis) zum Nucleus cochlearis fortgeleitet wird. Das mechanische Signal wird also letztendlich in elektrische Impulse umgewandelt, die sogenannte elektromechanische Transduktion [13].

1.2.2 Der Nervus vestibulocochlearis

Der Nervus cochlearis stellt die Verbindung des Hörorgans, beziehungsweise seiner Sinneszellen zum Nucleus cochlearis dar. Im Innenohr besteht der Nerv aus einem zentralen, in den Hirnstamm eintretenden Anteil und einem peripheren Teil distal der sogenannten axonoglialen Junctionszone [14]. Hier findet sich im Bereich des Modiolus der Übergang von dem peripheren in das zentrale Nervensystem. Somit ändert sich hier auch die Zusammensetzung der schützenden Myelinschicht und wird von den Schwannzellen auf die Oligodendrozyten übertragen, während die Nervenbündel jedoch kontinuierlich fortlaufend sind [15]. Folglich besteht der Abschnitt der Myelinscheide zwischen der Übergangszone und den Zellkörpern im Ganglion spirale aus peripherem Myelin und der Abschnitt proximal, der in den Hirnstamm führt, aus zentralem Myelin [16]. Zudem wurde gezeigt, dass sich der Übergang von zentralem zu peripherem Nervensystem im Laufe der ersten postnatalen Entwicklungswoche zunehmend von dem subarachnoidalen Segment des Nervs über den Meatus acusticus internus bis nach peripher in den Modiolus auf Höhe der basalen Cochlea ausbreitet und an dieser Stelle auch im Erwachsenenalter verbleibt [14].

1.2.3 Wachstum und Degeneration von Spiralganglienneuriten

Die sensorineurale Schwerhörigkeit ist zumeist die Folge einer Haarzellschädigung. Bei einer hochgradigen Schädigung des Sinnesepithels kommt es zu einer sekundären Degeneration der peripheren, myelinisierten Nervenfasern [17]. Hier degenerieren zunächst die Axone selbst und im Anschluss dann die Myelinscheide, welche sich zurückbildet und lediglich ihre basalen Membranen noch für einige Zeit zurück lässt [18]. In diese leeren Membranhüllen mit den noch überlebenden Schwannzellen, können gegebenenfalls diejenigen Nervenfasern, die sich noch spontan regenerieren können, auswachsen; doch selbst diese Neuritenausläufer atrophieren und gehen letztendlich unter [18]. Diese Degeneration zieht sich fort bis in die zentralen Regionen und das olivo-cochleäre System, das die Haarzellen innerviert. Außerdem nimmt die Anzahl der Spiralganglienneurone (SGN) sowohl basal, als auch apikal mit steigendem Hörverlust ab, eine statistisch signifikante Reduktion ergibt sich jedoch nur in dem mittleren Bereich der Cochlea [19]. *In vitro* Studien haben außerdem belegt, dass insbesondere das Vorhandensein von Schwannzellen, hier vor allem durch seine Neutrophine, das Überleben der Spiralganglienneurone fördert [20].

1.2.4 Sensorineurale Schwerhörigkeit und ihre Behandlung

Die Schwerhörigkeit wird allgemein je nach Ort der Schädigung in eine cochleäre, also sensorische, eine retrocochleäre oder neurale, den Hörnerv betreffende sowie eine zentrale Schwerhörigkeit eingeteilt. Ursächlich für die Schädigung des Innenohres sind hierbei z.B. Überreizungen durch hohen Lautstärkeinfluss, Entzündungen oder auch ototoxische Medikamente [21]. Weder die Haarzellen des Cortiorgans noch die Neuronen im Spiralganglion können sich nach einer Schädigung wieder regenerieren, wenn sie erst einmal beschädigt sind. Lediglich den Nervenfasern ist diese Möglichkeit, wenn auch nur in sehr geringem Maße, spontan gegeben [22]. Ein Hörverlust ist aber letztendlich nicht zu vermeiden und eine kausale Therapie aktuell noch nicht möglich [23, 24].

Nach den aktuellen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaft (AWMF) wird eine Schädigung des Hörnerven oder des Innenohres als Schallempfindungsstörung definiert, welche durch Cochlea Implantate oder zentral-auditorische Implantate behandelt werden kann [25]. Hierbei wird das Cochlea Implantat bei intaktem achten Hirnnerven verwendet. Es ar-

beitet über ein Mikrophon, welches Signale empfängt, diese verarbeitet, an die intracochleär liegende Elektrode weiterleitet und dort über eine elektrische Stimulation eine Reizung verschiedener Anteile des Nervus cochlearis generiert [25]. Ist hingegen der Hörnerv beidseits in seiner Funktion beeinträchtigt, kommt das zentral-auditorische Implantat zum Einsatz. Dieses, im Hirnstamm sitzende Implantat, erzeugt durch elektrische Reize am Nucleus cochlearis die Hörempfindungen [25]. Während mit dem Cochlea Implantat aktuell eine zumeist ausreichende Hörrehabilität möglich ist, haben die zentral-auditorischen Implantate weniger gute Erfolgsaussichten. Eines der Ziele in der Innenohrforschung sollte es jedoch sein, für diese ausschließlich operativen Therapien ergänzende bioaktive Faktoren zu finden. Gerade das Wissen um Funktion und Expression der Gliazellen, ihrer Rezeptoren und deren Liganden in der Cochlea, hier insbesondere die der Schwannzellen, könnten weitere Ansatzpunkte für neue regenerative und hörnerverhaltende Therapieformen sein.

1.3 Der Nogo-Rezeptor und seine Liganden

1.3.1 Der molekulare Aufbau der Nogo-Familie

1.3.1.1 Nogo-A, -B, -C

Nogo, ein Mitglied der Reticulon Familie, auch bekannt unter Reticulon-4-A (RTN), wurde im Jahr 2000 als spezifisches Protein des ZNS entdeckt [9, 26]. Das Protein selbst wird in drei Untergruppen unterteilt: Nogo-A (1163 Aminosäuren), Nogo-B (360 Aminosäuren) und Nogo-C (199 Aminosäuren). Alle drei Gruppen besitzen einen gemeinsamen C-Terminus (Carboxy-Terminus) mit 188 Aminosäuren (AS). Die beiden kürzeren Proteine Nogo-B und -C haben beide einen N-Terminus (Amino-Terminus) von 172 AS. Während Nogo-B zumeist in der Lunge, der Milz, der Niere, dem Knorpel, der Haut, aber auch in den Schwannzellen des PNS und Nogo-C in den Skelettmuskeln zu finden sind, ist Nogo-A im ZNS, vorwiegend in den Oligodendrozyten lokalisiert und einer der Hauptakteure bei der Inhibition des Nervenwachstums. Das Protein besitzt sieben N-Glykosylierungen und mehrere O-Glykosylierungen. Nogo-A besitzt eine extrazelluläre Schlinge an der Oberfläche der Oligodendrozyten, die aus 66 Aminosäuren besteht und die inhibitorisch agierende Domäne des Proteins darstellt; aus dieser Erkenntnis erfolgte auch die Benennung des Nogo-66-Rezeptors [27]. Dieser Anteil grenzt an den C-Terminus des Proteins, welcher aus zwei transmembranären Domänen und einem extrazellulär

liegenden Endabschnitt besteht [27]. Der N-Terminus, Amino-Nogo-A, liegt dagegen intrazellulär, seine Funktion ist größtenteils noch unbekannt (Abbildung 4).

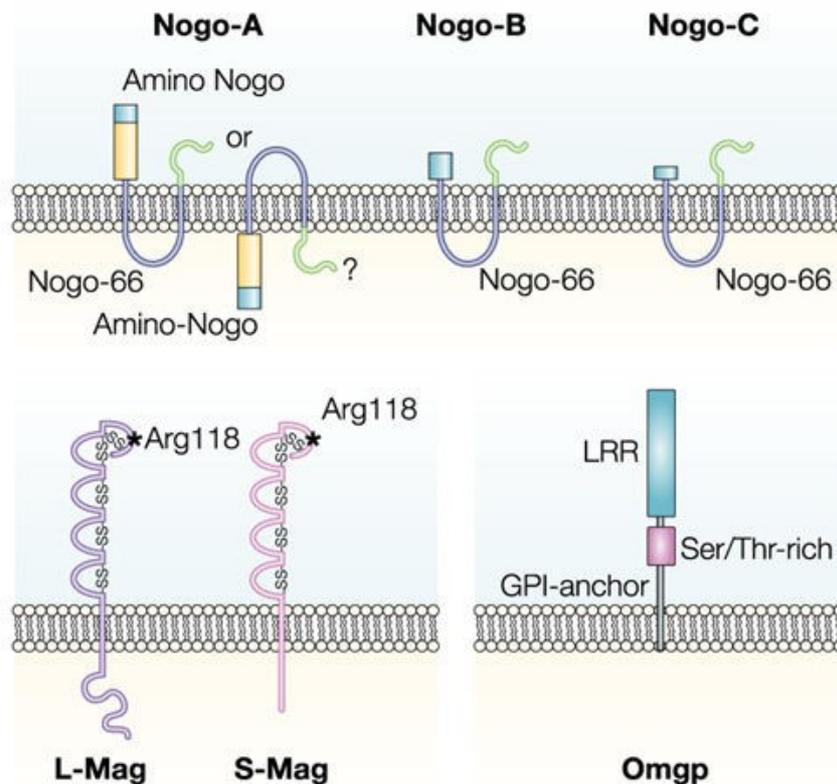


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Nogo, seinen Isoformen, MAG und OMgp. L-MAG *large* MAG, S-MAG *small* MAG, Arg118 Aminosäure Arginin 118, LRR Leucinreiche Region (engl.: *leucin-rich repeat region*), Ser-/Thr-rich Seronin-/Threoninreiche Region [28].

1.3.1.2 Der Nogo-66-Rezeptor

Der hochaffine Nogo-66-Rezeptor (NgR), ebenfalls Mitglied der RTN-Familie, wurde zunächst nur für die extrazelluläre Nogo-66-Domäne des Proteins bestimmt [29]. Er befindet sich vorrangig in den Neuronen und Axonen des ZNS. Der NgR bietet nicht nur für Nogo-66 die Bindungsstelle, sondern auch für MAG und OMgp. Es handelt sich um einen über eine Glycosylphosphatidylinositol-Verbindung verankerten neuronalen Rezeptor, welcher die inhibitorischen Signale seiner drei Liganden über die transmembranären Ko-Rezeptoren LINGO-1 und p75NTR (ein Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor Familie) in das Innere der Zelle weiterleitet [30, 31]. Hierbei sind der NgR und LINGO-1 feststehende Komponenten des Rezeptor-/Ko-Rezeptor-Komplexes, p75NTR ist hingegen austauschbar. Das zweite Protein, welches seine Funktion übernehmen kann ist TROY, ebenfalls ein Rezeptor der TNF-Familie, auch bekannt unter TNFRSF19 (engl.: *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19*, Rezeptor der TNF-Superfamilie, Mitglied Nr. 19) [32].

Beide Co-Rezeptoren können wahrscheinlich den Signalweg äquivalent einleiten [32].

1.3.1.3 Der Signaltransduktionsweg des Nogo-Rezeptorkomplexes

Der Signalweg des Rezeptorkomplexes wird über einen der drei Liganden initiiert: Nogo-66, MAG oder OMgp. Der NgR stellt hierbei die Bindungskomponente dar, während p75NTR selbst nicht mit den Liganden agiert, er stellt lediglich die signalübermittelnde Untereinheit dar, da dem NgR eine transmembranäre Domäne fehlt [33]. Die dritte Untereinheit LINGO-1 ist hierbei für die weitere Signalweiterleitung zuständig und arbeitet gleichzeitig mit den anderen beiden Untereinheiten zusammen. LINGO-1 ist vermehrt nach Nervenschädigung vorhanden und verbindet sich, sobald einer der drei Liganden des Rezeptorkomplexes vorhanden ist, mit dem NgR und p75NTR [30]. Nur durch die Bindung eines Liganden an den dreiteiligen Rezeptorkomplex, den NgR mit zwei Co-Rezeptoren, kann im Folgenden ein Effektor aktiviert werden, welcher die Signaltransduktionskette startet, bestehend aus der Guanosintriphosphatase (GTPase) und der Rho-A (Ras homologue) [34], welche wiederum die Serin-Threonin-Kinase ROCK aktiviert (Abbildung 5) [35]. Es kommt zu einer Änderung der Kalziumkonzentration im Zytoplasma mit konsekutiver Destabilisierung der Wachstumskegel an den Neuritenendigungen [36]. Dies führt letztendlich zu der Inhibition des Neuritenwachstums (Abbildung 5).

Jede Station dieser Aktivierungskette stellt eine potentielle Interventionsmöglichkeit dar, die theoretisch geblockt werden könnte, um eine Regenerationsfähigkeit des Nervengewebes wiederherzustellen.

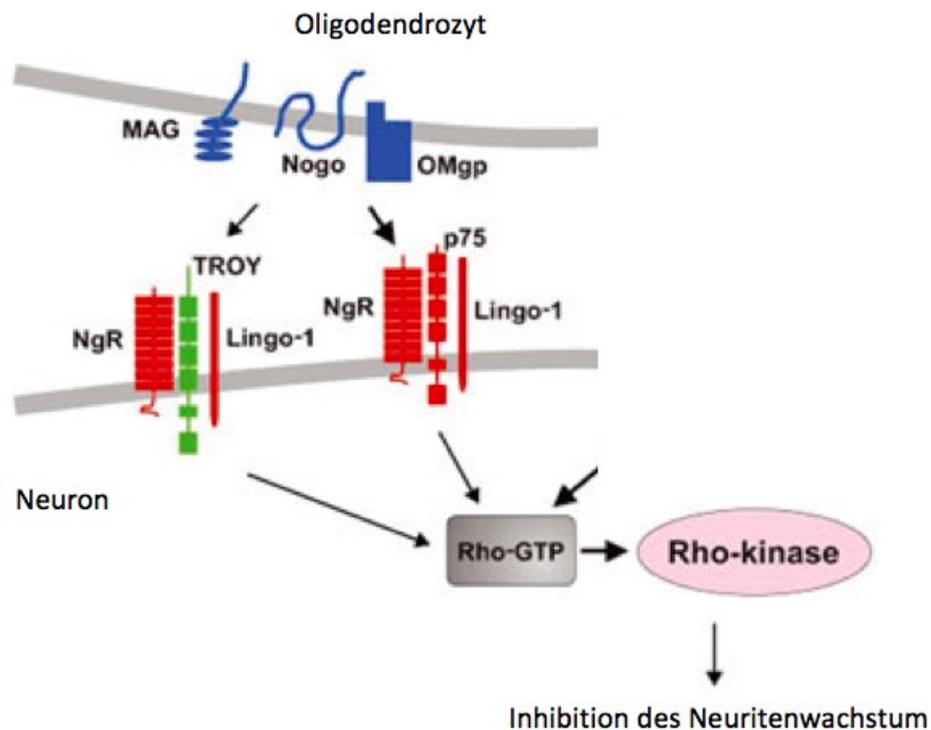


Abbildung 5: Die Signaltransduktionskette des NgR. Die Abbildung zeigt die Signaltransduktionskette, beginnend mit den drei Liganden MAG, Nogo-66 und OMgp, über den Rezeptorkomplex und die beiden Kinasen; modifiziert nach [37].

1.3.2 Funktion und Expression von Nogo im Zentralnervensystem

Lange Zeit wurde die Regenerationsunfähigkeit des Nervengewebes im ZNS als unantastbar erachtet, jedoch hat sich diese Ansicht mit der Entwicklung gerade im letzten Jahrzehnt sehr verändert. Das ZNS besitzt drei wichtige Proteine, die maßgeblich für das fehlende Neuritenwachstum verantwortlich sind. Diese Proteine, alle in der Membranschicht des oligodendrozytären Myelins des ZNS gefunden, sind Nogo-A, MAG und OMgp [38].

Caroni und Schwab haben 1988 die Proteine NI-35 und NI-250 (engl.: *neurite growth inhibitor*, Neuriten Wachstumsinhibitor, die damaligen namentlichen Vorgänger von Nogo-A) untersucht, welche in der Myelinmembran des ZNS lokalisiert sind und wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der zentralen Nervenregeneration spielen [39]. Schnell und Schwab haben diese Theorie später bestätigt, indem sie Ratten IN-1 als den monoklonalen Antikörper der Klasse IgM gegen die genannten Proteine injiziert haben und somit den inhibitorischen Effekt von NI-35 und NI-250 erfolgreich unterdrücken konnten. Die Nervenbündel des zuvor durch-

trennten Rückenmarks haben sich um das Sieben- bis Zehnfache verlängert im Gegensatz zu der Kontrollgruppe ohne IN-1-Behandlung [40].

IN-1 ist einer der ersten Antikörper mit dem eine Nervenregeneration im ZNS gelungen ist. Weitere Studien haben das Protein der Myelinmembran als Nogo spezifiziert, einen Neuritenwachstumsinhibitor, welcher durch den Antikörper IN-1 neutralisiert und seine Wirkung aufgehoben wurde [41], [42], [9]. Außerdem besteht ein humanes Äquivalent des NgR der Maus, welches 89% der Aminosäuren mit der Maus-Rezeptor-DNA gemeinsam hat; das humane NgR-Gen befindet sich hierbei auf Chromosom 22q11 [29]. Die *in situ* Hybridisierung hat hierbei außerdem die Lokalisation des Rezeptors vorrangig im Hirn gezeigt, vor allem im Cortex, in dem Pons, im Hippocampus und in den Purkinjezellen des Kleinhirns [29]. Der Rezeptor wird jedoch nur von Neuronen und nicht von Oligodendrozyten exprimiert [43]. Obwohl MAG, OMgp und Nogo-A keine offensichtlichen Übereinstimmungen in ihrer DNA-Sequenz aufweisen, haben sie dennoch eine gemeinsame Affinität zu dem NgR; die Konkurrenz hat sich in Versuchen primär zwischen MAG und Nogo und zwischen OMgp und Nogo gezeigt, besteht aber wahrscheinlich auch zwischen MAG und OMgp untereinander [44], [45].

1.3.3 Inhibitoren des Rezeptorkomplexes und Antikörper gegen

Nogo-A

Neben der Möglichkeit, die drei Liganden über Antikörper zu inaktivieren, gibt es weitere Ansatzpunkte. Einer davon ist die Blockade des Rezeptorkomplexes NgR mit LINGO-1 und p75^{NTR}. In einer Untersuchung von Petrinovic et al. 2010 wurden dorsale Spinalganglienexplantate von Mäusen und Ratten aus verschiedenen Rückenmarksregionen mit monoklonalen Anti-Nogo-A-Antikörpern behandelt, was zu dem erwarteten Effekt eines gesteigerten Längenwachstums führte. Weiter wurden die Kulturreihen mit Antikörpern gegen die einzelnen Bestandteile des Rezeptorkomplexes kultiviert, also eine Inhibition des NgR, von LINGO-1 sowie der Rho Kinase (ROCK) initiiert. Jede der Versuchsreihen zeigte ein vergleichbares Auswachsen der Neuriten auf ca. die doppelte Länge verglichen mit der Kontrollkultur ohne Antikörper-Zusatz [46]. Durch die gleiche Methode wurden auch *Nogo-knockout*-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Auch hier hat sich ein gesteigertes Neuritenwachstum bei den *Nogo-knockout*-Mäusen gezeigt [46]. Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Inhibition der Liganden als auch die Inhi-

bition des Rezeptorkomplexes eine Neuritenaussprossung fördert. Des Weiteren wurde bei einer *in vivo* Studie an Ratten operativ der rechte Tractus rubrospinalis auf Höhe C4 durchtrennt und den Versuchstieren, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, intrathekal NEP1-40 (engl.: *Nogo extracellular peptide, residues 1-40*, extrazelluläre Domäne von Nogo-66 mit 40 AS) zugeführt [47]. Die Studie konnte ein gewisses Maß an Nervenregeneration nachweisen, jedoch geschah dies nur kranial der gesetzten Läsion, die Axone konnten sich nicht nach kaudal regenerieren; trotz allem hatte die Behandlung aber vor einer postoperativen Degeneration weiteren Nervengewebes geschützt [47]. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass entweder die Blockade des NgR nicht ähnlich effektiv wirkt, wie die Neutralisierung von Nogo-A oder dass der Tractus rubrospinalis selbst nicht ebenso gut auf die Neutralisierung anspricht, wie beispielsweise der dorsale Tractus corticospinalis oder die Axone der Hinterwurzelganglien [48]. Obwohl sich die Fasern über keine große Strecke verlängert haben, hat sich das Nervengewebe durch die Behandlung mit NEP1-40 an der Läsionsstelle so umgeformt, dass diese Formation ausreichte, um funktionelle und koordinative Fähigkeiten in gewissem Maße wieder herzustellen [47]. Eine ähnliche Schlussfolgerung im Sinne einer geringeren Effektivität der Nogo-Rezeptorblockade im Vergleich zu einer Neutralisierung von Nogo-A wurde an NgR-KO-Mäusen gezeigt. Das Neuritenwachstum bei NgR-negativen Hinterwurzelganglien aus Mäusen, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, zeigte nach Zugabe von Nogo-66 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe [49]. Der Teil des Rezeptors, der hierbei mit den Liganden interagiert, ist folglich nicht gezwungenermaßen an seinen Rezeptor gebunden und kann seine inhibitorische Wirkung nach Ligandenbindung unabhängig von diesem entfalten [49].

Weitere Studien untersuchten im Rahmen von *in vivo* Experimenten den monoklonalen Anti-Nogo-A-Antikörper IN-1 an Ratten zur Blockade der Nogo-A-Wirkung. Beispielsweise nach einer teilweisen Durchtrennung des thorakalen Rückenmarks hatten die Ratten eine intrathekale Infusion mit dem gelösten Antikörper erhalten [50]. Es zeigte sich eine funktionelle Regeneration in Form einer wiedererlangten Schwimmfähigkeit sowie verbesserten Bewegungsabläufen im Vergleich zu der Kontrollgruppe [50].

1.3.4 Funktion und Expression von Nogo im Innenohr

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Expression und möglichen Funktion von Nogo im Innenohr: Caelers et al konnten zeigen, dass die Nogo-RezeptormRNA (engl.: *messenger ribonucleic acid*, Boten-Ribonukleinsäure) und Nogo-A, -B und -C im Innenohr der Ratte über eine RT-PCR (engl.: *Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) nachweisbar waren [51]. Dieser Nachweis gelang im Cortiorgan, im Spiralganglion und in der Stria vascularis. Mittels Immunhistochemie wurde zudem eine Expression von Nogo-A und dem NgR zum einen im Spiralganglion und zum anderen im Bereich des Cortiorgans festgestellt, insbesondere hier auch in der Membran der inneren und äußeren Haarzellen. Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied in der mikroanatomischen Entwicklung des Innenohres und in der Hörentwicklung zwischen Nogo-A-*knockout*-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nachgewiesen. Daher konnte schlussendlich nur eine Theorie geäußert werden, dass das Nogo-System im Innenohr die Regeneration beispielsweise beschädigter Haarzellen blockiert [51].

Bei einer Dissektion des Nervus vestibulocochlearis im Rattenmodell an seiner Austrittsstelle aus dem Hirnstamm führte eine intrathekale Injektion mit dem Antikörper IN-1, welcher gegen myelinassoziierte Wachstumsinhibitoren gerichtet ist, dazu, dass die verletzten Nervenfasern zum einen über eine längere Distanz auswachsen konnten und zum anderen auch zielgerichtet wuchsen. Hier hatten die Nervenfasern teilweise neue, synaptische Verbindungen zu ihrer proximalen Dissektionsstelle aufgebaut, wobei ein Teil der Neuriten nicht nur die Läsion überbrücken konnte, sondern auch den Nucleus cochlearis anterior sowie den Nucleus cochlearis posterior erreicht hatte [52].

