

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

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

Der Einfluss von Neurotrophinen auf die Interaktion von Gliazellen
und Spiralganglienzellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Suzan Memili
(2022)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Jan Frederick Cornelius

Für meine Familie

Zusammenfassung

Schwannzellen sind Gliazellen, die im peripheren Nervensystem die Neuriten von Nervenzellen bis zur axono-glialen Junctionszone ummanteln. Diese haben diverse Funktionen: Einerseits fördern sie die Entwicklung und Regeneration, andererseits dienen sie dem Erhalt der Nervenzellen. Bei einer peripheren axonalen Schädigung können die Schwannzellen in einen unreiferen Zustand zurückkehren und sich durch Sekretion von Neurotrophinen und Molekülen der extrazellulären Matrix am Regenerationsprozess beteiligen. Im Innenohr wurde bis zum heutigen Stand eine derartige Glia-Neuron-Interaktion wenig diskutiert. Für die hier beschriebenen Versuche wurden Spiralganglienzellen aus der Cochleae von Mäusen im Alter von 4 bis 5 Tagen mikrochirurgisch präpariert und für 72 Stunden unter dem Einfluss der jeweiligen Faktoren, Neurotrophin-3 (NT-3), Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Glial derived neurotrophic factor (GDNF) und Nerve growth factor- β (NGF- β) in verschiedenen Konzentrationsstufen kultiviert. Anschließend wurde das Auswachsverhalten von Neuriten aus der Spiralganglienzelle näher charakterisiert, und die Interaktion der nicht myelinisierenden Schwannzellen mit den Spiralganglienneuriten wurde analysiert. Unter dem Einfluss von NGF- β zeigte sich eine Proliferation in beiden Zelltypen. Bei vermindertem Neuritenlängenwachstum wurde vermutlich ein Redifferenzierungsprozess in der glialen Zellreihe initiiert. Ferner bildeten Schwannzellen Faszikel und interagierten so untereinander. Unter BDNF zeigte sich ein deutliches Längenwachstum der auswachsenden Neuriten; bei den Schwannzellen wurde ein Migrationsverhalten mit Positionierung an distalen Neuritenendigungen festgestellt. Auch bei GDNF und NT-3 wurde ein positiver Einfluss auf das Neuritenwachstum beobachtet. Bei beiden erfolgte eine intensive Kontaktaufnahme zwischen Schwannzellen und auswachsenden Neuriten. Zudem wurde unter NT-3 eine enge Interaktion der nicht myelinisierenden Schwannzellen mit der Spiralganglienzelle erkannt.

In Bezug auf die klinische Anwendung stellen diese Versuche in vitro eine Möglichkeit zur Optimierung der Cochlea-Implantation mit neurotrophen Faktoren dar. Mit der Auswahl von speziellen Neurotrophinen können Neuritenausprossungen in Richtung der CI-Elektrode induziert und eine möglichst enge bioprothetische Ankopplung erreicht werden.

Abstract

Schwann cells are glial cells, which myelinate the neurites of neurons of the peripheral nervous system until the axonal-glia junctional zone. They have diverse functions: on the one hand they promote development and the regeneration, on the other hand, they play a role in the survival of the neurons. In the case of a damage of peripheral axons the schwann cells can return in an immature status and take part in the regeneration process with secretion of neurotrophins and molecules of extracellular matrix. The hearing science is making a progress, but the details of the inner ear regarding the glia-neuron-interaction were not enough discussed. In this present study spiral ganglion cells of the cochlea of mice in the age of 4-5 days were prepared. Then they were cultivated for 72h with the neurotrophic factors neurotrophin-3 (NT-3), brain derived neurotrophic factor (BDNF), glial derived neurotrophic factor (GDNF) und nerve growth factor- β (NGF- β) in various concentrations. The influence of neurotrophic factors on the neurite outgrowth of spiral ganglion cells and the interaction of non myelinating schwann cells with the neurites was analyzed.

NGF- β caused a proliferation in both cell types. However a reduce neurite outcome was observed, there was presumably initiated a process of redifferentiation in the glial cells. There was a noticeably interaction between the schwann cells population like building fascicles. The application of BDNF induced a long neurite outgrowth, the corresponding schwann cells showed a high migration potencial and positioned in the distal part of neurite ending. GDNF and NT-3 induced also positive influence on the outgrowth of neurites. Both induced an intensive contact between schwann cells and outgrowing neurites, however the application of NT-3 induced also a close link between non myelinating schwann cells and the spiral ganglion cells.