1.4 Ziele der Arbeit

Gerade in den letzten Jahren haben die Studien zur Regeneration von Nervengewebe im ZNS in Zusammenhang mit Nogo und seinem Rezeptor deutlich zugenommen. Sie befassen sich aber zum überwiegenden Teil mit der Wirkung des Rezeptorkomplexes auf der Rückenmarksebene. Da sich bisher nur vereinzelte Arbeiten in der Innenohrforschung mit diesem Thema beschäftigen, ist das Ziel der vorliegenden, experimentellen Studie die Expression und die möglichen Funktionen des NgR im Innenohr zu untersuchen. Hier stellt sich das primäre Problem, dass

die Experimente der Rückenmarksforschung unter anderem darauf beruhen, dass Nogo-A in der Myelinmembran und den Oligodendrozyten lokalisiert ist, welche im ZNS das Myelin produzieren. Der periphere Anteil des Nervus vestibulocochlearis, welcher in die Cochlea eintritt, ist jedoch von myelinisierenden Schwannzellen umgeben. Diese haben beispielsweise einen anderen embryonalen Ursprung als die Oligodendrozyten. Dies ist nur einer der Gründe, weshalb sich die Schwannzellen zum Beispiel in ihrer Rezeptordichte oder allgemein in ihren Fähigkeiten unterscheiden können. Es soll die Funktion des NgR in einem *in vitro* Experiment analysiert werden. Während hier unter anderem schon *in vivo* Studien an Mäusen und Ratten vorliegen, welche das Neuritenwachstum sowie die posttherapeutische Funktionsfähigkeit untersucht haben, bleiben diese Fragen bezüglich der Degeneration des Hörnervs nach einer Ertaubung noch unklar. Im Zuge dessen stellen die vorliegenden *in vitro* Experimente das Verhalten der Neuriten sowie der begleitenden, nicht-neuronalen Zellen unter Blockade und Aktivierung des NgR dar. Die klinische Relevanz zeigt sich hierbei vor allem in der Tatsache, dass bis dato weltweit ca. 466 Millionen Menschen, 432 Millionen Erwachsene und 34 Millionen Kinder, an einer relevanten Schwerhörigkeit leiden. Bis 2050 soll diese Zahl schätzungsweise auf über 900 Millionen steigen. Somit zählt dieses Krankheitsbild zu einer der häufigsten Krankheiten der heutigen Gesellschaft, welche zusätzlich zu der bestehenden Pathologie auch meist eine massive Einschränkung der Lebensqualität für die Betroffenen bedeutet (WHO, engl. *World Health Organisation*, Weltgesundheitsorganisation [53]). Bei einer Schädigung der Haarzellen im Cortiorgan sowie der konsekutiven Degeneration der Nervenfasern und der Spiralganglienneurone ist bis heute eine kausale Therapie nicht möglich. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die mögliche Regenerationsfähigkeit der Neuriten unter Zugabe von Faktoren, welche den NgR blockieren (hier Nogo-66(1-40)), bzw. aktivieren (hier über MAG), getestet und so ein weiterer Hinweis für die Entwicklung neuer, kausaler Therapieformen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

- Aqua ad iniectabilia, Braun
- B27-supplement, Invitrogen
- Bovines Serum Albumin, Dade Behring
- DAPI Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology
- Destilliertes Wasser, gibco
- DMEM (+ Glutamax, + Glucose, + HEPES, - Pyruvate), gibco
- DPBS (steril), gibco
- EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma
- Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura, Niederlande
- Huhn Serum, Sigma
- Kollagen Typ IV, Maus-Kollagen, BD BioSciences
- Laminin, Sigma
- PBS Tabletten, Oxoid
- Penicillin/Streptomycin, gibco
- PFA, Merck
- Poly-D-Lysin Hydrobromid, Sigma
- Salzsäure 0,1 mol/l, Merck
- Sucrose, Sigma
- Tween 20, Sigma

2.1.2 Lösungen

- Blocking solution
 - 10% Serum, Ursprungstier 2nd AK (Huhn)
 - 0,1% Tween-20
 - 1% BSA
 - PBS
- SG-Medium mit NT-3 (je nach Experiment, Zugabe des jeweiligen Faktors)
 - DMEM
 - Penicillin/Streptomycin

- NT-3
- B27-supplement
- D-PBS

2.1.3 Antikörper

- Alexa 488, Huhn anti-Maus, *chicken anti mouse*, IgG AK, Invitrogen
- Alexa 488, Huhn anti-Ziege, *chicken anti goat*, IgG AK, Invitrogen
- Alexa 594, Huhn anti-Kaninchen, *chicken anti rabbit*, IgG AK, Invitrogen
- Alexa 594, Huhn anti-Ziege, *chicken anti goat*, IgG AK, Invitrogen
- β -III-tubulin, Neuronen spezifischer AK aus der Maus anti-Maus, R u. D
- MAG/Siglec 4a, AK Recombinant Ratte, R u. D
- Nogo, Anti-Nogo-Rezeptor AK aus dem Kaninchen anti-Kaninchen, Abcam
- p75NTR, Neutrophin Rezeptor, AK aus der Ziege anti-Ziege, R u. D

2.1.4 Faktoren

- Nogo-66(1-40)-Antagonist, Sigma Aldrich
- NT-3, neurotrophin human recombinant, Sigma Aldrich

2.1.5 Geräte

- Bildbearbeitungsprogramm ImageJ Version 1.45, Open Source, Wayne Rasband
- Cryostat Microtome, Thermo Shandon Cryotome
- Kamera, Digital Camera D7000, Nikon, Japan, Auflösung 16,2 Megapixel, Sensorgröße DX-Format, 23,6 mm x 15,6 mm
- Lichtmikroskop, Olympus, Model BX40F
- Literaturverwaltungsprogramm EndNote X7
- Statistikprogramm SPSS Version 22, IBM
- Statistiksoftware GraphPad, <http://www.graphpad.com>, Stand 21.11.2020
- Stereomikroskop, Carl Zeiss f170, OPMI 1 pico, Oberkochen
- Tabellenkalkulationsprogramm Excel, Windows-Office
- Waage mit Eichzulassung, ACJ 120-4M, Kern

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

- Chamber slides, NUNC Lab-Tec/Thermo Fischer
- Deckgläser/Objektträger, Menzel-Gläser SuperFrost® plus, Germany
 - 24 x 60 mm
 - 21 x 26 mm
- Einmal-Steripipetten 5-10 ml, Costar
- Falconröhrchen 15-50 ml, Cellstar
- Liquid blocker super pap pen, Daido Sangyo Co., Tokyo Japan
- Petrischalen Ø 35mm, 55mm, Sigma
- Pipetten Eppendorf Research plus
 - 0,5-10 µl
 - 10-100 µl
 - 20-200 µl
 - 100-1000 µl
- Pipettenspitzen 0,5-1000 µl, TipOne, Star Lab
- Save-lock tubes, Eppendorf
 - 0,5 ml
 - 1,5 ml
 - 2 ml
- Sterile Kompressen, Hartmann
- Sterile Nadeln, BD Microlance
- Sterile Skalpellklingen, Bayha

2.2 Ethikvotum und Tierversuchsgenehmigung

Für die Tiertötung zur Organentnahme wurde der *black six* Mäusestamm (C57BL/6J), der aus der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen wurde, verwendet. Der Antrag wurde unter der Projektnummer O13/2010 von der Tierversuchskommission der Universität genehmigt.

Der versuchstierkundliche Kurs der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität unter der Leitung von Privatdozent Dr. M. Sager wurde mit Erfolg absolviert.

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation der Cochlea

Es wurden C57BL/6J-Mäuse verwendet, welche frühestens vier und spätestens acht Tage postnatal präpariert wurden. Die Versuchstiere wurden mit einer Schere im distalen Bereich der Halswirbelsäule dekapitiert. Auf sterilen Mullkompressen wurde dann der Unterkiefer mit einer anatomischen Pinzette fixiert und durch Durchtrennung des Kiefergelenkes mittels einer Schere vom restlichen Kopf getrennt. Im Folgenden wurde die Kopfhaut mit einer Pinzette und einer kleinen, chirurgischen Schere vorsichtig von dem darunterliegenden Knochen- und Weichteilgewebe getrennt. Weiter wurde dann unter Fixierung des nun freiliegenden Neurocraniums die Schere von distal in das Foramen magnum eingeführt und dieses durch zwei Schnitte in zwei Hälften geteilt. Die Schnitte führten einmal entlang der Sutura sagittalis und einmal mittig durch den Clivus und das Pallatum osseum in der Medianebene. Das Hirngewebe wurde mit einer stumpfen Pinzette entfernt und die beiden, größtenteils noch knöchernen Schädelhälften, wurden in eine, mit gekühltem, sterilem PBS (gibco) gefüllte Petrischale überführt. Die folgende feingewebliche Präparation wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle fortgeführt. An sich kann die Cochlea auf zwei unterschiedlichen Zugangswegen präpariert werden. Der erste Zugang wird von medial, am Felsenbein in Richtung lateral zur Basis cochleae vorgenommen. Der zweite Weg führt durch das Trommelfell, Schädel einwärts. Hier wurde die Präparation von medial gewählt, da so ein geringeres Verletzungsrisiko des Innenohres besteht.

Die Cochlea wurde dann aus dem sie umgebenden Felsenbein herausgelöst und in eine neue, ebenfalls mit gekühltem, sterilem PBS (gibco) gefüllte Petrischale transferiert. Daraufhin wurde sie von ihrer knöchernen Kapsel und dem knöchernen Modiolus befreit, sodass ihr das bindegewebige Ligamentum spirale inklusive der Stria vascularis in einem Stück von basal nach apikal abgezogen werden konnte. Zum Vorschein kamen so die Spiralganglienneurone, deren Fortsätze den Nervus cochlearis bilden und die außerdem über Synapsen mit jeder Haarzelle verbunden sind. Dann wurden diese meist in drei Fragmente geteilt und bei 37°C in einer Petrischale mit SG-Medium zwischengelagert.

Während der Präparation wurden alle feinpräparatorischen Instrumente immer wieder in 80 prozentigem Alkohol desinfiziert und in PBS (Oxoid) neutralisiert.

Zur Herstellung der Cryoschnitte wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle der Stapes aus der ovalen Nische gelöst und der Apex der Cochlea perforiert. Das Präparat wurde anschließend mit 0,5 ml einer frischen, 4 %igen Paraformaldehyd Lösung (in PBS) vorsichtig perfundiert und daraufhin bei 4°C über Nacht nachfixiert. Es wurden Cochleae im Alter von postnatalem Tag (P) 2, P6, P14, P22 und vier Monaten gewonnen. Die Cochlea der Altersstufen P14 und P22 wurden anschließend mit 10 % EDTA (Sigma) bei 4°C für drei (P14) bzw. für fünf (P22) Tage dekalzifiziert. Nach der Kryoprotektion in 30 % Sucrose (Sigma) (über Nacht, 4°C) wurden die Präparate in dem Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura) mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Kryotomschnitte erfolgten mit einer Schichtdicke von 10 bis 15 µm auf SuperFrost® plus Objektträgern (Menzel-Gläser) mit einer anschließenden 30-minütigen Trocknungsphase bei Raumtemperatur.

2.3.2 Immunhistochemische Markierung und Färbung des Nogo-Rezeptors in Cryoschnitten

Zur Färbung der Cryoschnitte wurden Präparate des Innenohres der Mäuse im Alter von P2, P6, P14, P22 und vier Monaten verwendet, die bei -80°C gelagert wurden. Zunächst wurden die Schnitte bei 4°C aufgetaut und die Objektträger dann in zwei Hälften aufgeteilt. Beide wurden mit einem *Pap Pen (liquid blocker)* umrandet, so dass die eine Hälfte zur Kontrolle diente und die andere mit einem Antikörper angefärbt werden konnte. Im Anschluss wurden die Platten dreimal für fünf Minuten in einem PBS-Bad gewaschen und anschließend eine *Blocking solution* aufgetragen, welche 10% *Chicken Serum* (Sigma) (aus dem Huhn), 0,1% Tween-20 (Sigma), 1% BSA (Dade Behring) und PBS (gibco) enthielt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Primärantikörper in *Blocking solution*, der AK gegen den NgR aus dem Kaninchen (Abcam) und der AK gegen β -III-tubulin (Verdünnung 1:400, 2,5 ng/µl) aus der Maus (R u. D), aufgebracht. Die Objektträger wurden für zwölf Stunden bei 4°C abgedeckt inkubiert. Die Negativkontrolle wurde mit *Blocking solution* ohne Primärantikörper inkubiert.

Die Antikörperkonzentration ergab sich aus der zuvor durchgeführten Verdünnungsreihe. Hierfür wurde die Konzentration des NgR AKs zwischen 1:100 (8 ng/µl), 1:200 (4 ng/µl) und 1:400 (2 ng/µl) variiert. Als positive Kontrolle diente Hirngewebe der Maus.

Bei dem zweiten Schritt der Färbung wurde zunächst ebenfalls drei Mal für fünf Minuten mit PBS (gibco) gespült. Anschließend wurde der Sekundärantikörper auf die Objektträger gegeben, zum einen Alexa 488, *chicken anti rabbit* (Invitrogen), zur Markierung des entsprechenden Primärantikörpers gegen den NgR aus dem Kaninchen und zum anderen Alexa 594, *chicken anti mouse* (Invitrogen), der sich an den Primärantikörper gegen das β -III-tubulin aus der Maus bindet. Die Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie erneut mit PBS (gibco) gewaschen und mit Mounting VectorShield mit DAPI (Santa Cruz Biotechnology) zur Zellkernmarkierung eingebettet. Nach Auflage der Deckgläser wurden die Objektträger bis zur Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 4°C im Dunkeln gelagert. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit der zweiten Antikörper wurden alle Arbeitsschritte im zweiten Teil der Färbung in einem abgedunkelten Raum ausgeführt. Die gleiche Messreihe wurde mit Austausch des Primärantikörpers gegen β -tubulin-III mit einem Antikörper gegen MAG/siglec 4a (R u. D) (0,5 ng/ μ l) mit der Verdünnung 1:200 wiederholt. Die Negativkontrollen wurden ohne Zugabe des Primärantikörpers entsprechend nur mit dem Zweitantikörper behandelt.

Die Hirnschnitte der Maus wurden als Positivkontrolle zum Vergleich auf die gleiche Weise markiert und gefärbt.

Für die Auswertung wurden alle Objektträger mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus) in verschiedenen Vergrößerungen mikroskopiert und mit einer Kamera (Digital Camera D7000, Nikon, Japan) digital fotografiert mit einer Auflösung von 16,2 Megapixel. Derselbe Bildausschnitt wurde mit drei unterschiedlichen Farbfiltern entsprechend den Wellenlängen der Fluoreszenzmarkierungen fotografiert. Die drei Fluoreszenzbilder wurden dann mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.45) übereinander gelegt.

2.3.3 Die organotypische Kultur der Spiralganglienneurone

Für die Experimente wurde die organotypische Kultur der Spiralganglienneurone aus dem Innenohr von vier bis acht Tage alten Mäusen verwendet. Diese Zellen wurden nach der Präparation direkt auf die beschichteten Platten aufgetragen und mit Medium gefüllt.

Die Beschichtung der Platten mit Kollagen IV (BD BioSciences) erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurden zunächst die 0,1 molare Salzsäure (Merck) mit

Aqua ad iniectabilia (Braun) eins zu eins verdünnt und daraufhin die 0,05 molare HCl (Merck) in ein Falcon filtriert. Danach wurde das gefrorene Kollagen im Verhältnis 1:100 mit der filtrierten Salzsäure gemischt, auf die Platten gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurden alle Platten zweimal mit PBS (gibco) und einmal mit destilliertem Wasser gespült und bis zur Präparation am nächsten Tag bei 4°C gelagert.

Am Tag der Präparation wurde das Spiralganglienzellmedium hergestellt. Dieses bestand aus 10 ml *Dulbecco's modified Eagle medium* (gibco) (+ Glutamax, + Glucose, + HEPES, - Pyruvate, steril aliquotiert bei 4°C) mit 100 µl Penicillin/Streptomycin (gibco) (Penicillin: 0,1 U/ml Endkonzentration im Medium; Streptomycin: 0,1 µg/ml Endkonzentration im Medium), 20 µl NT-3 (Sigma Aldrich) (10 ng/ml Endkonzentration im Medium) und 200 µl *B27-supplement* (Invitrogen). Je nach Versuchsanordnung wurden dieser Grundzusammensetzung dann die Faktoren Nogo-66(1-40) oder MAG in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben.

Bis zu acht Kammern der Kulturschalen wurden mit je ein bis drei Explantaten bestückt, trockneten zum Anhaften kurz an und wurden dann unter stereomikroskopischer Kontrolle mit jeweils 200 µl Medium aufgefüllt. Hergestellt wurden pro Versuchstag drei Kulturschalen. Die erste Kulturschale wurde mit dem Faktor Nogo-66(1-40) (Sigma Aldrich) supplementiert, die zweite Schale mit dem Faktor MAG (R u. D) und die dritte Kulturschale erhielt keine weiteren Zusätze und diente somit als Kontrolle. Im Verlauf wurde sowohl die Konzentration von Nogo-66(1-40) (5 ng/µl, 10 ng/µl, 20 ng/µl), als auch die Konzentration von MAG (1 ng/µl, 2 ng/µl, 4 ng/µl) variiert.

Die Inkubation der Kulturen erfolgte nach Standardbedingungen für 72 Stunden bei 37°C und unter 5%iger CO₂-Begasung in einem Inkubator. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel für alle Kulturbedingungen.

2.3.4 Immunfluoreszenzmarkierung von Schwannzellen und Spiralganglienneuronen

Um die Anzahl und die Vitalität der einzelnen Spiralganglienneurone sowie der ausgewachsenen Neuriten im Kulturpräparat zu bestimmen, wurden diese fixiert, markiert und mit fluoreszierenden Antikörpern immunhistochemisch angefärbt.

Für die Fixierung wurde zunächst das Medium durch Pipetten aus den Spiralganglienneuronenkulturen (SGN-Kulturen) abgezogen und die Kammern dann mit 4%igem PFA (Merck) (200 $\mu\text{l/well}$) für 20 Minuten bei 4°C fixiert. Danach wurden die Platten dreimal für drei Minuten mit PBS (gibco) á 300 $\mu\text{l/well}$ zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindung gespült. Unter Zugabe von 200 $\mu\text{l/well}$ *Blocking solution* (Zusammensetzung siehe 2.1.2 Lösungen) verblieben die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Absaugung der *Blocking solution* wurden die Primärantikörper gegen β -III-tubulin (R u.D) (1:400) und gegen p75NTR (R u. D) (1:400) im Sinne einer parallelen Doppelfärbung (in *Blocking solution* gelöst) hinzugegeben. Die SGN-Kulturen wurden dann für zwölf Stunden bei 4°C inkubiert. Nach einer Spülung mit PBS für drei mal drei Minuten erfolgte die parallele Zugabe der fluoreszierenden Sekundärantikörper, zum einen Alexa 488 (Invitrogen), *chicken anti mouse*, welcher sich gegen den Primärantikörper gegen β -III-tubulin aus der Maus richtet, zum anderen Alexa 594 (Invitrogen), *chicken anti goat*, welcher sich gegen den Primärantikörper gegen p75NTR aus der Ziege richtet. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Antikörper wurden alle folgenden Schritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Beide sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung mit 1:400 (5 ng/ μl) in PBS (gibco) gelöst und mit 200 $\mu\text{l/well}$ auf die Präparate gegeben. Die Platten wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend wieder mit PBS (gibco) gewaschen und dann die Kammern entfernt. Zuletzt wurde das DAPI Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology) auf die Präparate aufgetragen zur Färbung der Zellkerne (blau) und Einbettung der Präparate. Nach dem Eindeckeln wurden die Objektträger bis zu der Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Für die Analyse der SGN-Kulturen wurden alle Platten unter einem Fluoreszenzmikroskop (Mikroskop BX40F, Olympus) mit entsprechenden Farbfiltern digital fotografiert (Digital Camera D7000, Nikon, Japan, Auflösung 16,2 Megapixel) und gespeichert.

2.4 Bestimmung der Neuritenlänge und statistische

Auswertung

Ebenso wie die Fotografien der Cryoschnitte wurden auch die drei Fluoreszenzbilder der SGN-Kulturen mit dem Programm ImageJ (Version 1.45) zur Co-Lokalisation übereinander gelegt, so dass die Färbung der Zellkerne, die der Neuri-

ten und die der Schwanzzellen in einem Bild erfasst werden konnten. Für die Quantifizierung der Neuritenlängen wurden die Bilder aus den drei Konzentrationsreihen mit Zusatz von Nogo-66(1-40) (Sigma Aldrich) (20 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, 5 ng/ μ l) und Zusatz von MAG (R u. D) (4 ng/ μ l, 2 ng/ μ l, 1 ng/ μ l) zuzüglich der jeweiligen Kontrollreihe betrachtet.

Pro Bedingung wurde bei zehn Explantaten, die ein reguläres Wachstumsmuster aufwiesen, die Neuritenlängen vermessen. Explantate, die teilweise oder komplett durch beispielsweise Spül-/Absaugvorgänge oder bei der Färbung beschädigt wurden, zählten hierbei nicht als Explantate mit regulärem Wachstumsmuster und wurden aus der Messung ausgeschlossen. Nogo-66(1-40) in der Konzentration von 20 ng/ μ l erbrachte 94 auswertbare Neuritenlängen, MAG mit 4 ng/ μ l 123 Neuritenlängen und die dazugehörige Kontrollreihe 112 Neuriten. Bei der Konzentration Nogo-66(1-40) 10 ng/ μ l wurden 100 Messungen von Neuriten getätigt, bei MAG 2 ng/ μ l und bei der Kontrolle jeweils 135 Messungen der Neuritenlänge. Die Messreihe mit Nogo-66(1-40) in einer Konzentration von 5 ng/ μ l lieferte 100 Neuriten, MAG mit 1 ng/ μ l 116 und die dazugehörige Kontrolle 130 auswertbare Neuritenlängen.

Hierzu wurden zumeist die Bilder in der kleinsten Vergrößerung (x10) verwendet, auf denen das komplette Explantat inklusive der ausgewachsenen Neuriten zu sehen waren. Wenn die Neuriten nicht auf einem einzigen Bild komplett erfasst werden konnten, wurde der auszuwertende Neurit auf mehreren Bildern abfotografiert und die einzelnen Messwerte addiert. Mit dem Programm ImageJ (Version 1.45) wurden dann die einzelnen Neuriten ab der Austrittsstelle aus dem Präparat bis nach distal ausgemessen und in einer Excel Tabelle festgehalten. Durch Umrechnung des Vergrößerungsfaktors des Mikroskops und der Kamera konnten die Pixelwerte in μ m bestimmt werden. Pro Versuchsdurchführung wurden fünf bis 15 Tiere, insgesamt 85 Tiere präpariert. Jede Maus ergab zwei Cochleae, woraus jeweils zwei bis drei SGN-Präparate entstanden.

Die ausgemessenen Werte aus der Excel Tabelle wurden in das Statistikprogramm SPSS (Version 22, IBM) übertragen. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (engl.: *Analysis of Variance*) zur Feststellung signifikanter Unterschiede der Mittelwerte bei sieben Stichproben. Die multiplen Mittelwertvergleiche zur Suche nach signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen

Faktoren wurden mittels Post-hoc-Analyse nach Tukey durchgeführt und erfolgten zum Signifikanzniveau $\leq 0,05$.

2.5 Wachstumsverhalten der Schwannzellen

2.5.1 Anzahl der Schwannzellen

Für die Quantifizierung der Schwannzellen wurden insgesamt elf Präparate der Kontrollreihe der SGN-Kulturen vermessen, außerdem 16 Präparate der MAG-Reihe und 18 Explantate der Nogo-66(1-40)-Versuchsreihe. Die Auswertung erfolgte in Abhängigkeit der jeweiligen verschiedenen Konzentrationen. Zur Vereinheitlichung wurde bei jeder Abbildung mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.45) ein Bildausschnitt der Größe $300\ \mu\text{m}$ mal $300\ \mu\text{m}$ gewählt. In diesem Ausschnitt wurden dann zum einen die angefärbten Zellkerne und zum anderen die p75NTR-positiven Schwannzellen manuell ausgezählt. Um die unterschiedlich ausgewählten Segmente nachvollziehen zu können, wurden alle bearbeiteten Bilder inklusive der markierten Ausschnitte separat gespeichert. Nach der Auszählung wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellkerne und der Schwannzellen pro Explantat in dem vorgegebenen Bereich ermittelt und der prozentuale Anteil der Schwannzellen an allen ausgezählten Zellen berechnet. Der prozentuale Schwanzzellanteil wurde für die Konzentrationen der Nogo-66(1-40)-Versuchsreihe, für die Konzentrationen der MAG-Versuchsreihe und für die Kontrollreihe berechnet. Die ausgemessenen Werte wurden zur Feststellung signifikanter Unterschiede der Mittelwerte bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der einzelnen Konzentrationen von Nogo-66(1-40) und MAG mit der Kontrollreihe in das Statistiksoftwareprogramm *graphpad* (Stand 21.11.2020) zur Durchführung eines ungepaarten t-Tests eingetragen. Zudem erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Faktorkonzentrationen von Nogo-66(1-40) und MAG untereinander. Die Berechnungen erfolgten zum Signifikanzniveau $\leq 0,05$.

2.5.2 Migrationsweite der Schwannzellen

Für die Auswertung der Migrationsweite der Schwannzellen wurden insgesamt 11 Präparate der Kontrollreihen, 18 Präparate der Nogo-66(1-40)-Reihe und 16 Präparate der MAG-Reihe untersucht. Beispielfhaft wurde aus jedem Präparat die am weitesten vom Explantat entfernt liegende p75NTR-positiv Schwannzelle gewählt und ihr Abstand zum Explantat gemessen (Programm ImageJ, Version 1.45). An-

schließlich wurden alle Längenwerte einer Versuchsreihe addiert und die durchschnittliche Entfernung einer Schwanzzelle pro Präparat berechnet. Es wurde die Durchschnittslänge in Abhängigkeit der drei Versuchsreihen sowie der jeweiligen Faktorkonzentrationen gebildet. Die Bilder mit den Messungen wurden ebenfalls separat zur Reproduzierbarkeit gespeichert. Die ausgemessenen Werte wurden zur Feststellung signifikanter Unterschiede der Mittelwerte bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der einzelnen Konzentrationen von Nogo-66(1-40) und MAG mit der Kontrollreihe in das Statistiksoftwareprogramm *graphpad* (Stand 21.11.2020) zur Durchführung eines ungepaarten t-Tests eingetragen. Zudem erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Faktorkonzentrationen von Nogo-66(1-40) und MAG untereinander. Die Berechnungen erfolgten zum Signifikanzniveau $\leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des Nogo-Rezeptors in der Cochlea der Maus

Die Expression des NgR in der Cochlea der Maus konnte in verschiedenen Altersstufen nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Vergleich zwischen postnatalem Tag zwei und zu den älteren Mäusen im Alter von P6 bis vier Monaten eine in jedem Alter vorhandene Expression des NgR in den Spiralganglienneuronen (SGN) und deren Neuriten (Abbildung 6, kurzer Pfeil sowie Abbildung 7, Markierung „periphere Neuriten“). Die Neuriten zeigten eine vermehrte Signalgebung im zentralen Anteil, welche nach peripher hin abnahm, hier im Sinne einer vermehrten Expression des NgR nach zentral und Abnahme der Rezeptordichte nach peripher. Die Neuriten zeigten sowohl zu Beginn der Entwicklung mit P2 (Abbildung 7) als auch im weiteren Verlauf über P6, P14, P22 und im Alter von vier Monaten (Abbildung 6) eine nachweisbare Expression des NgR.

Im Bereich des Spiralganglions ließ sich zu Beginn der Entwicklung (Alter P2) eine etwas geringer ausgeprägte Expression des NgR nachweisen. Vergleicht man die Aufnahmen, hier speziell des Spiralganglions im Verlauf mit beispielsweise den Cochleae der Mäuse im Alter von P14, P22 und vier Monaten zeigte sich eine zunehmend intensivere Signalstärke mit Punctum maximum im Alter von vier Monaten (Abbildung 6, kurzer Pfeil). Somit ist insgesamt eine zunehmende Rezeptordichte des NgR, vor allem im Bereich des Spiralganglions, mit zunehmendem postnatalem Alter und nach Abschluss der Hörentwicklung zu beobachten.

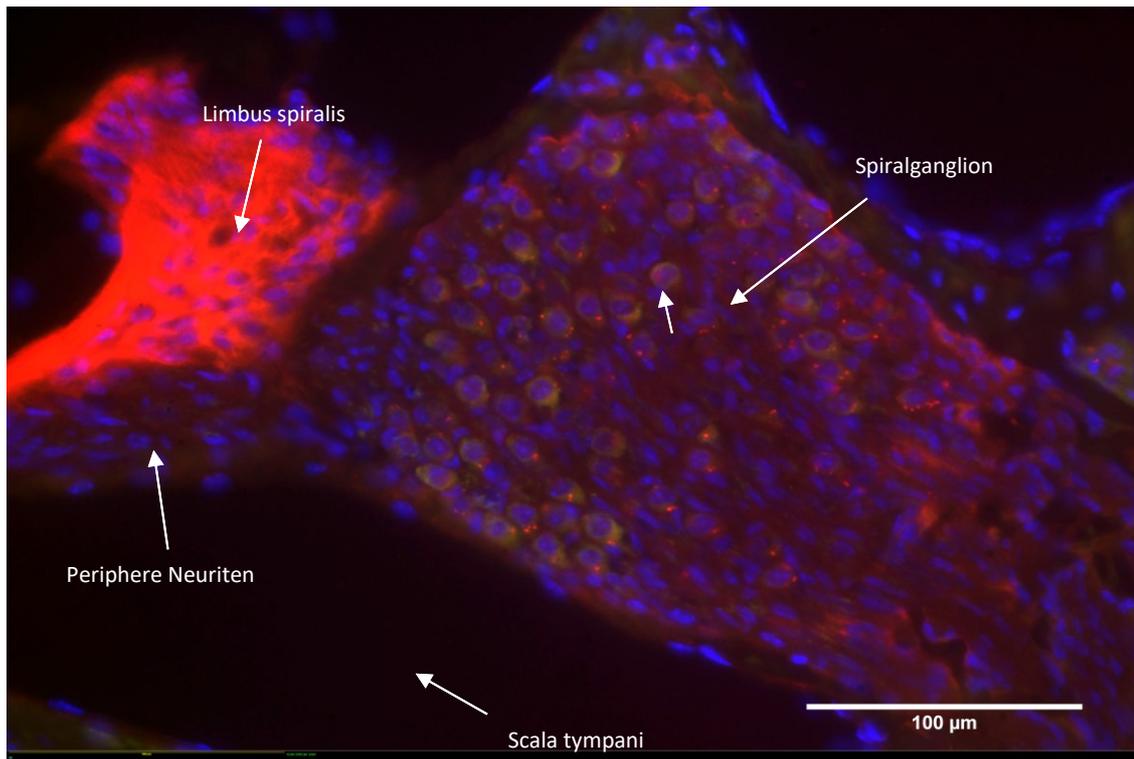


Abbildung 6: Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von vier Monaten nach Fixierung und immunhistochemischer Markierung mit Primärantikörpern gegen den NgR und das β -III-tubulin. Die Abbildung zeigt das Spiralganglion mit angeschnittenem Cortiorgan. Es zeigt sich eine deutliche Expression des NgR im Bereich des Spiralganglion, hier in den Spiralganglienneuronen (kurzer Pfeil). (NgR = rot, β -III-tubulin = grün, DAPI = blau).

Ähnliches ließ sich auch im Stützzellapparat beobachten. Ab dem Alter P6 ließen sich eindeutige Signale im Bereich der Stützzellen des Cortiorgans nachweisen. Im Alter von P2 zeigte sich jedoch auch schon eine erste, schwache Expression des NgR in den Stützzellen (Abbildung 7, geschwungener Pfeil). Diese intensivierte sich ebenfalls, wie auch im Spiralganglion mit fortschreitender Entwicklung und zeigte die höchste Rezeptordichte im Alter von P22 und vier Monaten postnatal. In diesem Alter konnte dann auch, unter anderem durch die anatomisch fortschreitende Entwicklung die Rezeptorexpression besser spezifiziert werden. Hier konnte in den genannten Altersklassen eine eindeutige Signalgebung in den Pfeilerzellen nachgewiesen werden, welche den Corti Tunnel umschließen (Abbildung 8, kurze Pfeile). Auch die Deiterszellen als weitere Komponente des Stützzellapparates zeigten eine vergleichbare Expressionsstärke im Alter von P22 und vier Monaten (Abbildung 9, langer Pfeil rechts). Unter anderem anatomisch bedingt und auf Grund der noch geringeren Rezeptordichte ließ sich die Rezeptorexpression im Alter P2 und P6 größtenteils noch nicht sicher zu den einzelnen Zellen des Stützzellapparates zuordnen, dies war nur in einzelnen Präparaten möglich wie in Abbildung 7.

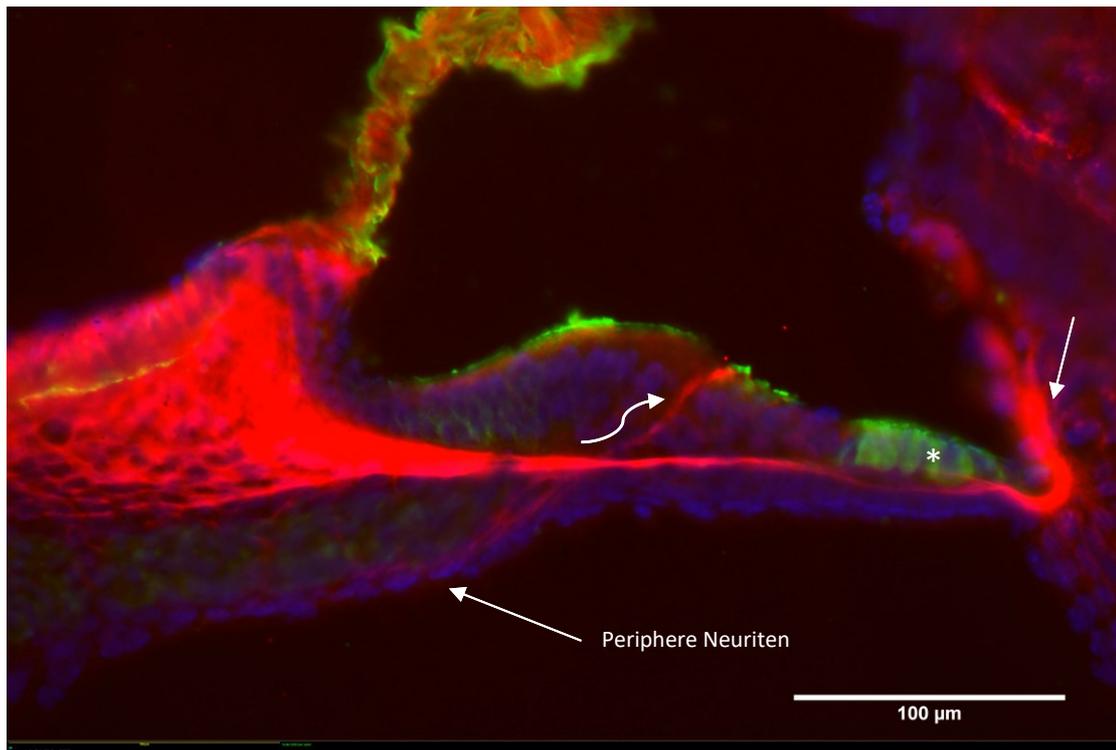


Abbildung 7: Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von P2 nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Es zeigt sich eine kräftige Expression des NgR im Cortiorgan, in der inneren Stützzelle (geschwungener Pfeil) sowie etwas schwächer auch in der Stria vascularis (gerader Pfeil). Zudem ist eine deutliche Expression von MAG in den Böttcherzellen (*) und geringer in den inneren Phalangealzellen nachweisbar. (NgR = rot, MAG = grün, DAPI = blau).

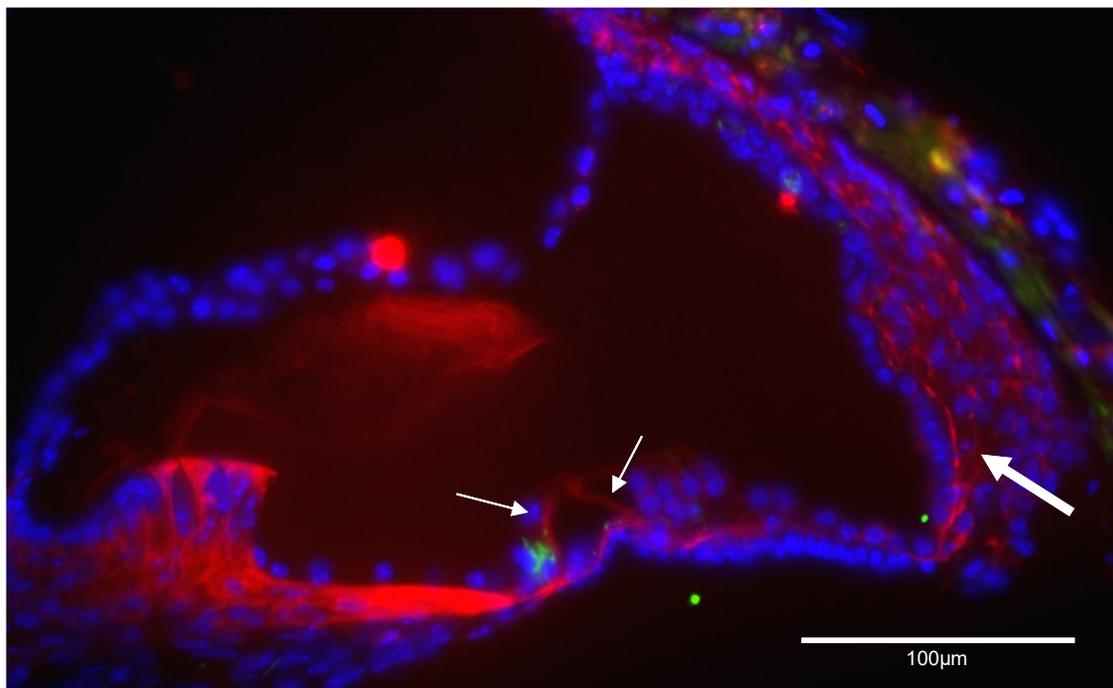


Abbildung 8: Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von P22 nach Fixierung und immunhistochemischer Markierung. Es zeigt sich eine mäßige Expression des NgR im Bereich der Pfeilerzellen des Cortiorgans (kurze Pfeile). Es zeigt sich außerdem eine Signalgebung der Stria vascularis (dicker Pfeil rechts). (NgR = rot, β -III-tubulin = grün, DAPI = blau).

Neben der Dreierreihe der äußeren Haarzellen und ihren Stützzellen war unter anderem auch die innere Haarzelle als birnenförmige Struktur anatomisch erkennbar (Abbildung 9, *-Markierung). Eine sichere Expression des NgR ließ sich hier nicht abgrenzen. Als weiteres Bildbeispiel ist auch hier wieder eine kräftige Signalintensität innerhalb der Spiralganglienneurone im Rahmen der NgR-Markierung im Alter von vier Monaten nachweisbar (Abbildung 9, geschwungener Pfeil).

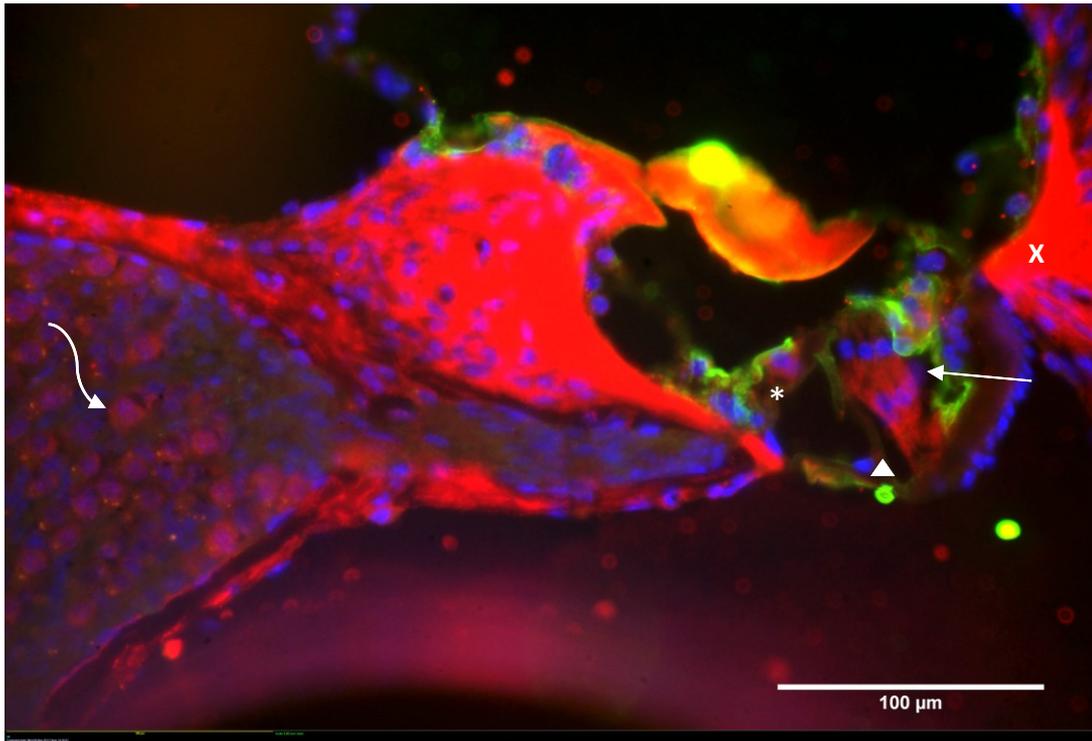


Abbildung 9: Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von vier Monaten nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt das Cortiorgan mit angeschnittenem Spiralganglion und der NgR Expression in den Spiralganglienneuronen (geschwungener Pfeil). Auch hier zeigt sich die kräftige NgR Expression der Deiterszellen (langer Pfeil rechts) sowie eine Expression von MAG in der äußeren Pfeilerzelle (Pfeilspitze). Es zeigt sich eine überschießende Signalgebung im Bereich der Stria vascularis (X-Markierung). Die innere Haarzelle ist mit einem * markiert. (NgR = rot, MAG = grün, DAPI = blau).

Insgesamt zeigte die Stria vascularis in allen Altersklassen nach immunhistochemischer Färbung mit den NgR-spezifischen Antikörpern eine kräftige Signalgebung. Einige Präparate wiesen hierbei eine eindeutige Signalgebung im Sinne einer Rezeptormarkierung auf (Abbildung 8, dicker Pfeil rechts), andere Präparate zeigten dagegen eine überschießende Signalgebung (Abbildung 9, X-Markierung). Betrachtet man gleichzeitig die Negativkontrolle zeigte sich, dass ohne Antikörperfärbung keine Signalgebung im Bereich der Stria vascularis nachweisbar war (Abbildung 10, umrandete Markierung).

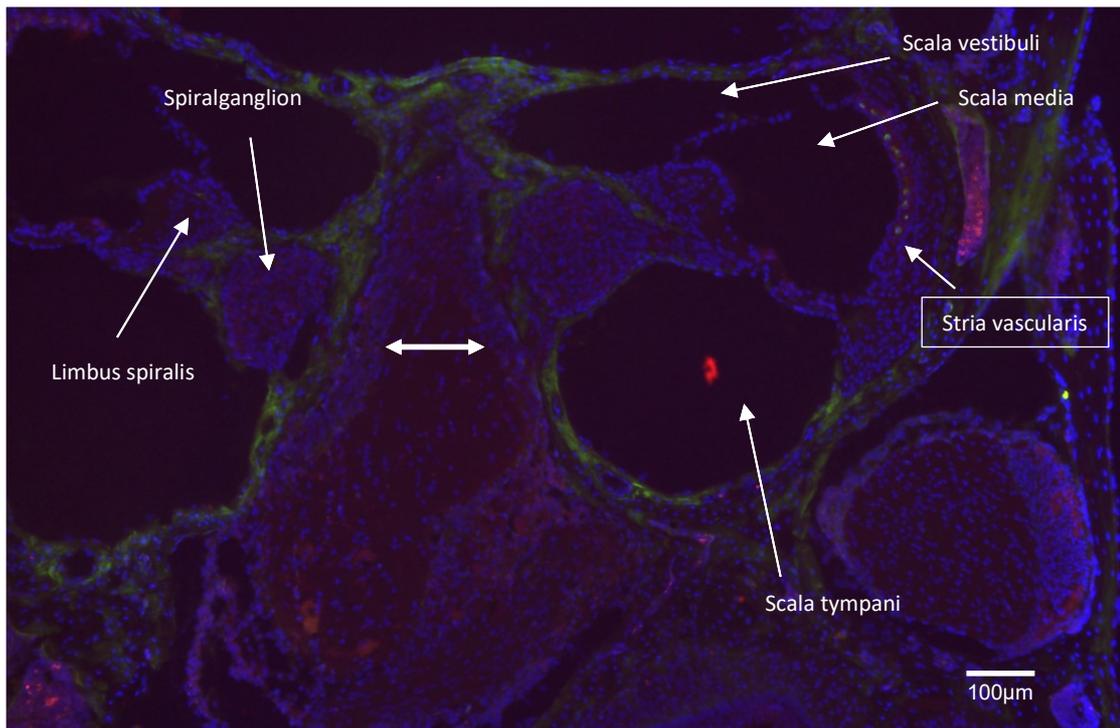


Abbildung 10: Negativkontrolle; Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von P22 nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung ohne Primärantikörper. Doppelpfeil = axonogliale Junctionszone. Die umrandete Markierung entspricht der Stria vascularis.

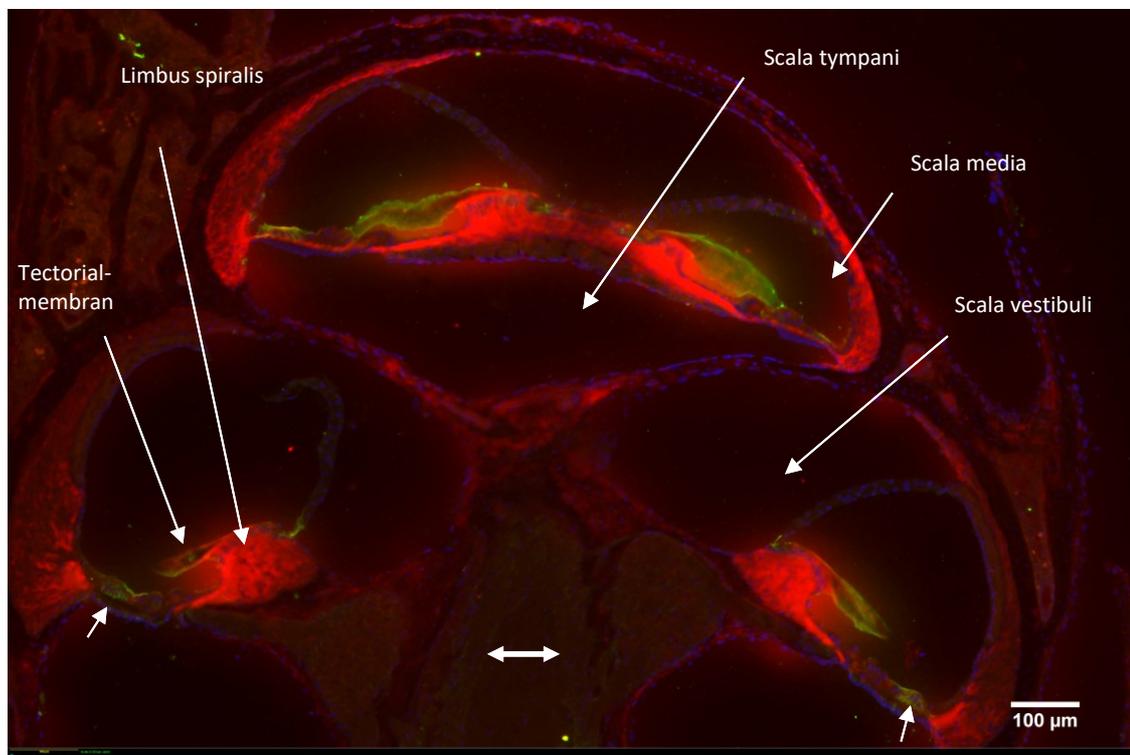


Abbildung 11: Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von P14 nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Cochlea im Längsschnitt mit Darstellung der axonogliale Junctionszone (Doppelpfeil). In der kleinsten Vergrößerung zeigt sich die primäre Expression von MAG innerhalb der Böttcherzellen (kurze Pfeile). (NgR = rot, MAG = grün, DAPI = blau).

Die zweite Versuchsreihe wurde mit MAG/siglec 4a durchgeführt. In Übereinstimmung mit dem NgR zeigte die Färbung mit dem Sekundärantikörper gegen den MAG-AK eine deutliche Signalgebung in den Neuronen der Spiralganglien sowohl direkt postnatal im Alter von P2, als auch in den folgenden, untersuchten Altersklassen mit P6, P14, P22 (Abbildung 12, kurzer Pfeil links) und vier Monaten. Zudem konnte eine kräftige Expression von MAG, ebenfalls direkt postnatal, vor allem in den Böttcherzellen (Abbildung 12, *-Markierung und Abbildung 11, kurze Pfeilmarkierungen) sowie mit etwas geringerer Signalintensität auch in den inneren Phalangealzellen nachgewiesen werden (Abbildung 7, Abbildung 9, Pfeilspitze). Bei der zeitlichen Expressionsanalyse von MAG konnte in der Entwicklung der Cochlea jedoch kein Unterschied in der quantitativen Ausprägung von MAG festgestellt werden.