For the clinical use, it means a therapeutic support for optimize the cochlear implantats. This study shows trophic support for spiral ganglion cells with neurotrophic factors, depending on the neurotrophin long outgrowth of neurites and the way of neurite outgrowing can be induced.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
c	Konzentration
CI	Cochlea-Implantat
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
dB	Dezibel
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
ECM	Extrazellulärmatrix
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR	Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor
IgG	Immunglobulin G
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mV	Millivolt
NCAM	neuronales Adhäsionsmolekül
NTR	Neurotrophin
NT-3	Neurotrophin-3
NGF	Nerve growth factor
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PLC	Phospholipase C
PNS	peripheres Nervensystem
Pr.-Nr.	Produktnummer
RET	Rearranged during Transfection, Rezeptor-Tyrosinkinase
SG	Spiralganglion
Tab.	Tabelle
Trk	Tyrosinkinase
U	Units
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung in die Thematik.....	1
1.2	Ziel der Arbeit.....	2
2	Material und Methoden.....	4
2.1	Tiermodell.....	4
2.2	Tierversuche.....	4
2.3	Zellkultursystem	5
2.3.1	Beschichtung der Zellkulturplatten und Herstellung des Kulturmediums.....	5
2.3.2	Mikrochirurgische Präparation der Spiralganglienzellen	6
2.3.3	Aufbereitung der Spiralganglienkultur	6
2.3.4	Fixierung.....	7
2.3.5	Immunfluoreszenz.....	7
2.3.6	Morphologische Auswertung der Zellkulturen.....	8
2.3.7	Testverfahren und Statistik	11
3	Ergebnisse.....	12
3.1	Einfluss von Neurotrophinen auf Längenwachstum der Neuriten von Spiralganglienzellen.....	13
3.2	Einfluss von Neurotrophinen auf glia-neuronale Interaktion	17
3.2.1	Reduziertes Neuritenlängenwachstum bei überwiegender glialer Zellpopulation unter Einfluss von NGF- β	17
3.2.2	Dominierendes Neuritenlängenwachstum und erhöhtes Migrationsverhalten der Schwannzellen unter Einfluss von BDNF	20
3.2.3	Intensiver glialer Kontakt beim Neuritenwachstum unter Einfluss von GDNF	22
3.2.4	Interaktion von Schwannzellen mit den Spiralganglienzellen unter Einfluss von NT-3	24
3.2.5	Erhöhte Motilität der Schwannzellen bei vermindertem Neuritenüberleben Einfluss von NGF- β mit BDNF	26
4	Diskussion	28
4.1	Neurotrophine in der Cochlea.....	28
4.2	Rezeptoren der Neurotrophine.....	29
4.3	Einfluss von Neurotrophinen auf das Neuritenwachstum von Spiralganglienzellen.....	30
4.3.1	Nerve growth factor	30
4.3.2	Brain derived neurotrophic factor.....	31
4.3.3	Glial cell line-derived neurotrophic factor.....	32
4.3.4	Neurotrophin-3.....	33

4.3.5	Kombination von BDNF mit NGF- β	34
4.4	Gliazellen im peripheren Nervensystem	34
4.5	Einfluss von Neurotrophinen auf die Interaktion von Gliazellen mit Neuriten...35	
4.5.1	Nerve growth factor	35
4.5.2	Brain derived neurotrophic factor	35
4.5.3	Glial cell line-derived neurotrophic factor.....	35
4.5.4	Neurotrophin-3.....	36
4.6	Rolle der p75(NTR)-Rezeptoren bei Schwannzellen	36
4.7	Weitere Einflussfaktoren auf das Wachstumsverhalten der Neuriten	37
4.8	Gliazellen und Myelinisierung in der menschlichen Cochlea	38
4.9	Optimierung der bioprothetischen Ankopplung von Cochlea-Implantaten – experimentelle Ansätze	39
5	Schlussfolgerung	41
6	Quellen- und Literaturverzeichnis	42
7	Danksagung	50

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Nach Angaben des Deutschen Gehörlosen-Bundes e. V. leben in der Bundesrepublik Deutschland ungefähr 16 Millionen schwerhörige und 80.000 gehörlose Menschen (Deutscher Gehörlosen-Bund e. V.; Stand Mai 2021). Das betrifft ungefähr 20 % der deutschen Bevölkerung.

Im klinischen Alltag wird bei der Ursache des Hörverlusts zwischen der Schalleitungsschwerhörigkeit und Schallempfindungsschwerhörigkeit sowie der zentralen Hörstörung und der kombinierten Form differenziert. Wenn eine Störung des Schalltransportes bis zum ovalen Fenster vorliegt, spricht man von einer Schalleitungsstörung. Die Schalleitungsstörung, vor allem die Tubenventilationsstörung mit Entstehung eines Paukenergusses im Rahmen einer grippalen Infektion oder bei vergrößerten Rachenmandeln, betrifft am häufigsten Kinder. Auch Fremdkörper bewirken im Gehörgang verminderte Schallübertragungen. Darüber hinaus können Traumata oder Fehlbildungen an der Ohranlage, beispielsweise am Gehörgang und/oder im Mittelohr, die Schalleitung beeinflussen. Im Erwachsenenalter stehen die chronischen Mittelohrentzündungen, wie die chronisch mesotympanale Otitis media oder das Cholesteatom, im Vordergrund. Die wesentlich häufiger auftretende Schallempfindungsschwerhörigkeit kann jegliche Beschädigung an der Cochlea (innere und äußere Haarzellen, Basilarmembran, Stria vascularis, Axone) beinhalten. Zu den Funktionsstörungen gehören metabolische, ototoxische, traumatische wie Lärmexpositionen oder genetisch bedingte Ursachen, ausgelöst z. B. durch intrauterine Fehlbildungen, entzündliche Prozesse, wie chronische Otitis, Meningitis, Masern oder Mumps, die durch virale oder bakterielle Infektionen verursacht werden. Selten tragen auch neoplastische Prozesse wie Akustikusneurinom oder auch erbliche und syndromale Komponenten wie das Alport-Syndrom zur Entwicklung einer Schallempfindungsschwerhörigkeit bei (Ptok, 2009; Nagel und Gürkow, 2009).

Die Haarzellen sind die eigentlichen Sinneszellen im Ohr, welche sich im Innenohr befinden und die Schwingungen der Basilarmembran in elektrische Impulse kodieren. Durch eine Schädigung der Haarzellen unterbricht die Übertragung der elektrischen Impulse auf den Hörnerv zum Gehirn (Fahlke, 2015; Kirsch, 2006).

Im Jahre 1957 fanden der Physiker André Djournio und Otologe Charles Eyriès heraus, dass durch direkte elektrische Reizung des Hörnervs Hörempfindungen ausgelöst werden können (Roland, 2006). Basierend auf der Erkenntnis konnte die Entwicklung der elektronischen Innenohrprothese, der sogenannten Cochlea-Implantation (CI), vorangebracht werden. Durch eine direkte elektrische Reizung stimulieren die Cochlea-Implantate die noch verbliebenen intakten Nervenfasern und bewirken eine Reizweiterleitung (Böhme, 1996). Systematische Verbesserungen von Operationsverfahren und Implantationstechnologie gewinnen mehr an Bedeutung insbesondere bei der Indikationsstellung der Cochlea-

Implantationen. Das Spektrum der Cochlea-Implantation hat sich heutzutage von einer kompletten Taubheit über eine Resthörigkeit und eine einseitige hochgradige Schwerhörigkeit bis hin zum Tinnitus erweitert (Battmer, 2009; Aschendorff et al., 2009).