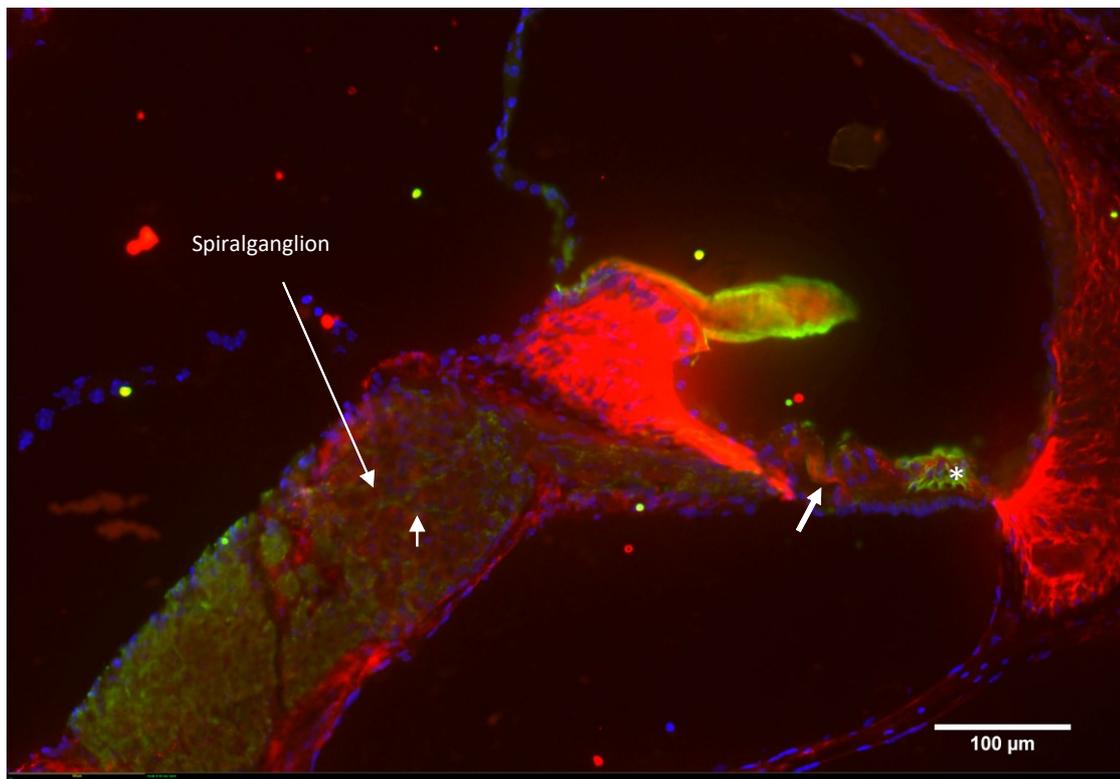


Abbildung 12: Cryoschnitt einer Mäusecochlea im Alter von P22 nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt das Cortiorgan mit angrenzendem Spiralganglion. Es zeigt sich weiterhin eine deutliche Expression des NgR in den Neuronen (kurzer Pfeil links), im Cortiorgan sowie in den Deiterszellen (dicker Pfeil rechts) und schwächer ausgeprägt auch in der Stria vascularis. Auch MAG zeigt eine deutliche Expression im Bereich des Spiralganglions (kurzer Pfeil links). Außerdem, zeigt sich eine sehr kräftige Signalgebung in den Böttcherzellen (*). (NgR = rot, MAG = grün, DAPI = blau).

3.2 Charakterisierung der organotypischen Kultur der Spiralganglienneurone

3.2.1 Länge und Anzahl der ausgewachsenen Neuriten

Die Länge der ausgewachsenen Neuriten wurde gemessen, um das Wachstumsverhalten unter den drei verschiedenen Testbedingungen zu vergleichen. Nogo-66(1-40) in der Konzentration von 20 ng/ μ l erbrachte n=94 auswertbare Neuritenlängen bei zehn ausgezählten Explantaten, MAG mit 4 ng/ μ l n=123 Messwerte/10 Explantate und die dazugehörige Kontrollreihe n=112 Messwerte/pro 10 Explantate. Mit der Konzentration Nogo-66(1-40) 10 ng/ μ l wurden n=100 Messungen bei zehn Explantaten getätigt, bei MAG 2 ng/ μ l und bei der Kontrolle jeweils n=135 Messungen/10 Explantaten. Die Messreihe mit Nogo-66(1-40) in einer Konzentration von 5 ng/ μ l lieferte n=100 Werte, MAG mit 1 ng/ μ l n=116 und die dazugehörige Kontrolle n=130 auswertbare Neuritenlängen/10 Explantate. β -III-tubulin markierte die Neuriten (grün), p75NTR markierte die Schwanzzellen (rot) und DAPI die Zellkerne (blau). Anschließend wurde eine unifaktorielle ANOVA berechnet, um einen Unterschied in der Neuritenlänge, gemessen in μ m, abhängig von dem Nährmedium der SGN-Kultur unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Die Variation des Nährmediums wurde in insgesamt sieben Stichproben mit den Messwerten der Neuritenlängen unterteilt. Die Messwerte der Kontrollreihen wurden hierbei zu einer Stichprobe mit n=377 zusammengefasst. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte zu einem festgelegten Signifikanzniveau von $\leq 5\%$. Die vollständige Auswertung befindet sich im Anhang (Tabelle 1 und Tabelle 2).

Unter Zugabe von Nogo-66(1-40) zeigte sich das größte Längenwachstum von durchschnittlich 560,9 μ m der Neuriten bei einer Konzentration von 20 ng/ μ l, gefolgt von einer Konzentration von 5 ng/ μ l mit einer durchschnittlichen Neuritenlänge von 518,3 μ m. Die Konzentration 10 ng/ μ l lieferte, verglichen mit den anderen Nogo-66(1-40)-Reihen das verhältnismäßig geringste Neuritenwachstum mit einer durchschnittlichen Länge von 463,9 μ m, jedoch immer noch ein signifikant längeres Auswachsen im Vergleich zu der Kontrollreihe mit einer durchschnittlichen Neuritenlänge von 203 μ m. Somit konnten alle Konzentrationen unter Nogo-66(1-40)-Einfluss signifikant verlängerte Neuriten verglichen mit der Kontrollrei-

he vorweisen. Zwischen den einzelnen Nogo-66(1-40)-Konzentrationen zeigte sich ein signifikanter Längenunterschied der Neuriten lediglich zwischen den Konzentrationsreihen mit einer Nogo-66(1-40)-Konzentration von 20 ng/ μ l und 10 ng/ μ l. Die übrigen Schwankungen der Ergebnisse innerhalb der Konzentrationsreihen sind bei fehlender Signifikanz als unbedeutend zu werten.

Neben dem signifikant vermehrten Längenwachstum unter Rezeptorblockade verglichen mit der Kontrollkultur zum Signifikanzniveau $\leq 1\%$ zeigte sich zudem auch ein vermehrtes Auswachsen von Filopodien an den peripheren Wachstumskegeln der Neuriten (Abbildung 14, siehe Pfeilmarkierung). Insbesondere bei den Neuriten, welche die größte Länge erreicht hatten, ließen sich am distalen Ende multiple, feine Ausziehungen abgrenzen. Des Weiteren konnte hier auch bei einigen Explantaten in der Peripherie ein etwas verzweigteres Wachstumsmuster mit Ausläufern zu benachbarten Neuriten festgestellt werden, welches sich so in den Kontrollkulturen nicht sicher nachvollziehen lässt (Abbildung 13). Die vermehrte Bündelung der Neuriten entstand hier durch die beschleunigte Faszikulation. Die Explantate der MAG- bzw. der Kontrollreihe zeigten eine deutlich reduzierte Anzahl an peripheren Ausläufern. Zusammenfassend führt die Blockierung des NgR also nicht nur zu einem Längenwachstum sondern auch zu einer deutlich vermehrten Ausbildung von Filopodien sowie zu einer erhöhten Faszikulation, wodurch nicht nur der Anschluss an beispielsweise einen distal gelegenen Nervenstumpf unterstützt wird, sondern auch die Verknüpfung der einzelnen Neuriten untereinander zur Wiedererlangung der Funktionsfähigkeit. Ob diese Verbindungen hier selektiv oder unselektiv geknüpft wurden konnte nicht nachgewiesen werden.

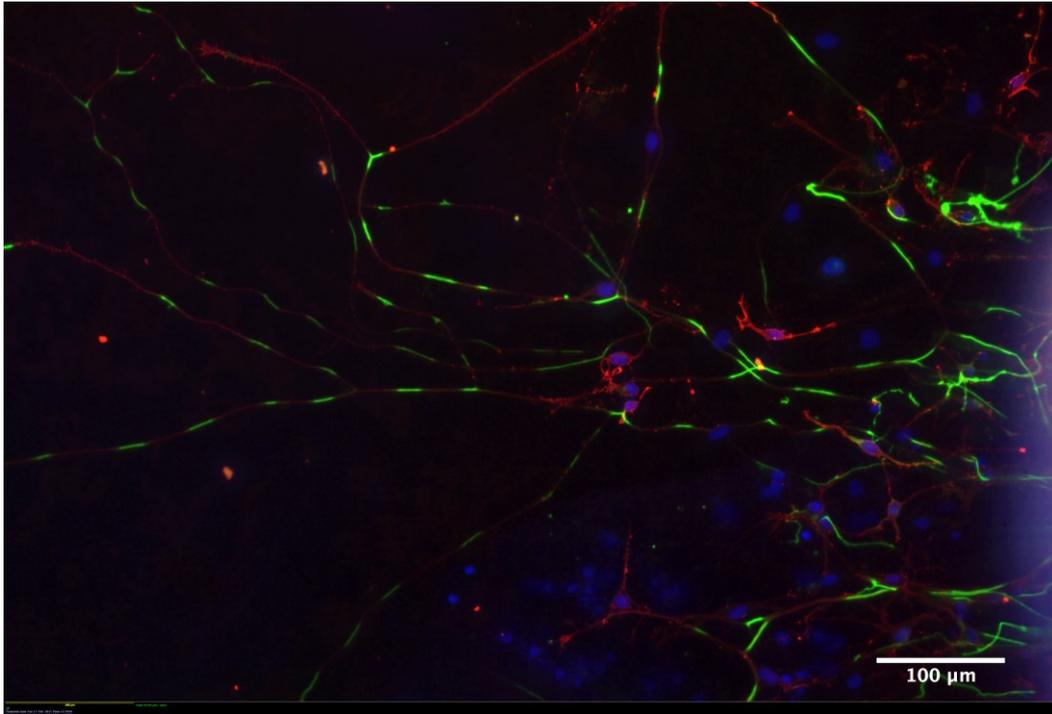


Abbildung 13: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von Nogo-66(1-40) (20 ng/μl) zu dem Nährmedium; nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt das Neuritenwachstum vom Fuße des Explantates mit einem deutlichen Längenzuwachs der Neuriten. (β-III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

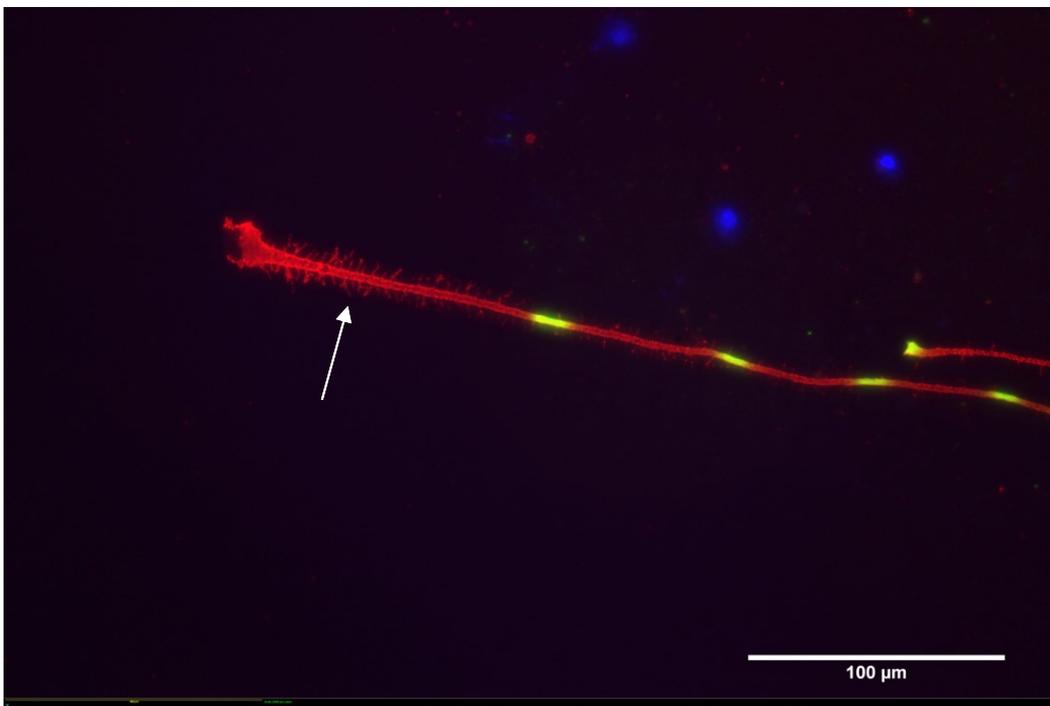


Abbildung 14: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von Nogo-66(1-40) (5 ng/μl) zu dem Nährmedium; nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt den Wachstumskegel eines ausgewachsenen Neuriten. Hier sind die Filopodien des Neuriten deutlich zu sehen (Pfeil). (β-III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Betrachtet man anschließend die statistische Darstellung der Unterschiede der einzelnen Faktoren und deren Konzentration, bzw. der Kontrollreihe bezogen auf den Mittelwert der Neuritenlänge zeigte sich, dass alle Konzentrationen von Nogo-66(1-40) eine signifikante Zunahme der Neuritenlängen verglichen mit der Kontrollreihe bei $p \leq 0,001$ vorweisen konnten (Abbildung 15). Im Gegensatz zu der Kontrollreihe zeigten die Neuriten nach Rezeptorblockade in allen Konzentrationsreihen ein, über das Doppelte hinausgehendes Längenwachstum.

Unter MAG-Einfluss konnte eine reduzierte Neuritenlänge nachgewiesen werden, jedoch in weniger deutlichem Maße, als unter Nogo-66(1-40)-Einfluss. In jeder Versuchsreihe ist die Standardabweichung innerhalb der Säule eingetragen.

Der Post-hoc-Test nach Tukey zeigte hier einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,001$) des Neuritenwachstums aller Nogo-66(1-40)-Reihen im Vergleich zu der Kontrollreihe. Der Mittelwert der Neuritenlängen unter Zugabe von Nogo-66(1-40) überstieg den der Kontrollreihe je nach Konzentration um maximal 374 μm ; es zeigte sich bei jeder Konzentration ein signifikanter Unterschied.

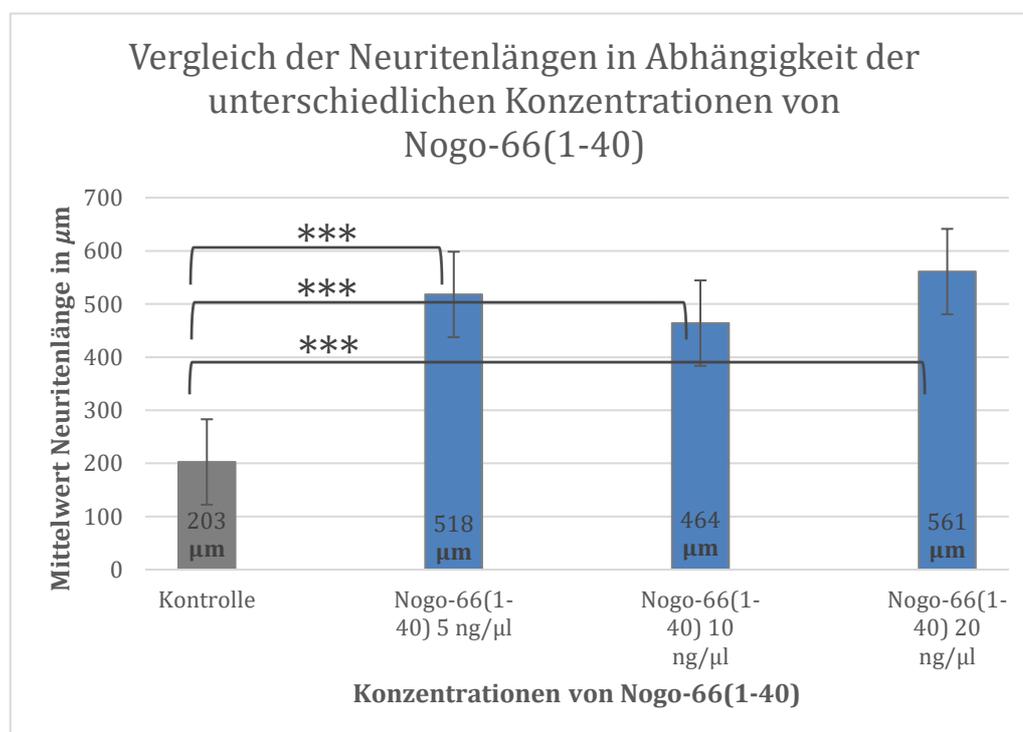


Abbildung 15 zeigt die Übersicht der durchschnittlichen Neuritenlängen, bezogen auf die unterschiedlichen Konzentrationen von Nogo-66(1-40). Zum Vergleich ganz links der Mittelwert der Kontrollreihe in grau. Es zeigt sich in jeder Nogo-66(1-40)-Konzentration ein signifikanter Längenunterschied zur Kontrollreihe (***) ($p \leq 0,001$).

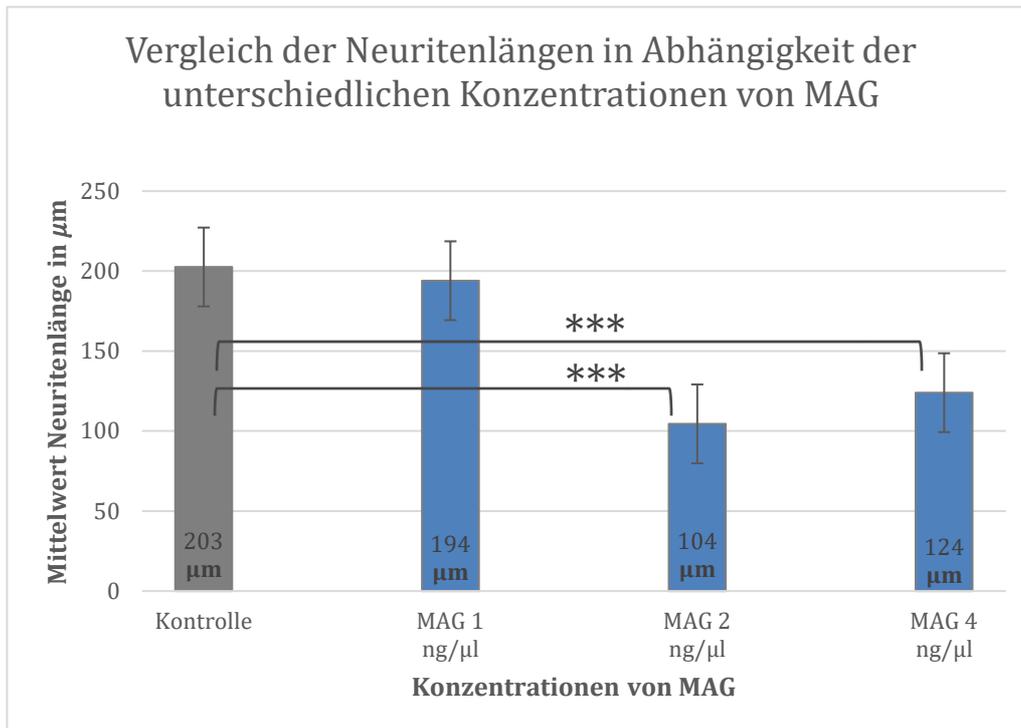


Abbildung 16 zeigt die Übersicht der durchschnittlichen Neuritenlängen, bezogen auf die unterschiedlichen Konzentrationen von MAG. Zum Vergleich ganz links der Mittelwert der Kontrollreihe in grau. Es zeigt sich ein signifikanter Längenunterschied in der MAG-Konzentration von 4 ng/ μl sowie in der Konzentration von 2 ng/ μl (***) ($p \leq 0,001$). Die Konzentration von 1 ng/ μl zeigt einen nicht signifikanten Längenunterschied der Neuriten verglichen zu der Kontrollreihe.

Unter Zugabe von MAG zu der SGN-Kultur wurde die Rezeptoraktivierung des NgR initiiert. Hieraus folgte die Hemmung des Neuritenwachstums bezogen auf die Länge der Neuriten, welche bei zwei Konzentrationen eine signifikante Längenreduktion zum Signifikanzniveau von $\leq 1\%$ verglichen mit der Kontrollreihe hervorbrachte. Bei der Faktorenzugabe von MAG lag bei den Konzentrationen von 4 ng/ μl und 2 ng/ μl ein signifikant verkürztes Längenwachstum verglichen mit der Kontrolle vor (Abbildung 16). Bei der Konzentration von 4 ng/ μl zeigten die Neuriten eine durchschnittliche Länge von 124 μm , bei der Konzentration von 2 ng/ μl eine durchschnittliche Länge von 104 μm . Somit wuchsen die Neuriten maximal 89 μm weniger weit aus, als die Neuriten der Kontrollkultur (diese durchschnittlich mit einer Länge von 203 μm). Die Testreihe mit der MAG-Konzentration von 1 ng/ μl (durchschnittliche Länge von 194 μm) zeigte keine signifikante Abstufung zu den Mittelwerten der Kontrolle zum Signifikanzniveau von $\leq 5\%$. Die deutlichste Längenreduktion der Neuriten wurde bei einer Konzentration von MAG mit 2 ng/ μl erzielt (Abbildung 17). Die maximale Differenz brachte ein über das fünffache größeres Längenwachstum der Neuriten der Nogo-66(1-40)-Reihe mit der Konzentra-

tion 20 ng/ μl (Längendurchschnitt 561 μm) im Gegensatz zu den Neuriten der MAG-Reihe mit einer Konzentration von 2 ng/ μl (Längendurchschnitt 104 μm).

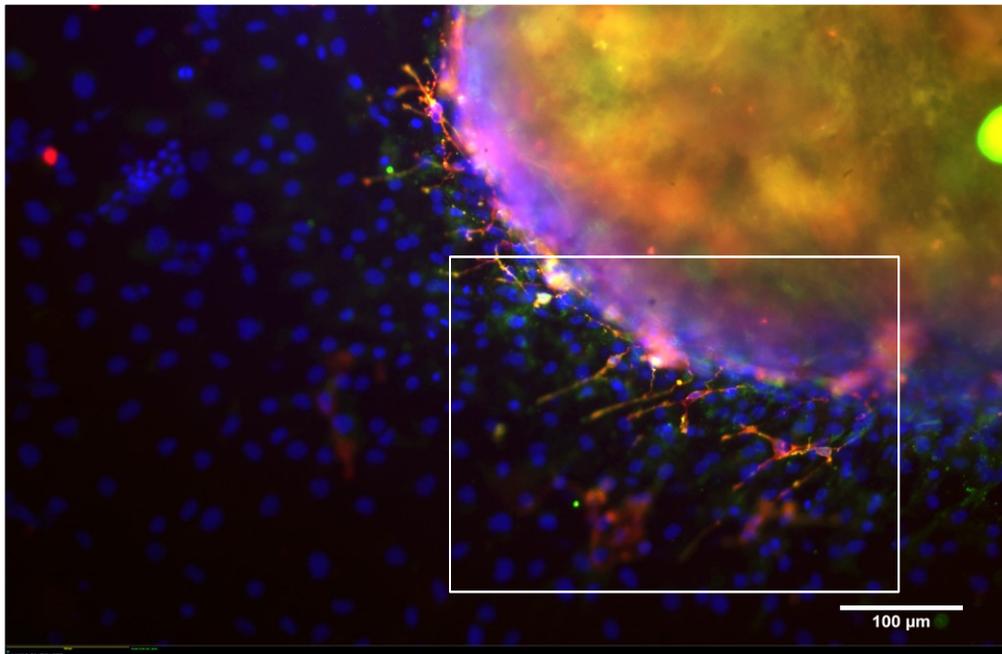


Abbildung 17 a

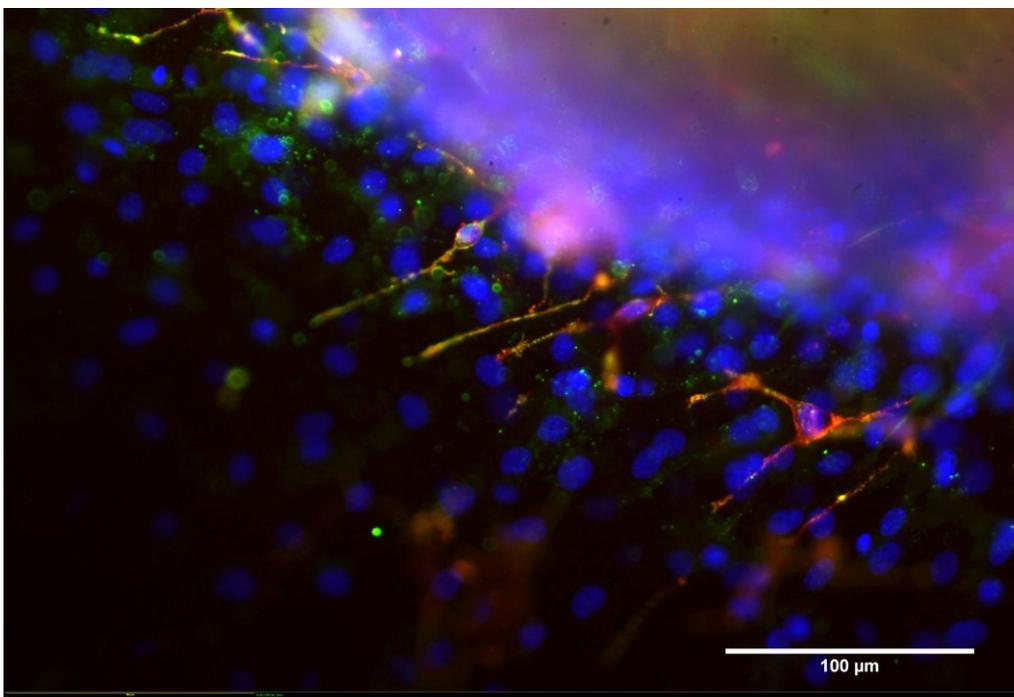


Abbildung 17 b

Abbildung 17 a/b: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von MAG (2 ng/ μl) zu dem Nährmedium; nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildungen zeigen die signifikante Längenreduktion nach Rezeptoraktivierung via MAG. **Abb. a** zeigt die Übersicht des Explantates, **Abb. b** zeigt das Neuritenwachstum in einer größeren Vergrößerung. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Im Gegensatz zu der erhöhten Faszikulation unter Nogo-66(1-40)-Einfluss erbrachte die Zugabe von MAG eine reduzierte Neuritendichte. Es wuchsen nur noch einzelne, deutlich kürzere Neuriten aus und auch die Faszikulation der Neuriten reduzierte sich. Es konnten allenfalls nur noch einzelne Vernetzungen unter den Nervenfasern abgegrenzt werden, da es primär auch nur noch zu einer geringen Neuritenanzahl kam. Zudem reduzierte sich auch die Anzahl der peripheren Filopodien an den Wachstumskegeln auf ein Minimum (Abbildung 18, siehe Pfeilmarkierung).