Nach der Neurotrophinentheorie gibt es eine Assoziation zwischen dem Verlust des Corti-Organs und der Degeneration der bipolaren Spiralganglienzellen (Dodson und Mohuiddin, 2000; Alam et al., 2007). Die vorliegenden molekularen Pathomechanismen sind noch nicht ganz geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bestimmte Wachstumsfaktoren eine wichtige Bedeutung während der Innenohrentwicklung im sensorischen Epithel aufweisen. Auch postnatal konnte eine Expression von neurotrophen Faktoren oder deren Rezeptoren in cochleären Zellen nachgewiesen werden (Pirvola et al., 1992; Ylikoski et al., 1993). Diesbezüglich sind Forschungsarbeiten mit Zellkulturmodellen und Neurotrophinen bereits etabliert, die das Wachstumsverhalten der Spiralganglien untersuchen. Neue Forschungsergebnisse in neuronalen Bereichen zeigen jedoch, dass Gliazellen wichtige Neurotrophinlieferanten sind und einen protektiven Effekt auf das Überleben von Nerven aufweisen (Hansen et al., 2001).

Aufgrund eingeschränkter Regenerationseigenschaft der cochleären Zellen, stellen die Cochlea-Implantate einen wichtigen therapeutischen Ansatz im Bezug auf Hörrehabilitation dar (Eshraghi et al., 2012). Verschiedene Ansätze existieren bereits hinsichtlich der Protektion der Spiralganglienzellen sowie der neurobiologischen Schnittstelle der Cochlea-Implantate.

1.2 Ziel der Arbeit

Bei Verlust der Haarzellen degenerieren die bipolaren Spiralganglienzellen und zentralen Projektionen; der Spiralganglienzellkörper stirbt konsekutiv ab (Dodson und Mohuiddin, 2000; Alam et al., 2007).

Als nicht neuronale Zellen wurden Gliazellen bis jetzt in der Cochlea nur wenig im Hinblick auf die Interaktion mit Neuriten untersucht. Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass Gliazellen durch Sekretion von Neurotrophinen mit den Spiralganglien interagieren und auf sie einen protektiven Einfluss aufweisen (Bampton und Taylor, 2005; Ide, 1996). Eine dauerhafte oder temporäre Expression von Neurotrophinen wurde im sensorischen Epithel des auditorischen Systems während der Entwicklungsphase beobachtet. Die Expression von BDNF, GDNF und NT-3 war postnatal in den Spiralganglien weiter nachweisbar (Ylikoski et al., 1993). Die NGF-Expression konnte in der Cochlea zu keiner Zeit bestätigt werden; hingegen war der korrespondierende Rezeptor zu detektieren (Schecterson und Bothwell, 1994; Dai et al., 2004).

In dieser vorliegenden Arbeit wurden mikrochirurgisch herauspräparierte Spiralganglien von neugeborenen Mäusen vom Typ C57/BL6 im Alter von 4 bis 5 Tagen mit den neurotrophen Faktoren BDNF, GDNF, NT-3 und NGF- β kultiviert. Die Interaktion zwischen den Gliazellen und Neuriten wurde unter Einfluss von Neurotrophinen untersucht. Dabei wurden das Wachstumsverhalten und die Wachstumsdichte in der glia-neuronalen Wechselbeziehung näher charakterisiert.

Als mögliche Optimierung der Cochlea-Implantate ließen sich spezifische neurotrophe Faktoren einsetzen, wodurch neben der glialen Protektion der Spiralganglienzellen auch gerichtetes Neuritenwachstum beispielsweise an die Stimulationselektrode herbeigeführt und die Effektivität der Hörprothesen verbessert werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Für die vorliegende Arbeit wurden Wildtyp-Mäuse beider Geschlechter des Inzuchtstammes C57/BL6 im Alter von 4 bis 5 Tagen verwendet (Abb. 1). Die Muttertiere entstammten aus den Janvier Labs in Frankreich.

Dieser Inzuchtstamm wurde im Jahre 1921 von Clarence Cook Little in der amerikanischen Forschungsanstalt Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) etabliert. Aus dem Inzuchtstamm C57/BL gingen die beiden Inzuchtstämme C57/BL6 und C57/BL10 hervor (Festing, 1979; Festing, 1996).

C57/BL6 Mäuse werden als Tiermodelle zur Erforschung menschlicher Krankheiten eingesetzt. Sie werden vor allem in den Forschungsgebieten der Hämatologie, Neurobiologie, der kardiovaskulären und sensorineuralen Forschung verwendet (Janvier Labs, 2021).

C57/BL6 Mäuse werden ebenfalls als Tiermodelle in der Innenohrforschung eingesetzt; eine altersabhängige Schallempfindungsschwerhörigkeit durch Haarzellverlust konnte bei diesem Inzuchtstamm beobachtet werden (Ison et al., 2007).



Abb. 1: Mäuse vom Typ C57/BL6 (P4-5) mit beiden Muttertieren

2.2 Tierversuche

Die Tierversuche wurden mit der Projektnummer O 13/10 der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums angezeigt; es wurden keine genehmigungspflichtigen tierexperimentellen Untersuchungen durchgeführt. Zum Erwerb des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde am 26.04.2013 an der Versuchstierkunde in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf erfolgreich teilgenommen.

Nach Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes § 7 wurden Tiere mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) getötet und zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. 136 Versuchstiere wurden an 25 Präparationstagen verwendet. Die Präparation erfolgte im Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

2.3 Zellkultursystem

2.3.1 Beschichtung der Zellkulturplatten und Herstellung des Kulturmediums

Das Zellkulturmodell erfolgte in Anlehnung an Lefebvre et al. (Lefebvre et al., 1991a; Lefebvre et al., 1992b). Um die Adhäsion der Spiralganglien-Explantate zu ermöglichen, wurden die Zellkulturplatten (Chamber Slide™) mit Poly-D-Lysin (170 µl/well, Konzentration: 100 µg/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschvorgang mit Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung (D-PBS) (250 µl/well) erfolgte dann die Hinzugabe vom extrazellulären Matrixprotein Laminin (170 µl/well, Konzentration: 5 µg/ml). Nach einer Einwirkzeit von 24 h bei 4 °C erfolgte die erneute Spülung (3 x) mit D-PBS (250 µl/well). Nach dem letzten Absaugen wurden die Kulturplatten zum Trocknen steril zugedeckt.

Die Herstellung des Spiralganglien-Mediums erfolgte aus: 10 ml fertigem Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM), 200 µl B27 Supplement sowie 100 µl Penicillin/Streptomycin (Konzentration: 10.000 U/ml). Folgende Wachstumsfaktoren wurden dem Medium jeweils einzeln in steigender Konzentration zugesetzt (Tab. 1):

Tabelle 1: Neurotrophine

Neurotrophin	Konzentration	Expression
GDNF	10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml	Sf21 <i>insect cells</i> rekombinant, Ratte
BDNF	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml	E.coli rekombinant, human
NGF-β	5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Sf21 <i>cells</i> rekombinant, Ratte
NT-3	10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml	Sf21 <i>insect cells</i> rekombinant, human

Für die Kontrollversuchsreihe wurde kein Wachstumsfaktor zugesetzt. Die Medien mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren und das Kontrollmedium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren wurden bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und 5 % CO₂ für die Präparation in den Brutschrank gestellt.

2.3.2 Mikrochirurgische Präparation der Spiralganglienzellen

Mäuse vom Typ C57/BL6 wurden im Alter von 4 bis 5 Tagen dekapitiert. Nach Entfernung der Kopfhaut sowie Schnauze wurde der Kopf mit einer sterilen Präparationsschere durch das Foramen magnum in der Mitte sagittal in zwei Hälften geteilt. Anschließend wurden vorsichtig das Cerebrum sowie Cerebellum herausgenommen. Die beiden Schädelhälften wurden zur weiteren Präparation in eine vorher mit PBS gefüllte Petrischale gelegt und mit Coolpacks gekühlt. Nun erfolgte die mikrochirurgische Präparation mithilfe eines Operationsmikroskops (OPMI pico, ZEISS). Die mikrochirurgisch-anatomische Präparation der Cochlea erfolgte nach den Beschreibungen von Van De Water und Ruben sowie Sobkowicz et al. (Van De Water und Ruben, 1971; Sobkowicz et al., 1993). Zuerst wurde aus dem noch nicht ganz verknöcherten Labyrinth bzw. der Cochlea das Corti-Organ zusammen mit Stria vascularis und Modiolus vorsichtig frei präpariert. Die membranöse Cochlea wurde dann in eine saubere mit PBS gefüllte Petrischale transferiert. Nach Abtragung der Stria vascularis und des Cortiorgans mit den Haarzellen verblieb das Spiralganglion „tannenbaumartig“ am Modiolus. Anschließend wurde das Spiralganglion ebenfalls vom Modiolus abgetrennt und vorsichtig mit einem Skalpell in 3-4 gleich große Stücke geteilt. Die Spiralganglienzellen wurden im vorher fertiggestellten Medium gesammelt und im Brutschrank bis zum Ende der Präparation bei 37 °C aufbewahrt (Abb. 2).

Aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Ossifikation der Cochleakapsel und nicht fibrosierten inneren Strukturen wurden Mäuse im Alter von 4 bis 5 Tagen verwendet.

2.3.3 Aufbereitung der Spiralganglienkultur

Die fertigen Spiralganglienzellen wurden unter mikroskopischer Sicht einzeln mittig in die vorgewärmten Kammern der Zellkulturplatte eingesetzt. Nach kurzer Antrocknungsphase wurden die Platten mit dem Medium mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor vorsichtig – zuerst mit 50 µl, dann mit 200 µl – befüllt. Für 72 h wurden die Spiralganglien-Explantate im Brutschrank weiter bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