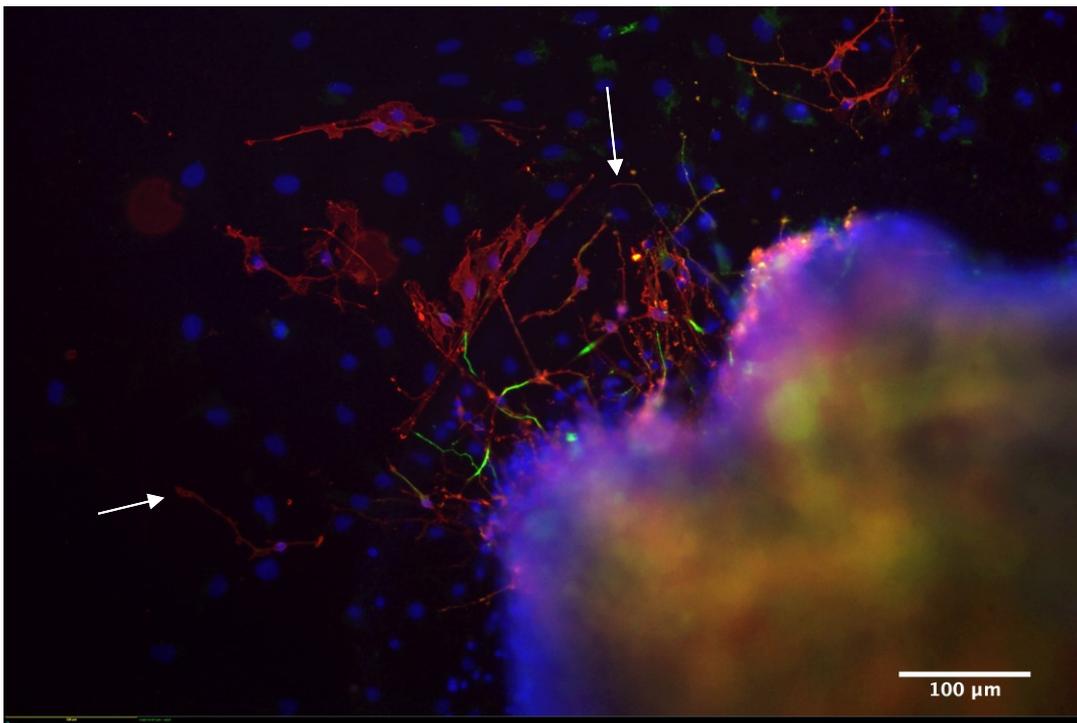


Abbildung 18: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von MAG (4 ng/ μ l) zu dem Nährmedium; nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt die deutlich weniger ausgeprägten Quervernetzungen sowie die fast nicht mehr vorhandenen peripheren Ausläufer der distalen Neuriten (Pfeile) im Vergleich zu der Nogo-66(1-40)-Reihe. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Zu der SGN-Kultur der Kontrolle wurde weder Nogo-66(1-40) noch MAG hinzugegeben, der NgR wurde also weder blockiert noch aktiviert. Die Kontrolle diente dem Vergleich und als Referenzwert für die gemessenen Neuritenlängen. Der Mittelwert der Neuritenlänge lag bei 203 μ m (Abbildung 15, Abbildung 16). Die Dichte des Neuritenwachstums, bzw. die Faszikulation der Neuriten in der Kontrollreihe lag ebenfalls ungefähr zwischen dem Dichtewachstum bei der Nogo-66(1-40)-Reihe und zwischen dem weniger dichten Wachstum bei der MAG-Reihe (Abbildung 19). Eine relevante Zu- oder Abnahme der peripheren Filopodien ließ sich nicht feststellen.

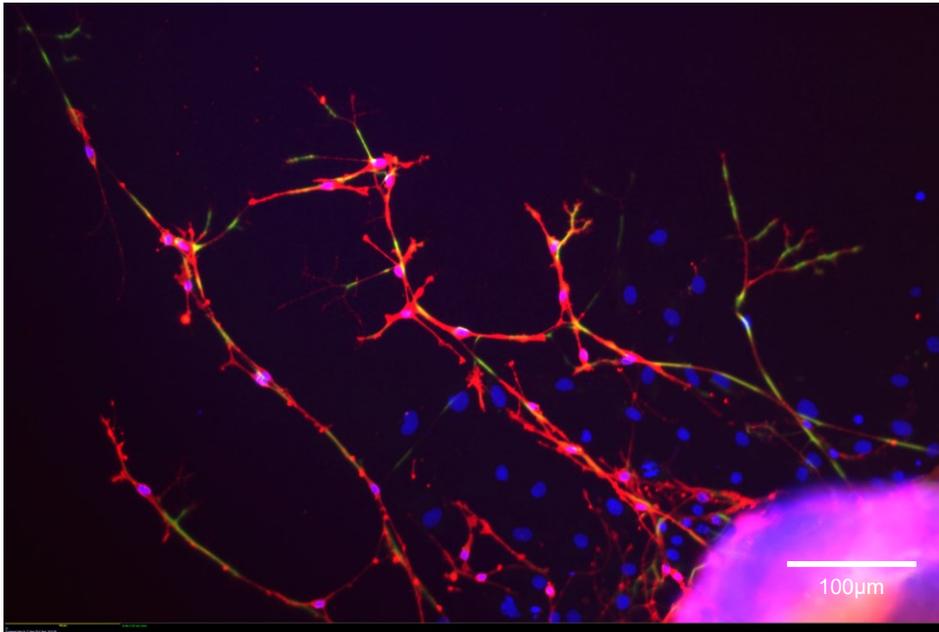


Abbildung 19: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus ohne Zugabe zu dem Nährmedium; nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung. Die Abbildung zeigt die Dichte des Neuritenwachstum ohne Blockade oder Aktivierung des NgR. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

3.2.2 Verhältnis der Schwanzzellen zu den Zellkernen

Bei der Zugabe von Nogo-66(1-40) zu der SGN-Kultur wurde der NgR blockiert. Unter dieser Blockade zeigte sich neben dem vermehrten Längenwachstum der Neuriten auch eine vermehrte Proliferation von unreifen, p75NTR-positiven, nicht-myelinisierenden Schwanzzellen (Abbildung 20).

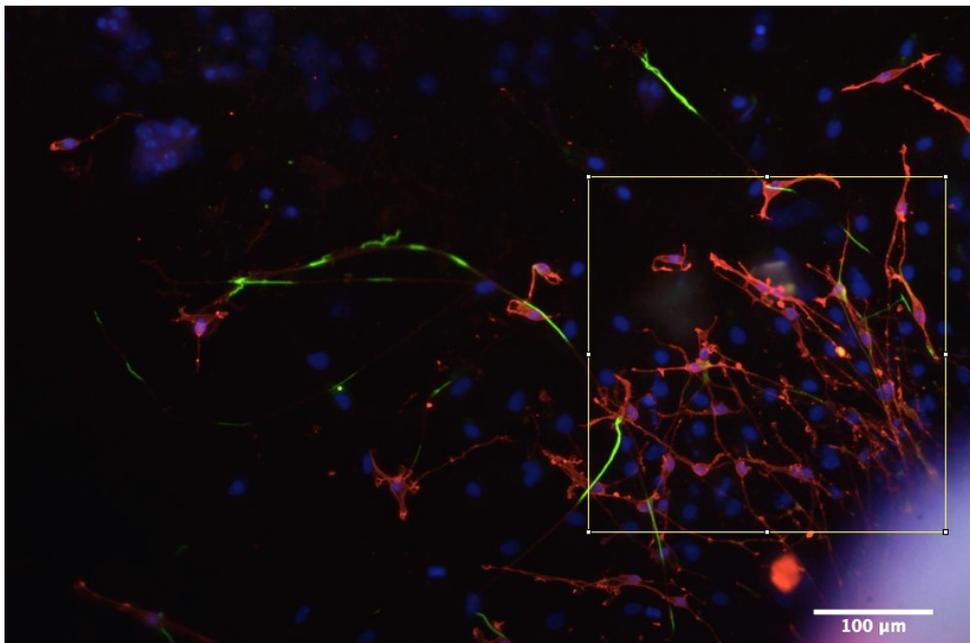


Abbildung 20: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von Nogo-66(1-40) mit der Konzentration 20 ng/μl. Die Abbildung diente beispielhaft der Auszählung der Schwanzzellen in dem vorgegebenen Messfeld nach Blockade des NgR. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Die insgesamt 18 Präparate der Nogo-66(1-40)-Reihe erbrachten nach Auszählung der vorher festgelegten Messfelder insgesamt 848 Zellkerne. Hiervon wurden insgesamt 354 Zellkerne den p75NTR-positiven Schwannzellen zugeordnet. Um die Auswirkung der verschiedenen Konzentrationen von Nogo-66(1-40) auf die Schwannzellproliferation zu beurteilen, wurde der prozentuale Schwannzellanteil an allen Zellen in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration der Nogo-66(1-40)-Reihe berechnet. Die Messreihe mit der Nogo-66(1-40) von 20 ng/ μ l ergab hierbei insgesamt 315 ausgezählte Zellen bei fünf Präparaten. 101 Zellen wurden als Schwannzellen identifiziert (32 %). Die Messreihe mit einer Konzentration von 10 ng/ μ l Nogo-66(1-40) erbrachte 223 Zellkerne auf fünf Präparaten. 97 Zellen waren hiervon Schwannzellen. Somit ergab sich ein prozentualer Anteil von 43% Schwannzellen an allen Zellen. Die Nogo-66(1-40)-Messreihe mit einer Konzentration von 5 ng/ μ l erbrachte 310 Zellkerne auf acht Präparaten. 156 Zellen wurden Schwannzellen zugeordnet. Folglich waren 50% der vorhandenen Zellen Schwannzellen (Abbildung 21). Alle Nogo-66(1-40)-Konzentrationen zeigten ein signifikant vermehrtes Schwannzellwachstum verglichen mit der Kontrollreihe nach Auswertung des t-Testes für unabhängige Stichproben. Die Nogo-66(1-40)-Konzentrationen 5 ng/ μ l und 10 ng/ μ l erreichten eine signifikante Erhöhung der Schwannzelldichte zum Signifikanzniveau von $\leq 1\%$. Die Nogo-66(1-40)-Konzentration von 20 ng/ μ l erreichte eine Erhöhung der Schwannzelldichte zum Signifikanzniveau von 1%. Ein signifikanter Unterschied in der Schwannzelldichte zwischen den einzelnen Nogo-66(1-40)-Konzentrationen war nicht nachweisbar.

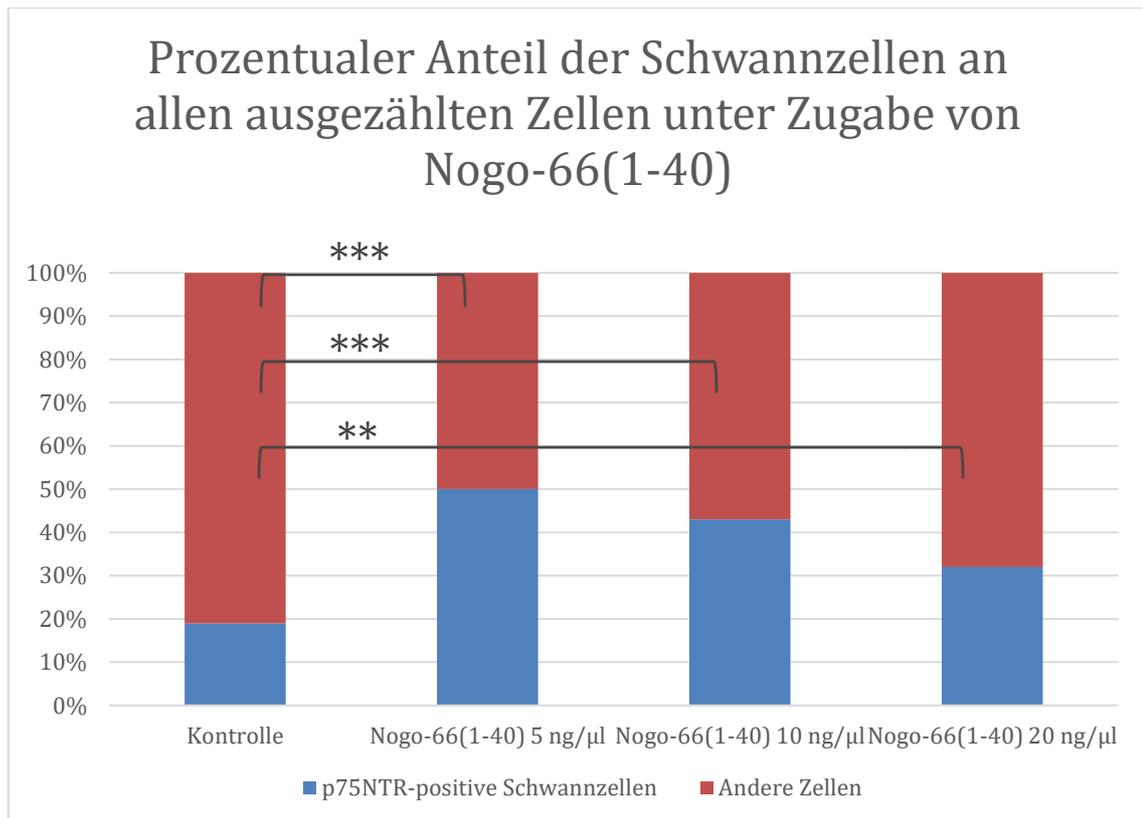


Abbildung 21 zeigt ein Säulendiagramm mit der Darstellung des prozentualen Anteils der p75NTR-positiven Schwanzzellen an allen Zellen unter Einfluss von Nogo-66(1-40) in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei der Auszählung wurden die unterschiedlichen Konzentrationen von Nogo-66(1-40) berücksichtigt und der prozentuale Anteil der Schwanzzellen zum Vergleich nebeneinander aufgeführt. (** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, verglichen mit der Kontrolle).

Unter Zugabe von MAG als Aktivator zu der SGN-Kultur zeigte sich nach Aktivierung des NgR nicht nur eine deutliche Längenreduktion der Neuriten, sondern teilweise auch eine verminderte Proliferation der p75NTR-positiven Schwanzzellen (Abbildung 22). Für die Auszählung der Präparate unter Zugabe von MAG wurden insgesamt 16 Präparate verwendet. Diese erbrachten insgesamt 798 Zellkerne. Den 798 Zellkernen wurden insgesamt 140 p75NTR-positiven Schwanzzellen zugeordnet. Es wurde der Schwanzzellanteil in Abhängigkeit von der MAG-Konzentration berechnet. Bei einer Konzentration von 4 ng/µl wurden fünf Präparate ausgezählt. Hierbei ergaben sich 256 Zellkerne. Davon waren insgesamt 64 Schwanzzellen. Es zeigte sich ein prozentualer Schwanzzellanteil von 25% an allen Zellen. Die Konzentration von 2 ng/µl MAG erbrachte 279 Zellkerne auf sechs Präparaten, davon 33 Schwanzzellen. Es ergab sich ein Anteil von 12% Schwanzzellen. Bei der Konzentration von MAG mit 1 ng/µl wurden aus fünf Präparaten insgesamt 263 Zellkerne ausgezählt. Davon wurden 43 Zellkerne Schwanzzellen

zugeordnet. Es errechnete sich ein prozentualer Anteil von 16% Schwanzzellen an allen Zellen (Abbildung 23).

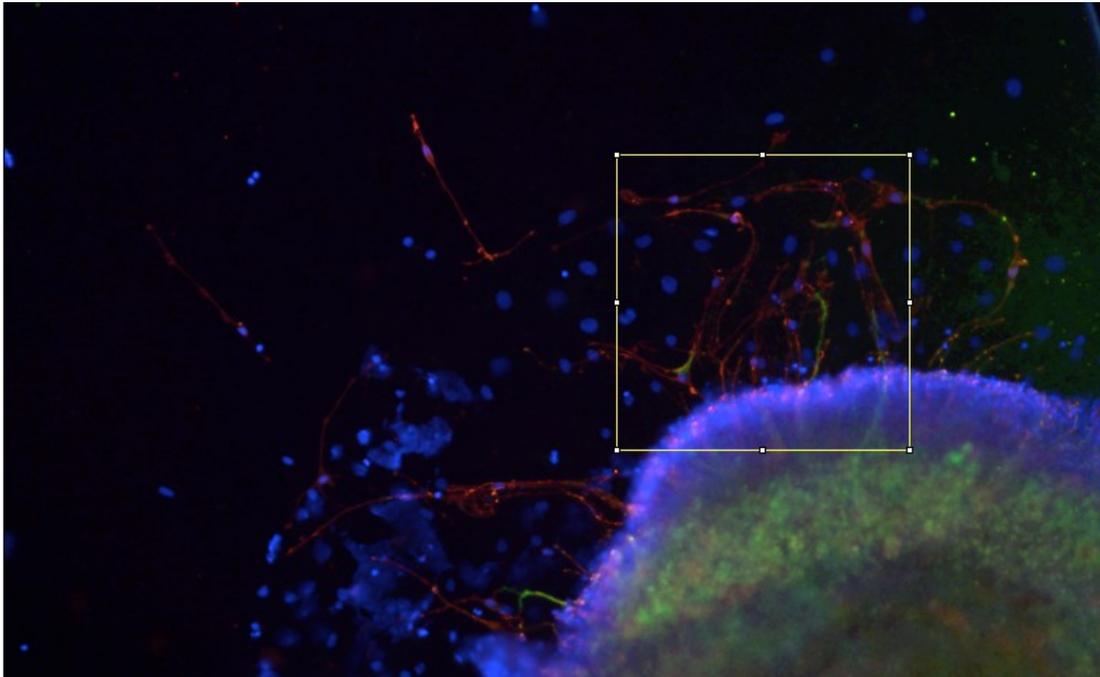


Abbildung 22: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von MAG mit der Konzentration 4 ng/ μ l. Die Auszählung der Schwanzzellen erfolgte in dem vorgegebenen Messfeld. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

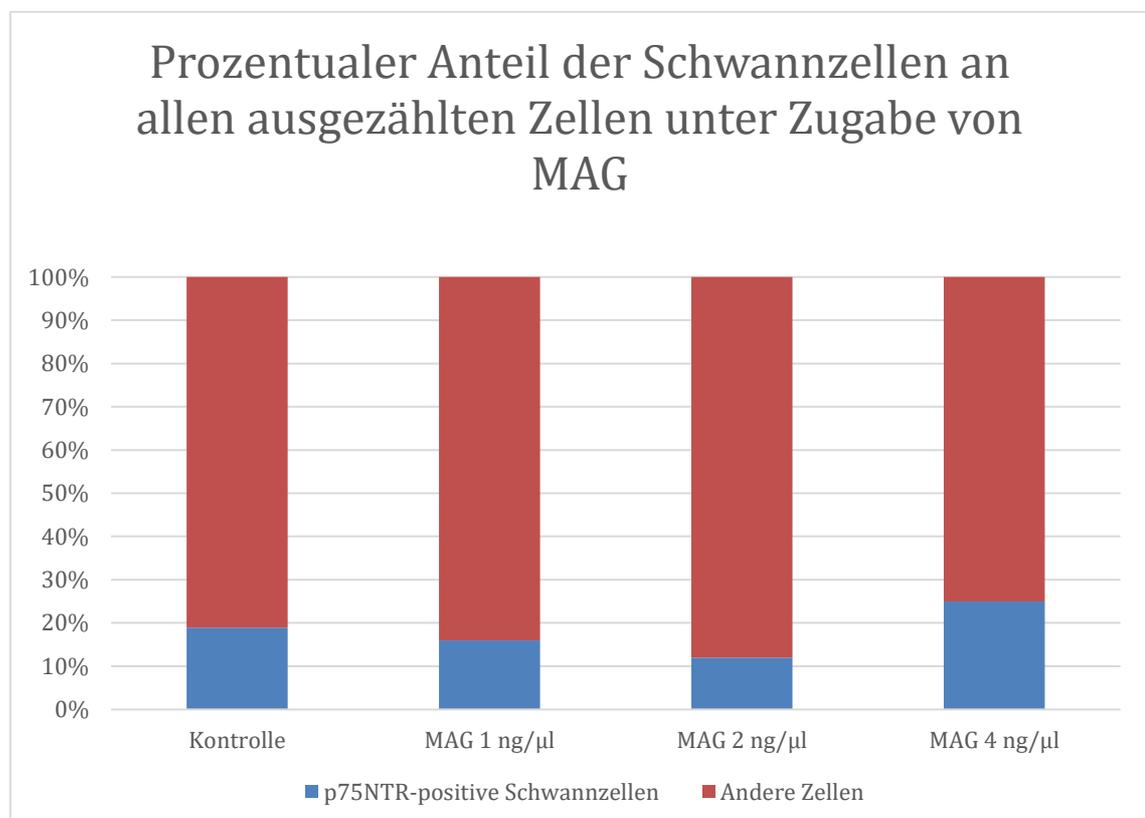


Abbildung 23 zeigt ein Säulendiagramm mit der Darstellung des prozentualen Anteils der p75NTR-positiven Schwanzzellen an allen Zellen unter Einfluss von MAG in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei der Auszählung wurden die unterschiedlichen Konzentrationen von MAG berücksichtigt und der prozentuale Anteil der Schwanzzellen zum Vergleich nebeneinander aufgeführt.

Bei der Kontrollreihe ohne Zugabe von MAG/Nogo-66(1-40) wurden elf Präparate verwendet. Abbildung 24 zeigt das Proliferationsverhalten der Schwannzellen unter Kontrollbedingungen. Es wurden insgesamt 671 Zellkerne ausgezählt, davon wurden 127 Zellkerne p75NTR-positiven Schwannzellen zugeordnet. Hieraus ergab sich ein prozentualer Anteil von 19% Schwannzellen an allen vorhandenen Zellen. Im Durchschnitt liegt der errechnete, prozentuale Anteil der p75NTR-positiven Schwannzellen somit zwischen dem durchschnittlichen Wert unter Nogo-66(1-40)-Einfluss und unter MAG-Einfluss, hier bei den Konzentrationen von 1 ng/ μ l und 2 ng/ μ l. Insgesamt konnte nach Auswertung des t-Testes für unabhängige Stichproben keine signifikante Verminderung der Schwannzellendichte unter MAG-Einfluss zum Signifikanzniveau von 5% nachgewiesen werden. Insbesondere die Konzentrationen von 2 ng/ μ l, bei der auch die deutlichste Reduktion der Neuritenlänge auftrat, zeigte lediglich eine Tendenz zu einer Reduktion der Schwannzellen nach Rezeptoraktivierung. Ein signifikanter Unterschied der Schwannzellendichte zwischen den einzelnen MAG-Konzentrationen konnte ebenfalls nicht gezeigt werden.

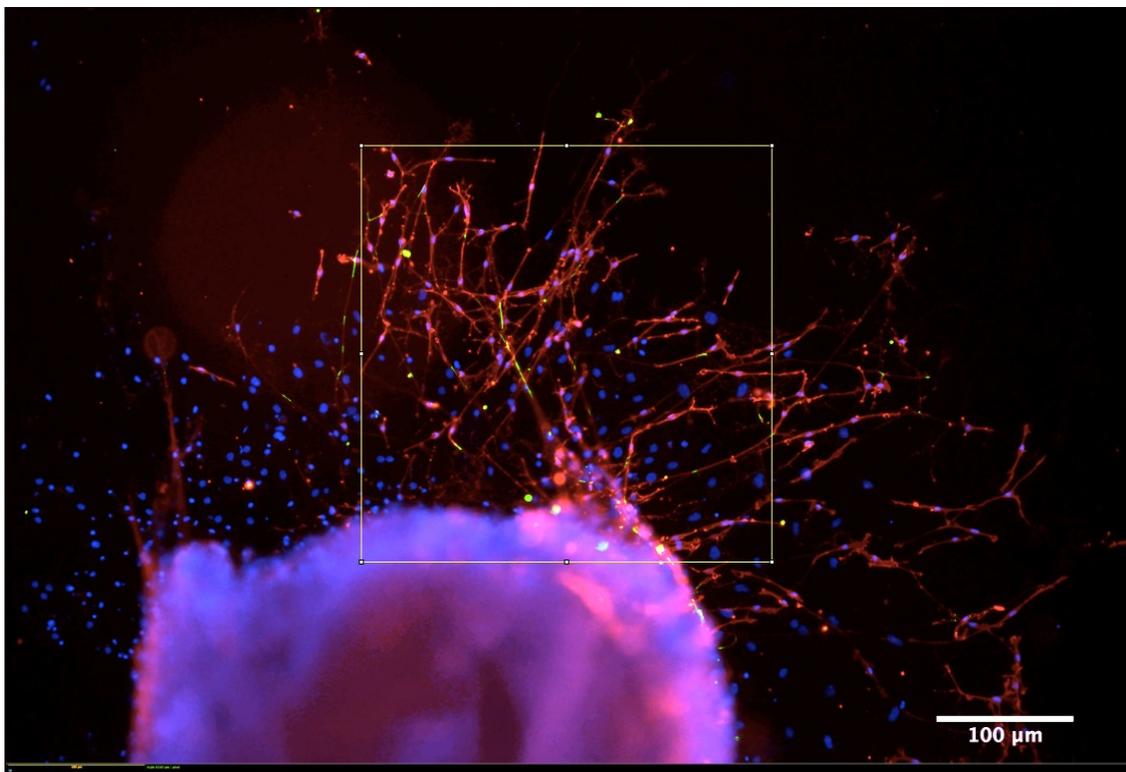


Abbildung 24: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus ohne Zugabe von Nogo-66(1-40)/MAG. Die Abbildung diente beispielhaft der Auszählung der Schwannzellen in dem vorgegebenen Messfeld ohne Aktivierung oder Blockade des Ngr. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

3.2.3 Migrationsweite der Schwannzellen

Während sich unter Rezeptorblockade via Nogo-66(1-40) bereits ein vermehrtes Neuritenwachstum sowie eine erhöhte Anzahl an Schwannzellen gezeigt hatte, wurde außerdem die Migrationsweite der Schwannzellen untersucht. Ebenfalls im Rahmen der drei verschiedenen Versuchsreihen unter Einfluss von Nogo-66(1-40), MAG und ohne Zugabe von Nogo-66(1-40)/MAG. Für die Untersuchung der Migrationsweite unter Zugabe von Nogo-66(1-40) wurden insgesamt 18 Präparate verwendet. Es wurde jeweils die Migrationsweite der am weitesten peripher gelegenen, p75NTR-positiven Schwannzelle gemessen und anschließend alle Messwerte addiert (Abbildung 25). Es wurde jeweils der direkte Weg von dem Explantatrand bis zu der am weitesten peripher gelegenen Schwannzelle in μm gemessen.

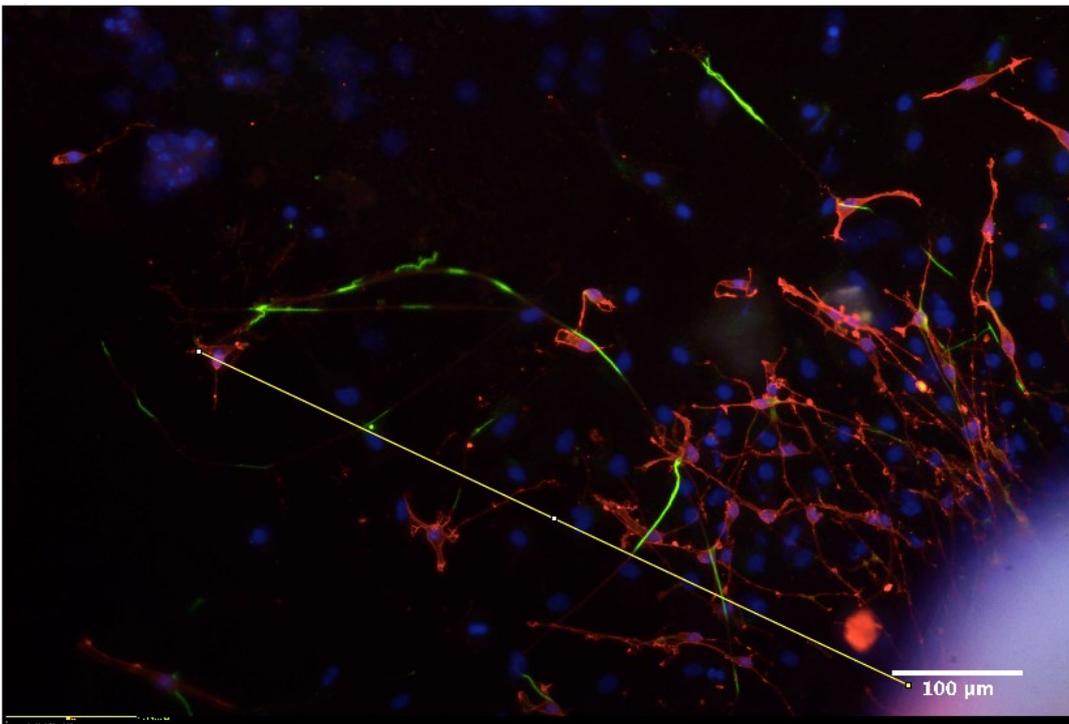


Abbildung 25: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von Nogo-66(1-40) mit der Konzentration 20 ng/ μl . Die Abbildung diente beispielhaft der Messung der Migrationsweite der Schwannzellen nach Blockade des NgR. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Berücksichtigt man die unterschiedlichen Konzentrationen von Nogo-66(1-40) ergibt sich für die Konzentration von 20 ng/ μl mit fünf untersuchten Präparaten, welche unter anderem auch die längsten Neuriten hervor brachte, auch die größte Migrationsweite der p75NTR-positiven Schwannzellen von durchschnittlich 550,7 μm . Die Konzentration von Nogo66(1-40) mit 10 ng/ μl bei fünf berücksichtigten Präparaten brachte durchschnittlich die geringste Migrationsweite mit 461,4 μm , analog zu der Neuritenlänge unter dieser Konzentration, welche eben-

falls am geringsten auswachsen. Die Migrationsweite der Schwannzellen von $517,2 \mu\text{m}$ im Durchschnitt bei insgesamt acht Präparaten unter der Nogo-66(1-40)-Konzentration von $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ lag hierbei zwischen den anderen beiden Messwerten. Unter Berücksichtigung der Konzentrationen fand sich die geringste Migrationsweite mit $185,8 \mu\text{m}$ bei einer MAG-Konzentration von $2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bei insgesamt sechs verwendeten Präparaten; hier ebenfalls analog zu dem Neuritenwachstum, das bei gleicher Konzentration die geringste Neuritenlänge hervorbrachte. Genau so zeigte sich die größte Migrationsweite mit $364,2 \mu\text{m}$ unter Berücksichtigung von fünf Präparaten bei einer MAG-Konzentration von $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$; vergleichend hierzu wies MAG die geringste Wachstumshemmung der Neuriten bei gleicher Konzentration auf. Hierbei lag die durchschnittliche Migrationsweite der Schwannzellen über den Werten der Kontrollreihe, abgesehen von den Werten bei einer MAG-Konzentration von $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Zwischen beiden Werten lag die Migrationsweite der Schwannzellen mit der Konzentration von MAG mit $4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bei durchschnittlich $291,4 \mu\text{m}$ unter Berücksichtigung von fünf Präparaten (Abbildung 26).

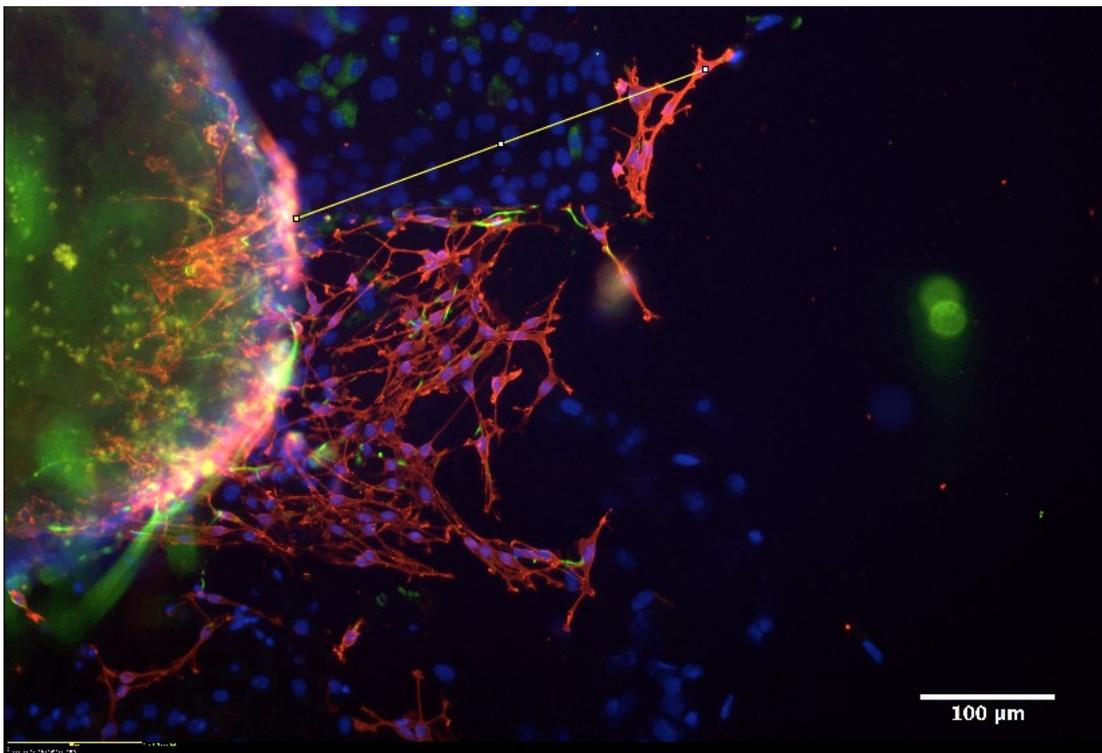


Abbildung 26: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus unter Zugabe von MAG mit der Konzentration $4 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Die Abbildung diente beispielhaft der Messung der Migrationsweite der Schwannzellen nach Aktivierung des NgR. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Vergleichend zu den Messreihen unter Nogo-66(1-40) und unter MAG-Einfluss wurden bei der Kontrollreihe insgesamt elf Explantate untersucht, welche durch Addition aller maximalen Migrationsweiten der p75NTR-positiven Schwanzzellen einen Wert von 3246,4 μm hervorbrachten. Hieraus ergab sich eine durchschnittliche Migrationsweite der Schwanzzellen von 295,1 μm (Abbildung 27).

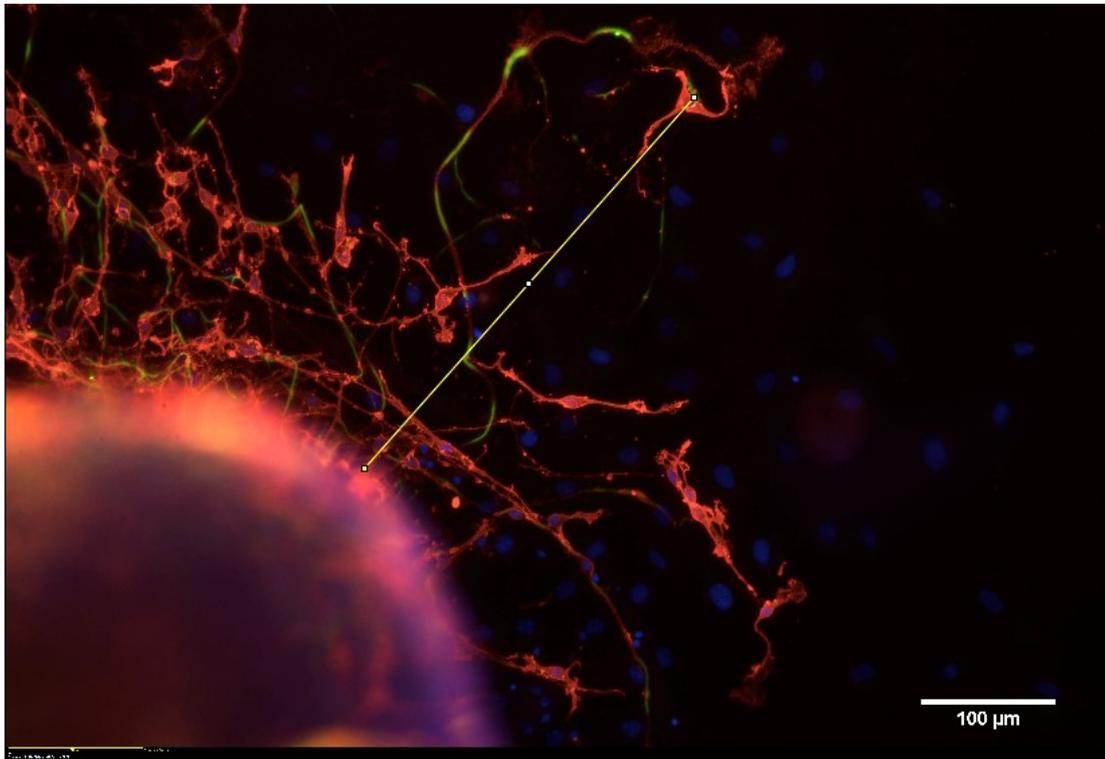


Abbildung 27: SGZ-Kultur der neugeborenen Maus ohne Zugabe von Nogo-66(1-40)/MAG. Die Abbildung diente beispielhaft der Messung der Migrationsweite der Schwanzzellen ohne Aktivierung oder Blockade des NgR. (β -III-tubulin = grün, p75NTR = rot, DAPI = blau).

Wie bei der Untersuchung des Verhältnisses von Schwanzzellen zu den Zellkernen wurde auch hier ein deutlich ausgeprägteres Migrationsverhalten der Gliazellen unter Einfluss von Nogo-66(1-40) sichtbar. Der Durchschnittswert unter Nogo-66(1-40) lag mit 511,2 μm deutlich über dem der Kontrolle mit 295,1 μm ; der Durchschnittswert unter Einfluss von MAG mit 274,6 μm lag mit weniger deutlichem Abstand darunter. Nach Auswertung des t-Testes für unabhängige Stichproben konnte für alle Nogo-66(1-40)-Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der Migrationsweite der Schwanzzellen verglichen mit der Kontrollreihe nachgewiesen werden. Die Nogo-66(1-40)-Konzentration von 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verbesserte die Migrationsweite hierbei zum Signifikanzniveau von 1%, die Nogo-66(1-40)-Konzentrationen von 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ und 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ zum Signifikanzniveau von 5%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen von Nogo-66(1-40) konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 28 a). Nach Rezeptoraktivie-

rung via MAG konnte durch den t-Test für unabhängige Stichproben keine signifikante Reduktion der Migrationsweite der Schwanzzellen zum Signifikanzniveau von 5% nachgewiesen werden. Auch hier konnten nur zwei MAG-Konzentrationen (2 ng/ μ l und 4 ng/ μ l) Werte erzielen, die unterhalb den Werten der Kontrollreihe lagen und somit eine Tendenz zur Reduktion der Migrationsweite der Schwanzzellen nach Rezeptoraktivierung geben (Abbildung 28 b).

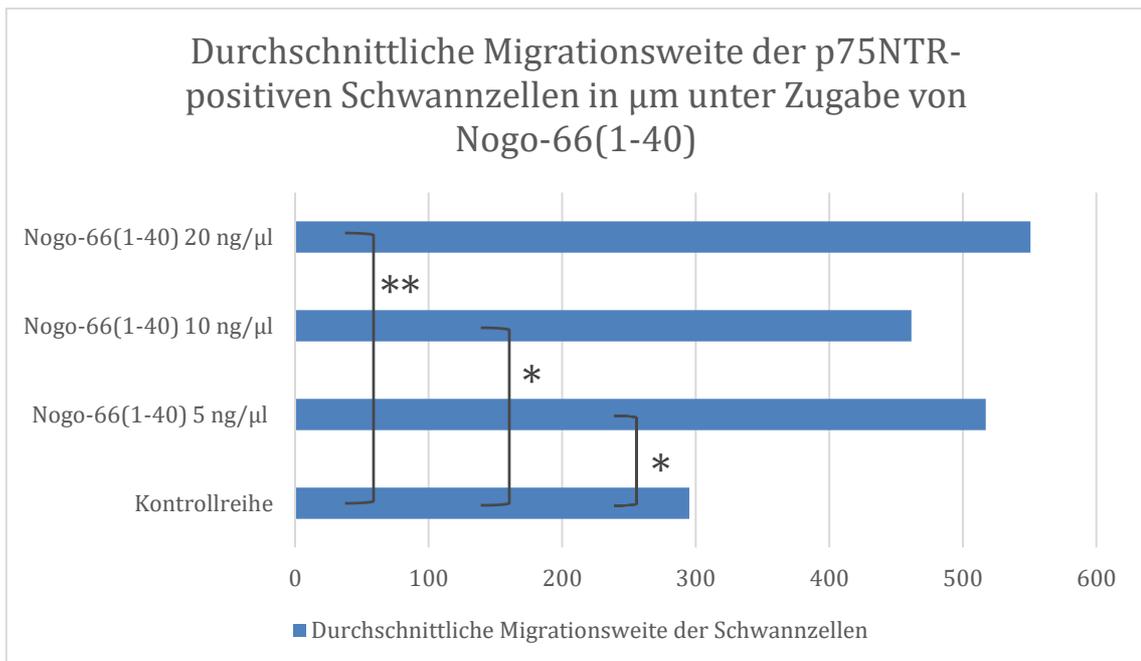


Abbildung 28 a

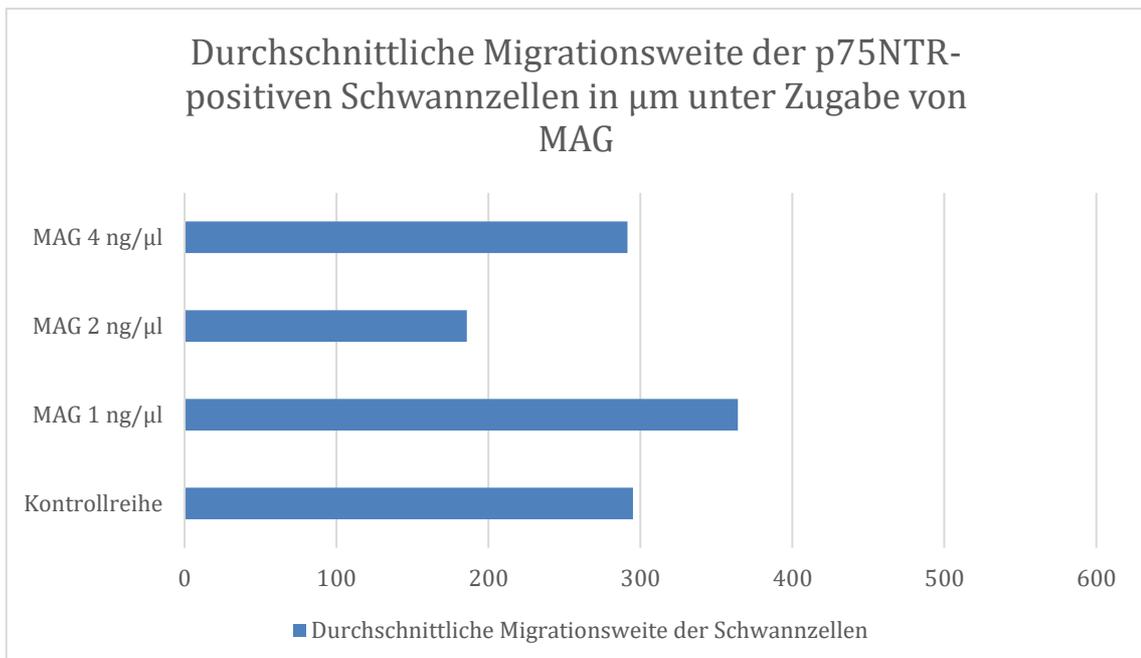


Abbildung 28 b

Abbildung 28 a/b zeigt jeweils ein Balkendiagramm, welches die durchschnittliche Migrationsweite der Schwanzzellen unter den verschiedenen Testbedingungen darstellt. Es wird die durchschnittliche Migrationsweite der Schwanzzellen in μ m dargestellt. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, verglichen mit der Kontrolle).

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter Zugabe von Nogo-66(1-40) zur Rezeptorblockade zeigte sich zusammenfassend das längste Neuritenwachstum mit einer deutlichen Vermehrung der peripheren Filopodien an den Wachstumskegeln der Neuriten sowie die höchste Schwanzzellichte mit der größten Migrationsweite der Schwanzzellen. Das längste Neuritenwachstum sowie die größte Schwanzzell-Migrationsweite konnte hierbei mit einer Nogo-66(1-40)-Konzentration von 20 ng/ μ l nachgewiesen werden. Bei der Messung des prozentualen Anteils der Schwanzzellen an allen Zellen zeigte sich die höchste Schwanzzellichte bei einer Nogo-66(1-40)-Konzentration von 5 ng/ μ l, bei der korrelierend nur das zweitlängste Neuritenwachstum nachgewiesen werden konnte. Unter Betrachtung der einzelnen Konzentrationsreihen von Nogo-66(1-40) ließ sich lediglich ein signifikanter Unterschied in der Neuritenlänge zwischen den Nogo-66(1-40)-Konzentrationen von 10 ng/ μ l und 20 ng/ μ l nachweisen. Innerhalb der Testreihen zum Schwanzzellwachstum konnte dieser Unterschied zwischen den Konzentrationen nicht mehr nachvollzogen werden. Somit sind die Schwankungen innerhalb der Konzentrationsreihen bei fehlender Signifikanz als vernachlässigbar zu werten.

Unter Zugabe von MAG in einer Konzentration von 2 ng/ μ l zur Rezeptoraktivierung trat das geringste Neuritenwachstum mit verminderter Anzahl an peripheren Filopodien sowie die niedrigste Schwanzzellichte mit der geringsten Migrationsweite auf. Hierbei war jedoch ein signifikanter Einfluss der Rezeptoraktivierung nur auf das Neuritenwachstum nachweisbar. Der Einfluss von MAG auf das Schwanzzellwachstum konnte unter den vorliegenden Testbedingungen keine signifikanten Ergebnisse liefern, zeigte aber eine schwache Tendenz zu einer Reduktion der Anzahl und der Migrationsweite unter Rezeptoraktivierung.