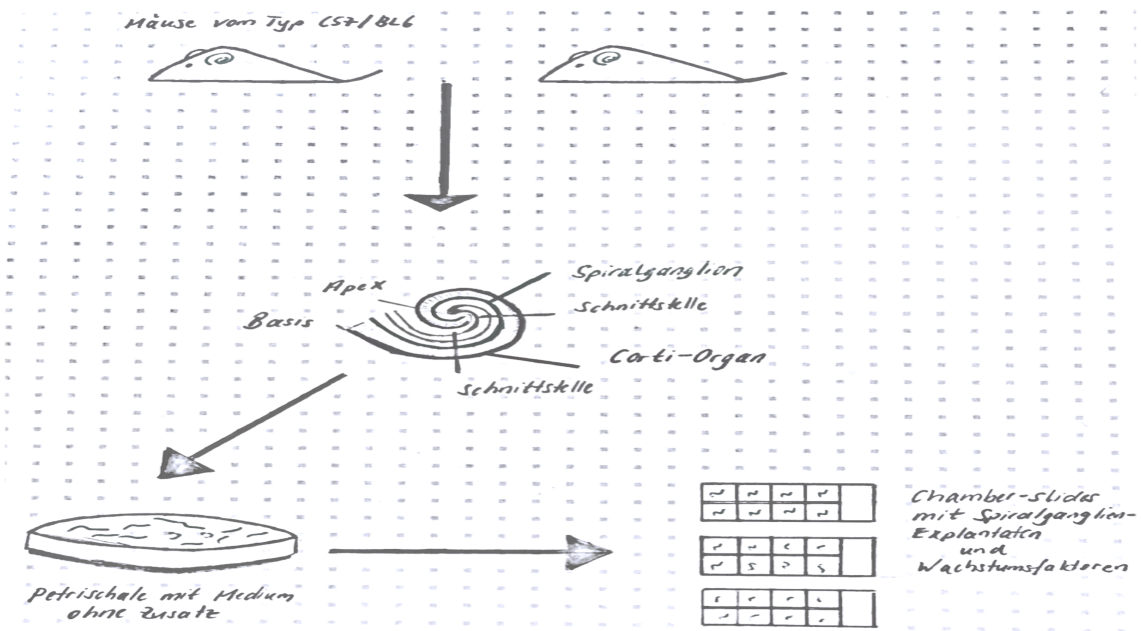


Abb. 2: Schematische Darstellung der Präparation

Nach der Präparation und Isolierung der Spiralganglien aus den Cochleae der Mäuse vom Typ C57/BL6 wurde das Spiralganglion in einen apikalen, medialen sowie basalen Abschnitt aufgeteilt und anschließend mit verschiedenen Wachstumsfaktoren in Chamber-Slides kultiviert.

2.3.4 Fixierung

Nach 72 h Inkubationszeit wurden die Zellkulturen zur weiteren Fixierung aus dem Brutschrank entnommen. Um ein mögliches Ablösen der Explantate vom Boden der Zellkulturplatten zu vermeiden, wurde das Medium aus den Kammern vorsichtig abgesaugt. Nach einmaliger Spülung mit PBS (200 µl/well) für 3 Minuten erfolgte die Fixierung. Die erste Fixierung wurde mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) (200 µl/well) für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach zwei Spülvorgängen mit PBS für 5 Minuten wurde die Methanolfixierung fortgesetzt. Die Zellkulturplatten wurden mit eiskaltem 100 %igem Methanol (200 µl/well) (vorgekühlt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Tiefkühltruhe) befüllt und für 10 Minuten aufbewahrt. Anschließend wurden die Spiralganglien(SG)-Explantate nach der Absaugung des Methanols luftgetrocknet.

2.3.5 Immunfluoreszenz

Vor der Immunhistochemie erfolgte eine Inkubation der Zellkulturen mit einer Blocking-Solution für 30 Minuten, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden. Diese Blocking-Solution bestand aus 10 % chicken Serum, 0.1 % Tween-20 und 1 % bovinem Serumalbumin sowie PBS.

Nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz wurden Primärantikörper zur Darstellung der Neuriten und nicht myelinisierten Schwanzzellen sowie Sekundärantikörper zur Färbung der darzustellenden Elemente eingebracht.

Als Primärantikörper wurden Gammaglobuline p75(NTR)-Antikörper der Spezies Ziege in einer Verdünnung von 1:600 und β -III-Tubulin-Antikörper der Spezies Maus in einer

Verdünnung von 1:200 in die Blocking-Solution gegeben, und damit wurden die Zellkulturplatten bei 4 °C für 12 bis 14 h inkubiert. Nach zwei Waschvorgängen mit PBS (200 µl/well) wurden die Sekundärantikörper hinzugegeben und 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden Gammaglobuline Alexa Fluor 594 (anti-Ziege) in einer Verdünnung von 1:500 sowie Alexa Fluor 488 (anti-Maus) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS verwendet (Tab. 2). Nach zweimaligem Waschvorgang mit PBS wurden die Kammer der Chamber Slides entfernt. Zuletzt wurden zu den SG-Explantaten 10 µl Mounting VectorShield mit 4'6-Diamidin-2-phenylindo(DAPI)-Lösung zur Darstellung der allgemeinen Zellkerne gegeben (Tab. 3). Nachdem die Präparate mit Deckgläschen (21 x 26 mm) eingedeckelt wurden, wurden diese mit Nagellack von außen versiegelt und im Dunkeln bei 4 °C bis zur mikroskopischen Begutachtung aufbewahrt.

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper:			
p75(NTR)-AK	Ziege	1:600	R&D Systems Minneapolis, USA
β-III-Tubulin-AK	Maus	1:200	R&D Systems Minneapolis, USA
Sekundärantikörper:			
Alexa Fluor 594 (anti-Ziege) Huhn		1:500	Invitrogen Waltham, USA
Alexa Fluor 488 (anti-Maus) Huhn		1:500	Invitrogen Waltham, USA

Tabelle 3: DNA-Markierung

Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
4'6-Diamidin-2-phenylindol(DAPI)-Lösung Biotechnology, Mounting VectorShield	SantaCruz Dallas, USA

2.3.6 Morphologische Auswertung der Zellkulturen

Durch die Anbindung der digitalen Fotokamera (Nikon D5000) an das Fluoreszenz-Durchlichtmikroskop (Olympus BX40) konnten Abbildungen der Zellkulturen zur Dokumentation erzeugt werden. Mithilfe von Fluoreszenzfiltern konnten die

darzustellenden Strukturen durch die Sekundärantikörper verdeutlicht werden. Durch die rot fluoreszierende Farbe von Alexa Fluor 594 konnten die Schwanzzellen abgebildet werden, durch die grün leuchtende Farbe von Alexa Fluor 488 wurden die Neuriten und durch DAPI wurden die Zellkerne blau markiert.