4 Diskussion

4.1 Expression des Nogo-Rezeptors im Innenohr

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des NgR in Cryoschnitten der Maus bis zum Alter von vier Monaten untersucht. Zusammenfassend zeigte sich hier eine deutliche Expression des NgR vor allem innerhalb der Spiralganglionneurone und den Neuriten, aber auch im Bereich des Cortiorgans, hier vornehmlich im Stützzellapparat, speziell in den Deiterszellen, den Pfeilerzellen und den Hensenzellen. Einen Nachweis des Rezeptors in der Stria vascularis gelang auf Grund des Vergleiches mit der Negativkontrolle in allen Altersklassen. Durch die häufig übertriebene Signalintensität in der Stria vascularis konnte jedoch keine sichere Verlaufsbeurteilung erfolgen. Der Grund für die überschießende Signalgebung bei diesen Explantaten war am ehesten eine Anfärbung benachbarter Strukturen. Somit konnte auf Grund der unspezifischen Färbung in mehreren Explantaten die Expressionsrate im Verlauf der Hörentwicklung nicht ausreichend beurteilt werden. Eine sichere Expression im Bereich der inneren Haarzellen konnte nicht festgestellt werden, da auch hier zumeist eine unspezifische Markierung von benachbarten Kollagenfasern und des Ligamentum spirale erfolgte. Die NgR Expression ließ sich in jeder Altersklasse nachweisen (P2 bis P22 und vier Monate postnatal nach Abschluss der Hörentwicklung). Mit zunehmendem Alter zeigte sich eine zunehmende Rezeptordichte. Primär anatomisch bedingt ließ sich die Rezeptorexpression im Verlauf auch auf die einzelnen Zellen des Stützzellapparates spezifizieren. Für den Nachweis des NgR im Innenohr gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen. Eine vergleichbare Studie von Caelers et al behandelt den Nachweis der Rezeptor-mRNA sowie der mRNA von Nogo-A im Innenohr der Ratte über eine RT-PCR. Hierzu wurden Ratten im postnatalen Alter von zwei bis fünf Tagen untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen mRNA Nachweis für Nogo-A, -B, -C und den NgR im Cortiorgan, im Spiralganglion und in der Stria vascularis der neugeborenen Ratten. Eine immunhistochemische Färbung der Cochlea mit dem Nogo-A-Antikörper zeigte eine Signalgebung im Spiralganglion, dem Cortiorgan und hier speziell in den Haarzellen. Die Immunhistochemie mit dem NgR-Antikörper wies eine Signalgebung im Spiralganglion auf [51].

Zunächst zeigten die vorliegenden Ergebnisse der Arbeit, dass die Expression des NgR im Innenohr mit seiner Lokalisation in den Neuronen und Neuriten Parallelen zu der Expression im ZNS aufweist, wo der Rezeptor in gleicher Lokalisation nachgewiesen wurde [43]. Die Ergebnisse der Studie, welche die mRNA des NgR in Ratten im postnatalen Alter von zwei bis fünf Tagen nachgewiesen hat, wiesen eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit auf, hier sowohl bezogen auf die Lokalisation des Rezeptors als auch auf den Nachweis des NgR in der frühen Phase der Hörentwicklung (P2 bis P5). Weiterführend erbrachten die vorliegenden Ergebnisse auch den Nachweis des NgR bei Mäusen in der anschließenden Entwicklungsperiode (P6 bis P22) sowie in einem postnatalen Alter von vier Monaten nach Abschluss der Hörentwicklung. Die Expressionsanalysen dieser Arbeit bestätigten die Lokalisation im Spiralganglion, in der Stria vascularis und im Cortiorgan und zeigten zudem insbesondere das Vorkommen des NgR im Stützzellapparat.

Die Stützzellen stellen für die auditiven Rezeptorzellen im Hörorgan zunächst ein mechanisches Gerüst mit Haltefunktion als sichere Umgebung dar. Des Weiteren bilden sie über *gap junctions* Verbindungen mit ihrer Umgebung und insbesondere mit den Haarzellen aus. Neben der Ausbildung des typischen Zellaufbaus im Cortiorgan haben sie somit weitere Aufgaben, wie beispielsweise die Regulation des ionischen und molekularen Gleichgewichts oder die Beeinflussung von synaptischen Verknüpfungen über die Ausschüttung von verschiedenen Faktoren. Insbesondere wird auch eine Ähnlichkeit der Stützzellen zu den Gliazellen im ZNS beschrieben, da diese ebenfalls synaptische Endigungen umgeben und die Aktivität sowie Ausbildung von synaptischen Verbindungen teilweise regulieren [54]. Zudem können auch Genmutationen, welche die Stützzellen betreffen, eine Schwerhörigkeit auslösen [54]. Bei beispielsweise Vögeln haben die Stützzellen einen stammzellähnlichen Charakter und können die Haarzellen nach Schädigung über eine sogenannte Transdifferenzierung ein Leben lang neu generieren [55].

Die Funktion des NgR in den Stützzellen mit ihren Verbindungen zu den Haarzellen könnte somit eine unterdrückende Wirkung sein zur Vermeidung einer überschießenden Regeneration und einer Zellwucherung nach Schädigung der Sinneszellen. Dies würde einer physiologischen Funktion des NgR in den Stützzellen entsprechen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Expression des NgR in den Stützzellen lediglich ein Ausdruck ihrer Verwandtschaft, bzw. ihrer Ähnlichkeit zu vergleichbaren Zellen, hier z.B. den Gliazellen im ZNS ist. Ob der NgR dann zusätz-

lich auch eine vergleichbare Funktion wie die Gliazellen hat, welche maßgeblich für die Unterdrückung der Nervenregeneration zuständig sind, bleibt noch unklar. Bei einer Hörminderung oder Taubheit werden primär die Haarzellen und sekundär auch die Neuriten geschädigt. Daher sollte auch die Funktion des NgR im Bereich der Stützzellen mit ihrer engen Verbindung zu den Haarzellen weiter erforscht werden, um letztendlich nicht nur das Neuritenwachstum auf der Seite der Spiralganglienneurone, sondern auch die Regeneration der Sinneszellen im Cortiorgan fördern zu können.

4.1.1 Die organotypische Spiralganglienneuronenkultur

4.1.1.1 Wachstumsverhalten der Nervenfasern

Nach der Inhibition des Nogo-Systems innerhalb der Kultur via Nogo-66(1-40) zeigte sich eine signifikante Längenzunahme der Nervenfasern verglichen mit der Kontrollkultur ohne die Zugabe von Nogo-66(1-40). Das ausgeprägteste Neuritenwachstum zeigte sich unter der Nogo-66(1-40)-Konzentration von 20 ng/ μ l. Das geringste Neuritenwachstum war bei einer Nogo-66(1-40)-Konzentration von 10 ng/ μ l nachweisbar. Die Werte der Neuritenlängen unter der Nogo-66(1-40)-Konzentration von 5 ng/ μ l lagen hierbei zwischen den Ergebnissen der anderen beiden Konzentrationen. Der Einbruch des Neuritenwachstums bei 10 ng/ μ l lässt sich hier durch zwei unterschiedliche Ansätze erklären. Zum einen könnte sich dies auf eine gesättigte Rezeptorblockade schon bei der geringsten Konzentration von Nogo-66(1-40) von 5 ng/ μ l zurückführen lassen, sodass eine erhöhte Konzentration von Nogo-66(1-40) bei schon vollständiger Blockade der Rezeptoren keinen weiteren Effekt zeigen würde. Zum anderen kann es sich auch um eine physiologisch vorliegende Kapazitätsgrenze des Neuritenwachstums handeln, wodurch ein weiteres Auswachsen der Neuriten, unabhängig von einer höheren Nogo-66(1-40)-Konzentration ebenfalls nicht zu erwarten wäre. Bei beiden Ansätzen wurde folglich das Maximum des Neuritenwachstums erreicht und eine Konzentrationserhöhung des Faktors würde zu keinem weiteren Längenwachstum führen. Zudem konnten unter Einfluss von Nogo-66(1-40) deutlich vermehrte Filopodien an den Wachstumskegeln der Neuriten festgestellt werden und eine erhöhte Faszikulation der ausgewachsenen Neuriten. Vergleichend hierzu zeigte die Rezeptoraktivierung via MAG, als weiterer Ligand des NgR, ein vermindertes Neuritenwachstum mit reduzierter Faszikulation der Neuriten sowie einer deutlich

geringeren Anzahl an Filopodien im Vergleich zur Kontrolle. Die MAG-Konzentration von 1 ng/ μ l brachte hierbei jedoch weder signifikante Unterschiede im Längenwachstum der Neuriten, noch im Schwanzzellwachstum verglichen mit der Kontrollreihe hervor. Somit war die MAG-Konzentration von 1 ng/ μ l als zu niedrig einzustufen um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Studien zur Rezeptorblockade von zentralen Nervenzellen zeigten ähnliche Ergebnisse. So konnte durch die Blockade des NgR das Neuritenwachstum deutlich verbessert werden. Die Lokalisation des NgR im ZNS zeigte sich in den Neuronen und Axonen, er wurde jedoch nicht von den Oligodendrozyten exprimiert [29], [43]. In den Oligodendrozyten sowie in der inneren und äußeren Membran des Myelins ließ sich lediglich sein Ligand, Nogo-A nachweisen [29], [56]. Daher wird die Annahme der gleichen Funktionsweise des NgR im ZNS und im Innenohr dadurch unterstützt, dass in der Cochlea der Maus der Rezeptor ebenfalls in den Neuronen und Neuriten nachgewiesen wurde, also die Lokalisation des NgR an sich mit der des restlichen ZNS übereinstimmt, unabhängig von den umgebenden Gliazellen.

Auf Grund der hier gezeigten Zunahme des Neuritenlängenwachstums, welches den positiven Einfluss von Nogo-66(1-40) bestätigt, zeigt sich, dass der Unterschied der Gliazellen (Schwanzzellen versus Oligodendrozyten) im Innenohr keinen negativen Einfluss auf das Neuritenwachstum nach Rezeptorblockade hat. Stattdessen führte die Rezeptorblockade neben der Unterstützung des Längenwachstums der Neuriten gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung der Schwanzzellichte sowie der Migrationsweite der Schwanzzellen. Folglich also einem vermehrten Schwanzzellwachstum.

Die Untersuchungsergebnisse der Versuchsreihen unter Rezeptorblockade und -aktivierung im Innenohr mit seinen Schwanzzellen sind vergleichbar mit denen des ZNS und seiner Oligodendrozyten; es zeigt sich nach Rezeptorblockade ein konsekutives Nervenwachstum.

Mit einer anderen Methode, aber dem gleichen Wirkungsprinzip, erzielten Testreihen nach Axotomie des Nervus vestibulocochlearis ebenfalls ein verstärktes Neuritenwachstum. Die klinische Relevanz für das Hörvermögen zeigt sich hier in der sekundären Degeneration der Nervenfasern und dem Untergang der Neurone im Spiralganglion nach Schädigung der Haarzellen, also dem zwangsläufig folgenden Hörverlust [52]. Bei diesen Studien wurde die Durchtrennung des Nervs jedoch immer proximal der axonglialen Junctionszone durchgeführt, also auf der Seite,

auf welcher der Nerv noch von der zentralen Glia, den Oligodendrozyten umgeben ist. Im Gegensatz zu dem distalen Anteil, welcher dann als Gliazellen die Schwannzellen vorweist und worauf sich die Experimente der vorliegenden Arbeit beziehen. Am Rattenmodell wurde beispielsweise statt der Rezeptorblockade mit Nogo-66(1-40) der Antikörper gegen myelinassoziierte Wachstumsinhibitoren (Nogo-A, MAG, OMgp) IN-1 verwendet. Hierbei wurde der achte Hirnnerv an seiner Austrittsstelle aus dem Hirnstamm axotomiert und die Ratten danach mit einer intrathekalen Injektion des Antikörpers behandelt. Nach der Antikörperbehandlung zeigte sich ein signifikantes Längenwachstum der Nervenfasern im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem konnten die Nervenfasern tendenziell die Synapsen wieder korrekt ausbilden, sodass sich auch das Hörvermögen anschließend wieder verbesserte [52].

Trotz der unterschiedlichen Methodik der *in vivo* und *in vitro* Studie zeigten die Ergebnisse der SGN-Kultur eine vergleichbare Tendenz. Nach Rezeptorblockade konnten sich nicht nur die Neuriten regenerieren und ein vermehrtes Längenwachstum aufweisen, sondern auch ein deutlich vermehrtes Auswachsen von peripheren Filopodien und eine Erhöhung der Faszikulation. Durch die Filopodien und das Verzweigungsmuster der Neuriten können so folglich auch vermehrt Synapsen zwischen den einzelnen Neuriten ausgebildet werden, welche zuvor unterbrochen waren. Ob es sich hierbei um eine selektive Faszikulation handelte und sich diese Synapsen korrekt ausbilden, wie nach der zentralen Axotomie des Hörnervs oder es sich um eine unspezifische Faszikulation mit der Ausbildung von falschen, unspezifischen Synapsen handelt lässt sich in der *in vitro* Studie jedoch nicht untersuchen.

Die Ergebnisse der durchgeführten SGN-Kultur zeigten zudem nicht nur die erfolgreiche Blockade des NgR zur Nervenregeneration, sondern außerdem die Interaktion zwischen dem NgR in den Neuronen und Neuriten der Spiralganglienneurone und MAG. Hier zeigte sich eine signifikante Längenreduktion der Neuriten mit deutlich reduzierter Anzahl an Filopodien an den Wachstumskegeln der peripheren Neuriten sowie ein reduziertes Verzweigungsmuster nach Rezeptoraktivierung via MAG. Folglich wären die Voraussetzungen auch im Innenohr erfüllt, eine Therapie mit dem Antikörper gegen die myelinassoziierten Wachstumsfaktoren (Nogo-A, MAG, OMgp) in Erwägung zu ziehen, um gegebenenfalls noch bessere Ergebnisse als unter Rezeptorblockade zu erzielen, da auch hier eine Interaktion

zwischen den Liganden und dem NgR bestätigt werden konnte. Ein weiterer gedanklicher Ansatzpunkt wäre die Kombination von Methoden zur Unterdrückung der Wachstumsinhibition durch Nogo-A. Hierzu zeigten Untersuchungen an dorsalen Spinalganglienexplantaten von Mäusen und Ratten jedoch, dass zwar sowohl die Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen Nogo-A als auch die Deletion des Nogo-A-Gens (Nogo-A-*knockout*-Mäuse) zu einer deutlichen Zunahme des Neuritenwachstums führten, die Kombination der beiden Methoden aber keine weitere Längenzunahme hervorbrachte [46]. Da aber beide Methoden jeweils auf die Inaktivierung des Liganden Nogo-A zielten, wäre ein anderer Ansatzpunkt z.B. die Blockierung des Rezeptors in Kombination mit der Inaktivierung der inhibitorisch wirkenden Liganden (Nogo-A, MAG, OMgp) durch Antikörper. Bezogen auf die Cochlea und ihre Spiralganglienneurone wäre hier die Verwendung von Nogo-66(1-40) zur Blockade des NgR, wie in der vorliegenden Versuchsreihe, in Verbindung mit dem Antikörper gegen myelinassoziierte Wachstumsfaktoren IN-1 eine Möglichkeit, um den Erfolg des Längenwachstums zu maximieren.

In weiterführenden *in vivo* Experimenten wäre dann außerdem darauf zu achten, dass es Unterschiede im Erfolg der Behandlungen gibt, je nach akuter oder chronischer Intervention mit intrathekalen Anti-Nogo-A-Antikörper Gabe. Zwar ist der Zeitpunkt noch unklar, wann nach einer Axotomie eine wachstumsfördernde Behandlung mit Antikörpern gegen Nogo-A oder eine Rezeptorblockade keinen Effekt mehr hat; jedoch zeigten Studien, dass je früher die Gabe erfolgte, desto besser die Regenerationsfähigkeit der Neuriten war – Mäuse mit Durchtrennung des dorsalen, des dorsolateralen und des ventralen Traktes im Rückenmark bekamen direkt nach der Verletzung, eine Woche und zwei Wochen später intrathekale Infusionen mit einem gelösten Anti-Nogo-A-Antikörper. Der höchste Prozentsatz an regenerierten Neuriten wurde bei der Infusionsgabe direkt nach der Verletzung erfasst. Die Gruppe mit der Behandlung nach zwei Wochen zeigte nur noch eine minimale Verlängerung der Nervenfasern und keine Funktionsbesserung im Vergleich zu der Kontrollgruppe [50]. Da jedoch eine akute Behandlung direkt nach einer Rückenmarksverletzung bei Patienten meist nicht praktikabel ist, wurde versucht das Zeitfenster zu ermitteln, in welchem die Therapie noch erfolgversprechend ist. Unter der Annahme, dass die Blut-Hirn-Schranke nach einer traumatischen Rückenmarksverletzung in diesem Bereich für eine bestimmte Zeitspanne zusammenbricht [57], wurde Mäusen mit teilweiser hinterer Rückenmarksdurch-

trennung systemisch Nogo-66(1-40) als antagonistisch wirkendes Peptid des NgR injiziert [58]. Die Gabe erfolgte einige Minuten, drei bis vier Stunden und sieben Tage nach Durchtrennung des Rückenmarkstraktes. Das Neuritenwachstum des Tractus corticospinalis kranial der Läsion nach Nogo-66(1-40) Gabe zeigte die gleichen, signifikanten Ergebnisse, unabhängig des zeitlichen Abstandes der Behandlung zu der Rückenmarksverletzung; die Blockade des Rezeptors unterdrückte die Wachstumsinhibition [58].

Um die klinische Relevanz und die letztendliche Übertragbarkeit auf den Menschen noch deutlicher zu machen, wurden neben den Studien an Nagern auch bereits Untersuchungen an Primaten durchgeführt. Die Regenerationsfähigkeit des ZNS wird im Alter in physiologischem Maße durch die Ausschüttung von Wachstumsinhibitoren unterdrückt, um ein überschüssiges Wachstum oder das Knüpfen unspezifischer, falscher Verbindungen mit daraus resultierender Fehlfunktion zu verhindern. Als eine der ersten Studien wurde an Seidenäffchen nach einseitiger Durchtrennung des thorakalen Rückenmarks nach IN-1 Gabe ein Neuritenwachstum innerhalb und um die Läsion herum und somit die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Nager-Modellen gezeigt. Die Affen zeigten nach zwei Wochen alle objektiv eine vollständige Regredienz der motorischen Defizite. In der histologischen Untersuchung zeigten drei von vier Affen, die mit IN-1 behandelt wurden, ein vermehrtes und deutlich längeres Auswachsen der Neuriten ausgehend von dem proximalen Ende mit Überbrückung der Läsion im Vergleich zu der Kontrollreihe [59].

Eine weitere Studie untersuchte zwölf Makaken-Affen nach zervikaler Rückenmarksläsion als Ergänzung zu der vorher beschriebenen Studie und zur weiteren Untersuchung der motorischen Regenerationsfähigkeit im Versorgungsgebiet des zervikalen Abschnitts, vor allem der Hände. Die Affen waren nach Axotomie in ihrer Fingerfertigkeit eingeschränkt. Unter Anti-Nogo-A-Antikörper Behandlung zeigten alle eine vollständige, bzw. nahezu vollständige Erholung der funktionellen Defizite in der Fingerfertigkeit und zeigten zudem keinerlei Einschränkungen in ihrem Verhalten. Anzeichen von Schmerzempfinden konnten über die Zeit nicht festgestellt werden. Daraus schloss sich, dass die neuen Verbindungen, welche durch das Auswachsen der Neuriten unter IN-1 Therapie nach der Rückenmarksdurchtrennung geknüpft wurden, anscheinend nicht zu chronischen Schmerzen führten [60]. Als eine der ersten Untersuchungen wurde an den Primaten nicht nur

das regenerative Nervenwachstum nach Neutralisation von Nogo-A nachgewiesen, sondern auch eine funktionelle Regenerationsfähigkeit ohne die offensichtliche Fehlverschaltung und Generierung von Schmerzen. Durch die Versuchsreihen an den Primaten mit ihren Übereinstimmungen zum menschlichen Organismus wird erstmals die deutliche Relevanz der Beeinflussung des Nogo-Systems als mögliche Therapieform jeglicher, neuronaler Verletzungen des ZNS deutlich. Zunächst wurde in Nager-Modellen *in vivo* nachgewiesen, dass der NgR im Innenohr nach zentraler Axotomie zu einer Regeneration des Hörvermögens führt [52]. Zudem wurde *in vitro* insbesondere in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass nach peripherer Axotomie die Neuriten nach Rezeptorblockade ebenfalls wieder in der Lage sind sich zu regenerieren und Synapsen mit zunächst noch unklarer Funktion auszubilden. Da die Ergebnisse der Nager-Studien bezüglich des ZNS erfolgreich auf die Primaten übertragen werden konnten, könnte es somit auch sein, dass die Ergebnisse bezüglich des Innenohres, hier der Regenerationsfähigkeit der Neuriten unter dem Einfluss der Schwannzellen, sich ebenfalls auf die Primaten übertragen lassen und somit eventuell auf den menschlichen Organismus.

4.1.1.2 Wachstumsverhalten der Schwannzellen

Eine genaue Lokalisation des NgR innerhalb der Schwannzellen im Innenohr, distal der axonoglialen Junctionszone wurde bis dato noch nicht nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten der Schwannzellen unter Rezeptorblockade via Nogo-66(1-40) sowie unter Rezeptoraktivierung via MAG untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikant vermehrte Anzahl sowie größere Migrationsweite unter Rezeptorblockade via Nogo-66(1-40). Im Gegensatz dazu zeigte sich tendenziell eine verminderte Anzahl und verringerte Migrationsweite der Schwannzellen unter dem inhibitorischen Einfluss von MAG, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollreihe und primär bei einer Konzentration von 2 ng/ μ l. Die MAG-Konzentration von 1 ng/ μ l wurde hierbei, wie schon bei der Untersuchung der Neuritenlängen, als zu geringe Faktorenkonzentration eingestuft. Betrachtet man bisherige Studien, zeigt sich die Lokalisation des NgR im ZNS primär in den Neuronen und Axonen, die Oligodendrozyten selbst exprimieren den Rezeptor nicht [29], [43]. Nogo-A, als Ligand des NgR, ist in den Oligodendrozyten, hier im Endoplasmatischen Retikulum sowie in der inneren und äußeren Membran der Myelinscheide zu finden [56]. Weiter zeigte sich ein Zusammenhang der Schwann-

zellen im Innenohr mit denen in der Peripherie. Die peripheren Nervenfasern können sich in gewissem Maße regenerieren. Dieser Mechanismus folgt dem Prinzip der Waller-Degeneration, bei welchem die Schwannzellen eine entscheidende Rolle während des Neuritenwachstums spielen [3]. Die Schwannzellen des PNS stehen hierbei mit den Neuriten in einer engen Kommunikation. Sie beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktion, ihrer Entwicklung und auch ihrer Erhaltung [61]. Betrachtet man den eigentlichen Sinn der Unterdrückung des Nervenwachstums im ZNS ab dem Erwachsenenalter auf Grund seiner Komplexität sowie der möglichen falschen Reinnervation, stellt sich dieses Problem in der Peripherie ebenfalls dar. Ein oft überschießendes Wachstum im Rahmen der Nervenregeneration sowie das Ausbilden falscher Verknüpfungen und Verzweigungen resultieren oft in einer unzureichenden, funktionellen Regeneration [62].

Es zeigt sich, dass Nogo auch in den Schwannzellen des PNS vorhanden ist, nicht nur in den Oligodendrozyten des ZNS [63]. Hierbei handelt es sich jedoch um eine andere Isoform des Nogo-Proteins, um Nogo-B, welches sich im Endoplasmatischen Retikulum sowie in der Plasmamembran der Schwannzellen befindet, nicht jedoch im Myelin [63]. Der Nogo-B spezifische Nogo-B-Rezeptor (NgBR) wird, wie auch der NgR im ZNS, von Neuronen und Neuriten exprimiert, bindet jedoch nicht an die Nogo-66-Domäne der Nogo-Isoformen, sondern an einen Abschnitt des Amino-Terminus von Nogo-B [63], [64]. Wie schon die Untersuchungen im ZNS nach Inhibition des Nogo-A-Systems zeigten, finden sich analog hierzu teilweise ähnliche Ergebnisse im PNS mit Nogo-B-*knockout*-Mäusen, jedoch veränderte sich hier primär das Verzweigungsmuster der Neuriten und nicht das Längenwachstum. Die Studie um Eckharter et al zeigte, dass die Neuriten sensorischer Nervenzellen, welche mit Nogo-B negativen Schwannzellen kultiviert wurden, signifikant weniger Verzweigungen während ihres Wachstums bildeten als die Kontrollreihe. Auffallend war hier, dass die Länge der Neuriten durch die Deletion des Nogo-B-Gens im Vergleich zu den Wildtyp Schwannzellen unbeeinflusst blieb. Die gleichen Ergebnisse ließen sich auch unter Blockade des NgBR beobachten; die unselektive Faszikulation der Neuriten nahm ab, die Länge blieb jedoch gleich [63]. Vergleicht man also die Ergebnisse der Studien über den Einfluss von Nogo-B mit den Ergebnissen der Untersuchungen im ZNS, bezogen auf die Wirkung von Nogo-A aus den Oligodendrozyten, wird deutlich, dass beide Nogo-Isoformen das Ausmaß der ungewollten Verzweigungen der Neuriten reduzieren [63], [46]. Der Unterschied be-

steht hier in der Unterdrückung des Längenwachstums der Neuriten im ZNS, im Gegensatz zum PNS, wo Nogo-B das Längenwachstum nicht beeinflusst. Die Oligodendrozyten weisen nur Nogo-A auf, exprimieren aber nicht selbst den NgR. Da auch von den Schwannzellen des PNS der Nogo-Rezeptor nicht exprimiert wird, sondern nur der Ligand des Rezeptors, Nogo-B, in den Schwannzellen nachgewiesen wurde, lässt sich die Vermutung äußern, dass auch die Schwannzellen des Innenohres den Rezeptor nicht exprimieren. Die Ergebnisse der SGN-Kulturen zeigten eine signifikant vermehrte Anzahl der Schwannzellen unter Rezeptorblockade durch Nogo-66(1-40) verglichen mit der Kontrollreihe. Zudem konnte eine signifikant gesteigerte Migrationsweite der Schwannzellen beobachtet werden. Nach diesen Beobachtungen und unter der Annahme, dass die Schwannzellen im Innenohr den NgR analog zu den Gliazellen im PNS und ZNS ebenfalls nicht selbst exprimieren, hätte Nogo-66(1-40) keinen direkten Einfluss auf die Schwannzellen. Die Proliferation sowie die erhöhte Migrationsweite wären somit die Folge einer positiven Rückkopplung der Neuriten auf die Schwannzellen, z.B. durch die Ausschüttung von Neutrophinen oder des Wachstumsfaktors Neuregulin. Alternativ könnte das signifikant gesteigerte Wachstum der Schwannzellen nach Rezeptorblockade auch aus der Tatsache resultieren, dass die Schwannzellen selbst im Innenohr den NgR exprimieren und somit ein direkter Einfluss von Nogo-66(1-40) auf die Schwannzellen bestünde. Da die Cryoschnitte zwar größtenteils einen zellspezifischen Nachweis der NgR-Expression liefern konnten, jedoch keine exakte Lokalisation bezogen auf die Unterscheidung von Zellkern, Zytoplasma oder Zellmembran zuließen, kann dies abschließend noch nicht geklärt werden.