Zunächst erfolgte eine Übersichtsaufnahme von jedem Explantat in 10-facher Vergrößerung, zur Detailanalyse wurden dann 20-fache und 40-fache Vergrößerungen herangezogen. Nachfolgend wurden die digitalen Bilder auf das Bildanalyseprogramm ImageJ (Version 1.0) übertragen. Dabei wurden die Aufnahmen des gleichen Explantats mit der jeweiligen Antikörperdarstellung und der Zellkernmarkierung in der gleichen Vergrößerung zu einem Bild überlagert (Montage) (Abb. 3). Nach der Skalierung sowie Kalibrierung des Bildmaterials wurde die Bearbeitung abgeschlossen.

Die Vermessung der auswachsenden Neuriten erfolgte in 20-facher Vergrößerung mit der sogenannten „Quadrantentechnik“. Das Spiralganglien-Explantat wurde durch einen Längsschnitt und Querschnitt in der Mitte in vier gleich große Partien geteilt (Abb. 4). Das Viertel des SG-Explantats mit der höchsten visuellen Dichte an Neuriten wurde zur weiteren Analyse betrachtet. Dies hatte den Vorteil, dass nicht repräsentative Abweichungen an Neuritendichte sowie Neuritenlänge vermieden wurden. Mit dem ImageJ-Programm wurden die einzelnen Neuriten jeweils manuell am Computer nachgezeichnet und ausgemessen (Abb. 5). Die Länge und Anzahl des Neurits wurden abhängig vom Wachstumsfaktor und von der speziellen Konzentration ermittelt und in eine Excel-Tabelle eingefügt. Bei Neuritenabzweigungen wurde der längste Neurite (Hauptstamm) ausgewählt.