4.2 Klinische Relevanz und Perspektiven

Eine hochgradige Schwerhörigkeit, bzw. Taubheit beginnt meist am Cortiorgan, hier durch einen Verlust der Haarzellen und zeigt bei Progredienz eine Degeneration der peripheren Nervenfasern, danach der Spiralganglienneurone und zieht sich fort bis in die zentralen Nervenbahnen [17], [19]. Nach den Leitlinien ist es der momentane Standard, bei einer sensorischen Schwerhörigkeit ein Cochlea Implantat und bei einer neuralen Schwerhörigkeit ein zentral-auditorisches Implantat einzusetzen [25]. Während ersteres zufriedenstellende Ergebnisse liefert, ist das zentrale Implantat weniger erfolgversprechend. Bedenkt man die Einsatzmöglichkeiten der Blockade des NgR oder der Neutralisation der Liganden durch den

Antikörper IN-1 gibt es unterschiedliche Ansatzpunkte der Therapieformen. Bleibt man bei der operativen Therapie, zum Beispiel bei dem Einsatz eines Cochlea Implantates, wäre es theoretisch möglich, eine begleitende Therapie mit Nogo-66(1-40) oder IN-1 zu beginnen, um das Neuritenwachstum in Richtung der Elektroden zu fördern.

Eine andere Möglichkeit wäre in einem weiteren Schritt der kausale Therapieansatz, als Ersatz für den operativen Eingriff, in dem man die Regenerationsfähigkeit und das Nervenwachstum fördert und im gleichen Zuge auch eine selektive Faszikulation erreicht mit neu ausgebildeten Verknüpfungen durch spezifische Synapsen, damit sich hier die ursprüngliche Hörfunktion wiedereinstellen kann, unter der Voraussetzung die inneren Haarzellen ersetzen zu können. Eine weitestgehend neue, noch experimentelle Entwicklung ist die Therapie mit pluripotenten Stammzellen, welche sich nach einer vorausgegangenen Schädigung der Haarzellen bei schwerwiegender Hörstörung, bzw. Taubheit zu diesen differenzieren können. Hierbei wurden erstmals *in vitro* und *in vivo* erfolgreich Stammzellen generiert, die sich innerhalb des Cortiorgans zu Zellen differenzierten, welche die spezifischen Marker der inneren Haarzellen aufwiesen [65]. Diese Progenitorzellen im Folgenden erfolgreich in die Cochlea, beispielsweise in einem Mäuse-Modell zu implantieren ohne größeren Schaden im Bereich des Innenohres zu verursachen, ist der nächste Schritt bei diesem Therapieansatz. Des Weiteren müssen die afferenten Neuriten der Spiralganglienneurone in der Lage sein auf die neu generierten Haarzellen zuzuwachsen und mit diesen Synapsen auszubilden um wieder eine funktionelle Einheit zu schaffen [65]. Hier zeigt sich ein weiterer Ansatzpunkt einer adjuvanten Behandlung mit Nogo-66(1-40) auf; die Möglichkeit des Auswachsens der Spiralganglienneuriten auf die generierten Haarzellen sowie die Ausbildung neuer Verknüpfungen im Sinne von synaptischen Verbindungen. Zur Verbesserung der Therapie, welche das Nogo-System beeinflusst wären hier nach aktuellem Stand eine frühe Therapieeinleitung, innerhalb der ersten Woche nach Hörschädigung sowie eine kombinierte Therapie mittels Rezeptorblockade und gleichzeitiger Inaktivierung der inhibitorisch wirkenden Liganden (Nogo-A, MAG, OMgp) mögliche Ansatzpunkte für ein ausreichendes sowie zielgerichtetes Wachstum der Spiralganglienneuriten hin zu transplantierten Progenitorzellen, welche sich zu neuen sensorischen Zellen differenzieren können. Eine unselektive Faszikulation mit Ausbildung unspezifischer Synapsen sollte hierbei vermieden werden.

Hier wären auch die Schwannzellen gleichzeitig ein möglicher Ansatzpunkt für die Optimierung der Therapie. Grundsätzlich zeigen die Schwannzellen im Vergleich zu den Neuronen und Neuriten nach Schädigung eine längere Überlebenszeit [66]. Das umgebende Milieu, was unter anderem durch die noch vorhandenen Schwannzellen geschaffen wird, ist speziell auch im Innenohr ein wichtiger Aspekt der Nervenregeneration. Hier vor allem durch ihre Ausschüttung von Neutrophinen, welche das Überleben der Spiralganglienneurone und Neuriten fördern [20]. Des Weiteren zeigten die Nogo-B negativen Schwannzellen des PNS bei neu auswachsenden Neuriten ein deutlich geringeres Verzweigungsmuster [63]. Wäre dies auch bei den, nach Schädigung länger vorhandenen Schwannzellen im Innenohr möglich, so könnte man die Neuriten nicht nur in ihrem zielgerichteten Längenwachstum unterstützen, sondern auch die ungewollten Verzweigungen der Nervenfasern, welche letztendlich zu einer möglichen Fehlverschaltung führen können, reduzieren.

Voraussetzung für all diese Therapiemöglichkeiten ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Der aktuelle Stand der Wissenschaft bezüglich des Nogo-Systems zeigt, dass der NgR sowie seine Liganden zum einen im ZNS, zum anderen auch im Bereich des Innenohres exprimiert werden, dass sie einen nachgewiesenen inhibitorischen Effekt auf die Nervenregeneration haben und dass es speziell im ZNS in *in vivo* Studien, aber auch im Innenohr in *in vitro* Studien möglich ist, den NgR und seine Liganden zu inhibieren, um so das Nervenwachstum zu fördern. Zudem zeigen *in vivo* Experimente an Nagern, aber auch an Primaten, dass unter Beeinflussung des Nogo-Systems die Neuriten nicht nur regenerieren und in ihrer Länge zunehmen können, sondern auch, dass es möglich ist, funktionelle Defizite nach Nervenschädigung wieder zu kompensieren. Während die Experimente an Primaten die mögliche Übertragbarkeit des Therapieerfolges der Nervenregeneration auf Rückenmarksebene sowie die mögliche Wiedererlangung sensorischer und motorischer Fähigkeiten nach Axonotomie, auf den Menschen auf Grund ihrer Ähnlichkeit zum menschlichen Organismus nahelegen, wurde konkret auch schon ein humanes Nogo-A-Gen in der DNA nachgewiesen. Es zeigte sich schon früh, dass Nogo-A im Menschen zum einen nachgewiesen werden konnte und zum anderen ebenfalls für die Wachstumsinhibition im ZNS verantwortlich ist [41], [67]. Hierfür wurde das Wachstumsverhalten der Neuriten in einer Kultur mit Körnerzellen aus dem Kleinhirn des Menschen unter Zugabe von MAG, von Nogo-A

und einer Kontrollreihe beobachtet. Die MAG- und die Nogo-A-Reihen zeigten durch ihre inhibitorische Wirkung eine deutlich reduzierte Neuritenlänge verglichen mit der Kontrollreihe [67]. Somit besteht nachweislich die Grundlage, dass der NgR sowie seine Liganden im menschlichen Organismus eine vergleichbare Wirkungsweise haben, wie im ZNS von Nagern und Primaten. Abschließend liegt nahe, dass auch in folgenden *in vivo* Experimenten an Menschen die Erfolgsaussichten für eine Nervenregeneration, ein zunehmendes Nervenwachstum und eine Wiedererlangung von Motorik und Sensorik zunächst zumindest auf Rückenmarksebene vielversprechend sind.

4.3 Schlussfolgerung

Durch die vorliegenden Ergebnisse gelang eine weitere Expressionsspezifisierung des NgR und seines Liganden MAG in den Zellen des Stützzellapparates, neben der nachgewiesenen Expression in den Spiralganglienneuronen, den Neuriten und dem Cortiorgan. Außerdem konnte in der SGN-Kultur gezeigt werden, dass die Rezeptorblockade via Nogo-66(1-40) zu einem signifikanten Längenwachstum der Spiralganglienneuriten und einer vermehrten Ausbildung von Filopodien führt, seine Aktivierung via MAG zu einer deutlichen Reduktion der Neuritenlänge. Analog zu dem Neuritenwachstum konnte eine signifikant erhöhte Anzahl und eine erhöhte Migrationsweite der Schwannzellen nach Rezeptorblockade nachgewiesen werden. Somit verhält sich das Wachstum der Spiralganglienneuriten analog zu dem Neuritenwachstum des ZNS unter Blockade des Nogo-Systems. Die Schwannzellen zeigen ebenfalls eine positive Reaktion auf die Rezeptorblockade. Ob es sich hierbei um eine direkte Wirkung von Nogo-66(1-40) auf die Schwannzellen handelt oder um eine positive Rückkopplung der auswachsenden Neuriten durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren auf die Schwannzellen lässt sich abschließend nicht beantworten. Hinweisend sind hier lediglich die Vergleiche zu den Oligodendrozyten und dem Nogo-A-System im ZNS sowie zu den peripheren Schwannzellen und dem Nogo-B-System. Die klinische Relevanz innerhalb der therapeutischen Möglichkeiten liegt zum einen in einer additiven Therapie nach Einsatz eines Cochlea Implantates, wo es dann möglich wäre, dass die Neuriten unter Nogo-66(1-40)-Therapie zielgerichtet auf die Elektroden des Implantates zuwachsen könnten. Oder als kausaler Therapieansatz der sensorineuralen Schwerhörigkeit, in der die Neuriten unter Inhibition des Nogo-Systems eine ausreichende

Länge erreichen und kontrolliert funktionsfähige, selektive Synapsen zu neu generierten, inneren Haarzellen ausbilden um letztendlich die ursprüngliche Hörfunktion wiederzuerlangen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Klinker, R., et al., *Physiologie*. 6. Auflage ed. 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
2. Spektrum Akademischer Verlag. "*Myelinisierung eines Axons*". 2001 [cited 2017 27.01.]; Available from: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/neuron/8159>.
3. Stoll, G., S. Jander, and R.R. Myers, *Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation*. J Peripher Nerv Syst, 2002. **7**(1): p. 13-27.
4. LeBlanc, A.C. and J.F. Poduslo, *Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve*. J Neurosci Res, 1990. **26**(3): p. 317-26.
5. Stoll, G., et al., *Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation*. J Neurocytol, 1989. **18**(5): p. 671-83.
6. Lopez, P.H., *Role of myelin-associated glycoprotein (siglec-4a) in the nervous system*. Adv Neurobiol, 2014. **9**: p. 245-62.
7. Schafer, M., et al., *Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice*. Neuron, 1996. **16**(6): p. 1107-13.
8. Jessen, K.R., *Glial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1861-7.
9. Huber, A.B. and M.E. Schwab, *Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration*. Biol Chem, 2000. **381**(5-6): p. 407-19.
10. Schuknecht, H.F., *Pathology of the Ear*. 1974, Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
11. Department of Otolaryngology, W.U.S.o.M. "*Cochlea*". [cited 2017 08.06]; Available from: <http://www.physics.mcgill.ca/~guymoore/ph224/notes/lecture4.html>.
12. Gitter, A.H. "*Das Corti-Organ*". 2016 [cited 2017 27.01.]; Available from: http://web.eah-jena.de/~gitter/tut_hoer.html.
13. Schünke, M., et al., *Prometheus Lernatlas der Anatomie*. 2. Auflage ed. Kopf, Hals und Neuroanatomie. 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

14. Hu, Z., *Formation of the peripheral-central transitional zone in the postnatal mouse cochlear nerve*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013. **149**(2): p. 296-300.
15. Berthold, C.H. and T. Carlstedt, *Observations on the morphology at the transition between the peripheral and the central nervous system in the cat. III. Myelinated fibres in S1 dorsal rootlets*. Acta Physiol Scand Suppl, 1977. **446**: p. 43-60.
16. Toesca, A., *Central and peripheral myelin in the rat cochlear and vestibular nerves*. Neurosci Lett, 1996. **221**(1): p. 21-4.
17. Terayama, Y., et al., *Ultrastructural changes of the nerve elements following disruption of the organ of Corti. I. Nerve elements in the organ of Corti*. Acta Otolaryngol, 1977. **83**(3-4): p. 291-302.
18. Terayama, Y., et al., *Ultrastructural changes of the nerve elements following disruption of the organ of Corti. II. Nerve elements outside the organ of Corti*. Acta Otolaryngol, 1979. **88**(1-2): p. 27-36.
19. Hurley, P.A., J.M. Crook, and R.K. Shepherd, *Schwann cells revert to non-myelinating phenotypes in the deafened rat cochlea*. Eur J Neurosci, 2007. **26**(7): p. 1813-21.
20. Whitlon, D.S., et al., *Survival and morphology of auditory neurons in dissociated cultures of newborn mouse spiral ganglion*. Neuroscience, 2006. **138**(2): p. 653-62.
21. Probst, R., Grevers, G., Iro, H., *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 3. Auflage ed. 2008, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
22. Spöndlin, H. and R. Suter, *Regeneration in the VIII nerve*. Acta Otolaryngol, 1976. **81**(3-4): p. 228-36.
23. Gharabaghi, A. and M. Tatagiba, *Functional regeneration of the axotomized auditory nerve with combined neurotrophic and anti-inhibitory strategies*. Acta Neurochir Suppl, 2005. **93**: p. 89-91.
24. Rosahl, S.K., et al., *Acoustic evoked response following transection of the eighth nerve in the rat*. Acta Neurochir (Wien), 2000. **142**(9): p. 1037-45.
25. Fachgesellschaften, A.d.w.m. *Cochlea-Implantat Versorgung und zentral-auditorische Implantate*. 2012; AWMF-Register-Nr.: 017-071].
26. GrandPre, T., et al., *Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein*. Nature, 2000. **403**(6768): p. 439-44.

27. Wang, T., et al., *The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review*. Brain Res Bull, 2012. **87**(6): p. 499-503.
28. Filbin, M.T., *Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(9): p. 703-13.
29. Fournier, A.E., T. GrandPre, and S.M. Strittmatter, *Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 341-6.
30. Mi, S., et al., *LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex*. Nat Neurosci, 2004. **7**(3): p. 221-8.
31. Wang, K.C., et al., *P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp*. Nature, 2002. **420**(6911): p. 74-8.
32. Park, J.B., et al., *A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors*. Neuron, 2005. **45**(3): p. 345-51.
33. Song, X.Y., et al., *Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice*. J Neurosci, 2004. **24**(2): p. 542-6.
34. Yamashita, T., K.L. Tucker, and Y.A. Barde, *Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 585-93.
35. Walmsley, A.R. and A.K. Mir, *Targeting the Nogo-A signalling pathway to promote recovery following acute CNS injury*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(24): p. 2470-84.
36. Schwab, J.M., S.K. Tuli, and V. Failli, *The Nogo receptor complex: confining molecules to molecular mechanisms*. Trends Mol Med, 2006. **12**(7): p. 293-7.
37. Thomson Reuters, J.o.t.W. "Signaling mechanisms of axon growth inhibition". 2006 [cited 2017 15.08.]; Available from: <https://journals.prouis.com/journals/dnp/20061909/html/dn190541/images/image02.jpg>.
38. Liu, B.P., et al., *Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor*. Science, 2002. **297**(5584): p. 1190-3.
39. Caroni, P. and M.E. Schwab, *Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading*. J Cell Biol, 1988. **106**(4): p. 1281-8.

40. Schnell, L. and M.E. Schwab, *Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors*. Nature, 1990. **343**(6255): p. 269-72.
41. Spillmann, A.A., V.R. Amberger, and M.E. Schwab, *High molecular weight protein of human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth: an effect which can be neutralized by the monoclonal antibody IN-1*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(3): p. 549-55.
42. Spillmann, A.A., et al., *Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220)*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19283-93.
43. Peng, X., et al., *Soluble Nogo receptor down-regulates expression of neuronal Nogo-A to enhance axonal regeneration*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2783-95.
44. Domeniconi, M., et al., *Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth*. Neuron, 2002. **35**(2): p. 283-90.
45. Wang, K.C., et al., *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 941-4.
46. Petrinovic, M.M., et al., *Neuronal Nogo-A regulates neurite fasciculation, branching and extension in the developing nervous system*. Development, 2010. **137**(15): p. 2539-50.
47. Cao, Y., et al., *Nogo-66 receptor antagonist peptide (NEP1-40) administration promotes functional recovery and axonal growth after lateral funiculus injury in the adult rat*. Neurorehabil Neural Repair, 2008. **22**(3): p. 262-78.
48. GrandPre, T., S. Li, and S.M. Strittmatter, *Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration*. Nature, 2002. **417**(6888): p. 547-51.
49. Zheng, B., et al., *Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1205-10.
50. Gonzenbach, R.R., et al., *Delayed anti-nogo-a antibody application after spinal cord injury shows progressive loss of responsiveness*. J Neurotrauma, 2012. **29**(3): p. 567-78.
51. Caelers, A., et al., *Nogo in the Mammalian cochlea*. Otol Neurotol, 2009. **30**(5): p. 668-75.

52. Tatagiba, M., et al., *Regeneration of auditory nerve following complete sectioning and intrathecal application of the IN-1 antibody*. Acta Neurochir (Wien), 2002. **144**(2): p. 181-7.
53. World Health Organisation. *Deafness and hearing loss*. 2019 [cited 2019 16.12.]; Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/deafness-and-hearing-loss>.
54. Wan, G., G. Corfas, and J.S. Stone, *Inner ear supporting cells: rethinking the silent majority*. Semin Cell Dev Biol, 2013. **24**(5): p. 448-59.
55. Warchol, M.E., *Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species*. Hear Res, 2011. **273**(1-2): p. 72-9.
56. Chen, M.S., et al., *Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1*. Nature, 2000. **403**(6768): p. 434-9.
57. Schnell, L., et al., *Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(10): p. 3648-58.
58. Li, S. and S.M. Strittmatter, *Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury*. J Neurosci, 2003. **23**(10): p. 4219-27.
59. Fouad, K., I. Klusman, and M.E. Schwab, *Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (Callitrix jacchus) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(9): p. 2479-82.
60. Freund, P., et al., *Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates*. Nat Med, 2006. **12**(7): p. 790-2.
61. Corfas, G., et al., *Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions*. J Neurosci, 2004. **24**(42): p. 9250-60.
62. Hendry, I.A., C.E. Hill, and D.J. Watters, *Long-term retention of Fast Blue in sympathetic neurones after axotomy and regeneration--demonstration of incorrect reconnections*. Brain Res, 1986. **376**(2): p. 292-8.
63. Eckharter, C., et al., *Schwann Cell Expressed Nogo-B Modulates Axonal Branching of Adult Sensory Neurons Through the Nogo-B Receptor NgBR*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 454.

64. Miao, R.Q., et al., *Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 10997-1002.
65. Li, H., et al., *Stem cells as therapy for hearing loss*. Trends Mol Med, 2004. **10**(7): p. 309-15.
66. Leake, P.A. and G.T. Hradek, *Cochlear pathology of long term neomycin induced deafness in cats*. Hear Res, 1988. **33**(1): p. 11-33.
67. Prinjha, R., et al., *Inhibitor of neurite outgrowth in humans*. Nature, 2000. **403**(6768): p. 383-4.

6 Anhang

Tabelle 2: Post-hoc-Test nach Tukey

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Neuritenlänge

(I) Faktor	(J) Faktor	Mittlere Differenz (I-J) +/- SD	Signi- fikanz
Kontrolle	MAG 1 ng/μl	8,6054 (+/- 17,2542)	,999
	MAG 4 ng/μl	73,6428* (+/-16,8745)	,000
	MAG 2 ng/μl	89,2513*(+/- 16,2992)	,000
Nogo-66(1-40) 20 ng/μl	Kontrolle	373,5145* (+/- 18,7347)	,000
	Nogo-66(1-40) 5 ng/μl	53,4467 (+/- 23,3457)	,250
	Nogo-66(1-40) 10 ng/μl	107,8087* (+/- 23,3457)	,000
	MAG 1 ng/μl	382,1199* (+/-22,5521)	,000
	MAG 4 ng/μl	447,1573* (+/- 22,2630)	,000
	MAG 2 ng/μl	462,7658* (+/- 21,8302)	,000
Nogo-66(1-40) 5 ng/μl	Kontrolle	320,0679* (+/- 18,2793)	,000
	Nogo-66(1-40) 10 ng/μl	54,3620 (+/- 22,9818)	,214
	MAG 1 ng/μl	328,6732* (+/- 22,1752)	,000
	MAG 4 ng/μl	393,7107* (+/- 21,8811)	,000
	MAG 2 ng/μl	409,3191* (+/- 21,4406)	,000
Nogo-66(1-40) 10 ng/μl	Kontrolle	265,7059* (+/- 18,2793)	,000
	MAG 1 ng/μl	274,3112* (+/- 22,1752)	,000
	MAG 4 ng/μl	339,3487* (+/- 21,8811)	,000
	MAG 2 ng/μl	354,9571* (+/- 21,4406)	,000
MAG 1 ng/μl	MAG 4 ng/μl	65,0374* (+/- 21,0323)	,033
	MAG 2 ng/μl	80,6459* (+/- 20,5736)	,002
MAG 4 ng/μl	MAG 2 ng/μl	15,6085 (+/- 20,2563)	,988

Tabelle 1: Post-hoc-Analyse nach Tukey, abhängige Variable: Neuritenlänge.

Für die Testung auf signifikante Unterschieden zwischen den einzelnen Faktoren wurde der Post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt und erfolgte ebenfalls zum Signifikanzniveau $\leq 0,05$.

* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau ≤ 0.05 signifikant.

Tabelle 3: Unifaktorielle Varianzanalyse ANOVA

Neuritenlänge	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	27266164,7	6	4544360,79	172,081	0,000
Innerhalb der Gruppen	27411785,7	1038	26408,271		
Gesamt	54677950,4	1044			

Tabelle 2: Unifaktorielle Varianzanalyse ANOVA zum Signifikanzniveau von $\leq 5\%$.

$F(6, 1038) = 172,081$; $p \leq 0,001$. Zum Signifikanzniveau von $\leq 5\%$ zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte der Neuritenlängen in Abhängigkeit zu den verschiedenen Testbedingungen unter Zugabe von Nogo-66(1-40), MAG, bzw. der Kontrollreihe.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Schipper für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Promotion unter seiner Leitung in der HNO-Klinik der Universität Düsseldorf danken.

Meinem Betreuer PD Dr. med. Stefan Hansen danke ich besonders für die interessante Thematik der Dissertation, für seine stete Hilfsbereitschaft, seine aufmunternden Worte und all die Zeit, die er sich für meine Fragen und Probleme genommen hat.

Dem Laborteam der HNO danke ich für die freundliche Aufnahme, für die Unterstützung am Arbeitsplatz und das angenehme Arbeitsklima.

Zuletzt danke ich ganz herzlich meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben und immer für mich da sind. Und meinem Bruder für seine endlose Geduld und seine liebevolle Unterstützung bei allen technischen Problemen, die ich des Öfteren hatte.