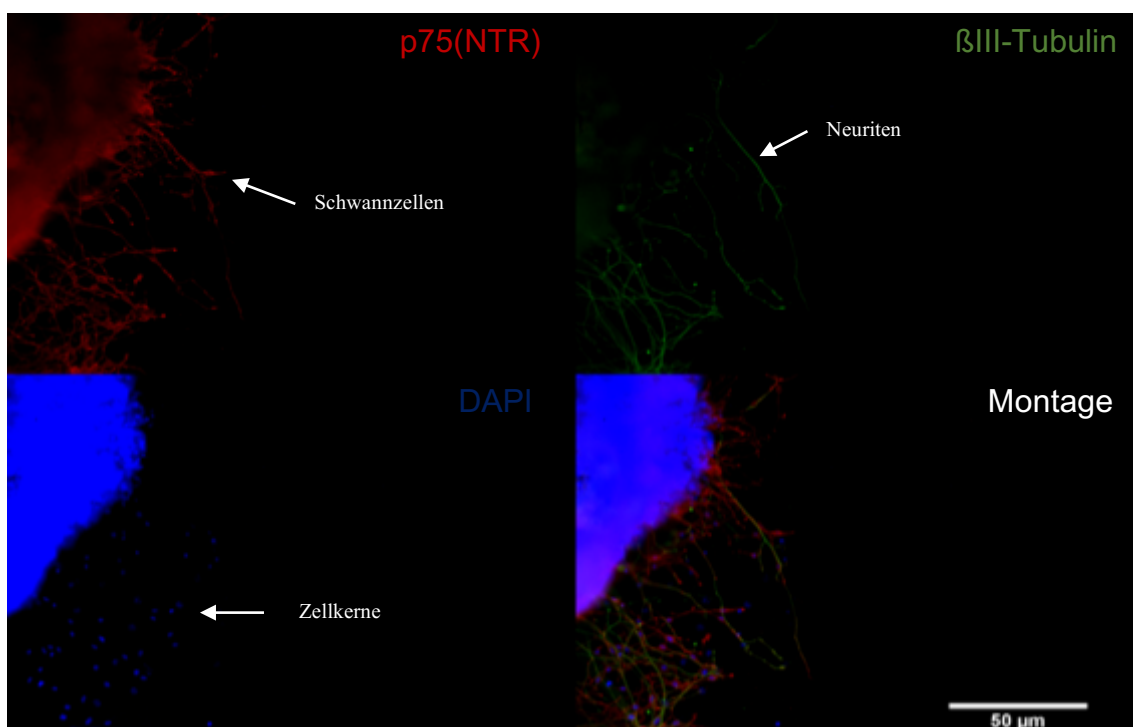


Abb. 3: Bildbearbeitung (Montage) mit ImageJ Software, 20-fache Vergrößerung

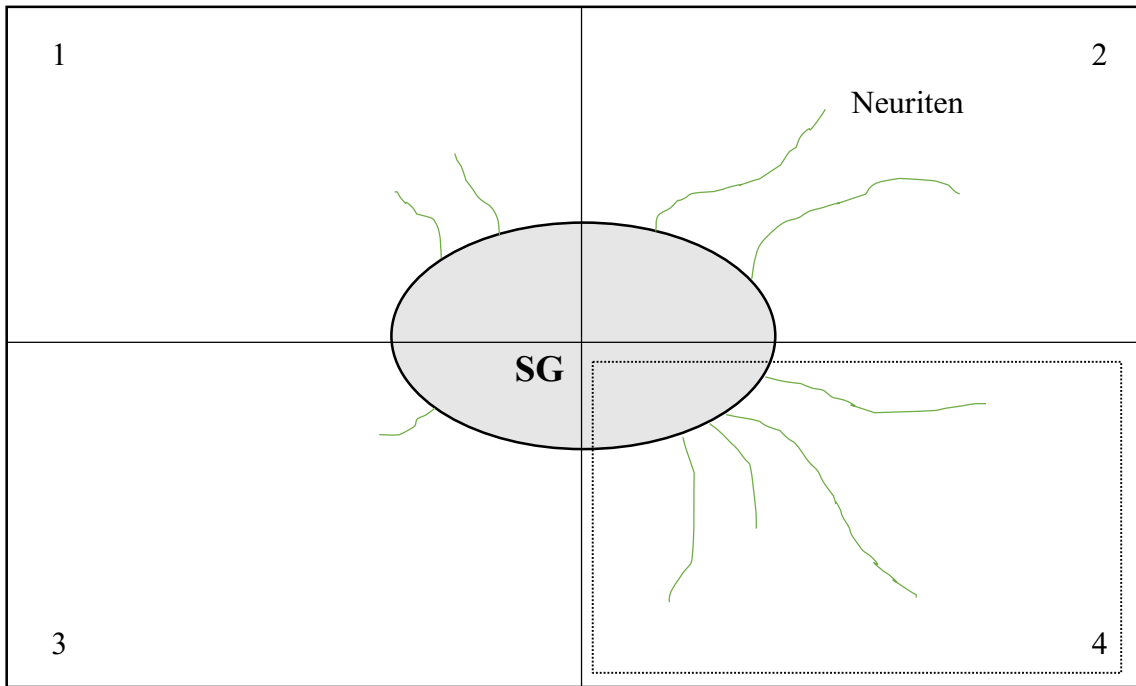


Abb. 4: Schematische Darstellung und Einteilung eines Spiralganglion-Explantates – „Quadrantentechnik“

Zentrale Positionierung eines SG-Explantates sowie dessen Einteilung in vier gleich große Parteien (1–4). Das Viertel mit den meisten Neuriten (grün) wurde zur Auswertung herangezogen (hier beispielsweise das Viertel mit der Nummerierung 4 rechts unten).

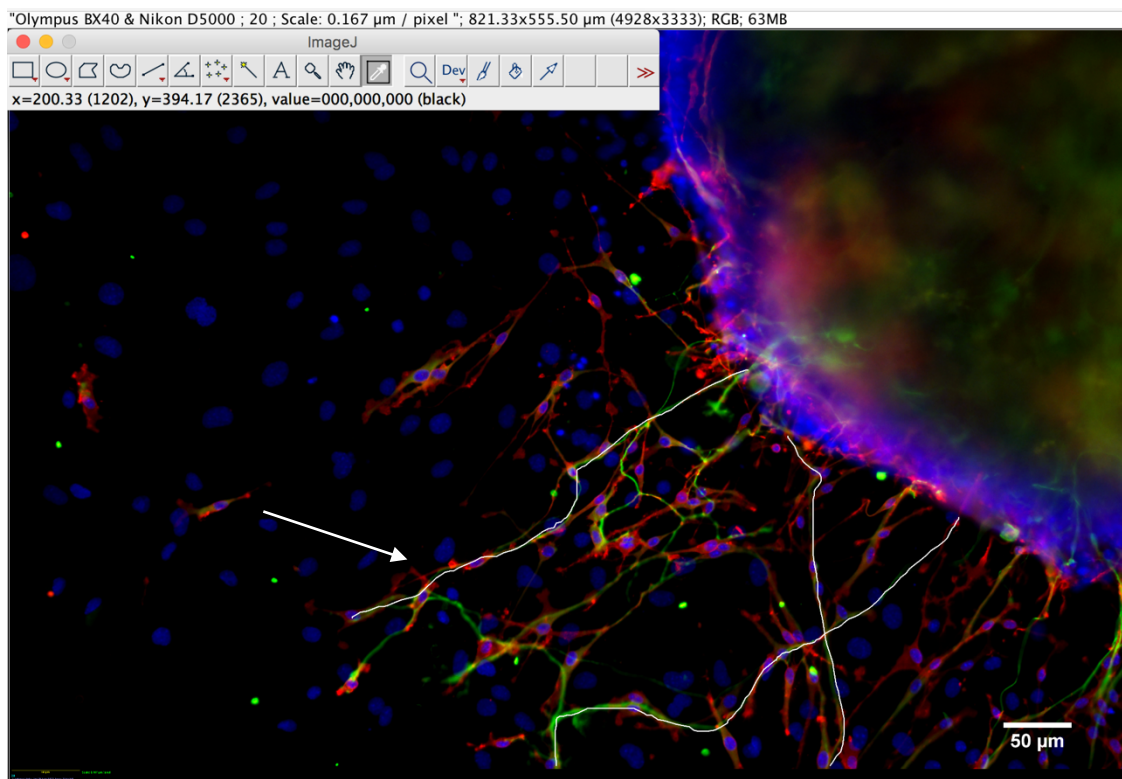


Abb. 5: Screenshot von ImageJ Software, 20-fache Vergrößerung

Die auswachsenden Neuriten (grün) wurden nach erfolgter Skalierung und Kalibrierung manuell mit der Computermaus nachgezeichnet (Pfeil, weisse Linien).

2.3.7 Testverfahren und Statistik

Daten über die Neuritenlänge sowie Neuritenanzahl unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren in verschiedenen Konzentrationsstufen wurden erhoben. Mithilfe des Programms SPSS (IBM, Version 22) wurden die Daten ausgewertet. Der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung der Neuritenlängen wurden unter dem Einfluss des jeweiligen Wachstumsfaktors sowie in der Kontrollreihe ermittelt. Ein Vergleich erfolgte zwischen den verschiedenen Wachstumsfaktoren und der Kontrolle sowie zwischen den Konzentrationsstufen eines Wachstumsfaktors. Das Vorliegen einer Normalverteilung innerhalb der Konzentrationsvariationen eines Wachstumsfaktors wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde die Voraussetzung für eine Varianzanalyse (ANOVA) erfüllt. Für den Fall eines nicht normalverteilten Datensatzes wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis angewandt, und das Signifikanzniveau wurde durch die Bonferroni-Methode korrigiert.

Das Signifikanzniveau war folgendermaßen adjustiert: $p > 0.05$ = nicht signifikant, $p < 0.05$ = signifikant unterschiedlich, $p < 0.01$ = hochsignifikant unterschiedlich.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 136 Mäuse vom Typ C57/BL6 im Alter von 4 bis 5 Tagen verwendet. Aus jeder Cochlea konnten durchschnittlich 3 bis 4 Explantate gewonnen werden. Aus insgesamt 411 gewonnenen SG-Explantaten konnten somit 272 SG-Explantate ausgewertet werden.

80 Explantate wurden mit NT-3 kultiviert, davon konnte bei 54 Explantaten ein Wachstumsverhalten eruiert werden. Die Überlebensrate unter Kulturbedingungen betrug 67 %. Unter GDNF wuchsen von 58 Explantaten 41 aus, dies entsprach einer Überlebensrate von 70 %. Bei 92 mit BDNF kultivierten SG-Explantaten überlebten 57, dementsprechend lag die Überlebensrate bei 61 %. Unter NGF- β überlebten 65 Explantate von 94, und damit wurde die Überlebensrate von 69 % erzielt. Für die Kombination aus BDNF und NGF- β wurden 19 Explantate kultiviert, von denen 14 Explantate ein Wachstumsverhalten zeigten, was ein Überleben von 73 % bedeutete.

Von den 272 ausgewachsenen Explantaten wurden 20 % mit NT-3, 15 % mit GDNF, 21 % mit BDNF und 24 % mit NGF- β sowie 5 % mit der Kombination aus BDNF und NGF- β kultiviert (Tab. 4). 41 von 82 Explantaten (50 %) überlebten ohne Zusatz eines Wachstumsfaktors in der Kontrollversuchsreihe. Dies stellte einen Anteil von 15 % der Gesamtzahl der ausgewachsenen Explantate dar.

3.1 Einfluss von Neurotrophinen auf Längenwachstum der Neuriten von Spiralganglienzellen

Der Einfluss von neurotrophen Faktoren auf das Längenwachstum der Neuriten wurde betrachtet, dabei erfolgte die Längenauswertung in den jeweiligen Konzentrationsvariationen innerhalb einer Neurotrophingruppe und im Vergleich zu der Kontrollversuchsreihe.

Unter dem Einfluss von NGF- β betrug die minimale durchschnittliche Neuritenlänge $172 \mu\text{m} \pm 88 \mu\text{m}$ bei einer Konzentration von 5 ng/ml und die maximale durchschnittliche Neuritenlänge $266 \mu\text{m} \pm 91 \mu\text{m}$ bei einer Konzentration von 25 ng/ml. Bei der höchsten NGF- β -Konzentration von 100 ng/ml wurde eine durchschnittliche Neuritenlänge von $196 \mu\text{m} \pm 71 \mu\text{m}$ ermittelt. Ab einer NGF- β -Konzentration von 50 ng/ml zeigte sich ein gleichbleibendes Neuritenlängenwachstum. Die statistische Auswertung mit Chi-Quadrat (3) = 75,398 und $p < 0,01$ zeigte ein unterschiedliches, demzufolge ein konzentrationsabhängiges Längenwachstum bei Zugabe von NGF- β (Abb. 6).

Bei Hinzugabe von BDNF zeigten die Messungen eine durchschnittliche Neuritenlänge von $484 \mu\text{m} \pm 322 \mu\text{m}$ bei einer Konzentration von 10 ng/ml, $528 \mu\text{m} \pm 266 \mu\text{m}$ bei einer Konzentration von 50 ng/ml, $541 \mu\text{m} \pm 269 \mu\text{m}$ bei einer Konzentration von 100 ng/ml sowie $540 \mu\text{m} \pm 192 \mu\text{m}$ bei einer Konzentration von 250 ng/ml. Statistisch konnte mit Chi-Quadrat (3) = 2,303 und $p > 0,05$ ein unterschiedliches d.h. konzentrationsabhängiges Längenwachstum in den jeweiligen Konzentrationsstufen bei BDNF nicht hergeleitet werden (Abb. 7).

Die durchschnittliche Neuritenlänge variierte in der GDNF-Versuchsreihe zwischen $348 \mu\text{m} \pm 215 \mu\text{m}$ und $465 \mu\text{m} \pm 245 \mu\text{m}$ (Abb. 8). Auch hier konnte ein konzentrationsabhängiges Längenwachstum unter GDNF-Einfluss nicht gezeigt werden. Die durchschnittliche Neuritenlänge war zwischen den jeweiligen Konzentrationsvariationen mit Chi-Quadrat (2) = 3,390 und $p > 0,05$ nicht signifikant unterschiedlich.

Bei einer Konzentration von 10 ng/ml erreichte NT-3 eine durchschnittliche Neuritenlänge von $414 \mu\text{m} \pm 180 \mu\text{m}$. Bei weiterer Steigerung der NT-3-Konzentration auf 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml nahm die durchschnittliche Neuritenlänge auf $279 \mu\text{m} \pm 181 \mu\text{m}$ bzw. $255 \mu\text{m} \pm 89 \mu\text{m}$ ab. Bei der Steigerung der NT-3-Konzentration auf das 10-Fache von 10 ng/ml auf 100 ng/ml halbierte sich die Neuritenlänge. Eine wesentliche Abnahme der durchschnittlichen Neuritenlänge ab der Konzentration von 50 ng/ml bis 100 ng/ml wurde nicht beobachtet. Die Vergleiche der Konzentrationsstufen von NT-3 zeigten hochsignifikante Unterschiede bei den durchschnittlichen Neuritenlängen in den jeweiligen Konzentrationsstufen (Abb. 9). Mit Chi-Quadrat (3) = 75,398 und $p < 0,01$ konnte ein unterschiedliches Längenwachstum in Abhängigkeit der NT-3-Konzentration ermittelt werden.

Bei Zugabe von BDNF (10 ng/ml) und NGF- β (25 ng/ml) in der Kombination wurde eine durchschnittliche Neuritenlänge von $287 \mu\text{m} \pm 99 \mu\text{m}$ erfasst. In der Vergleichsanalyse zeigte die Neurotrophinkombination BDNF (10 ng/ml) mit NGF- β (25 ng/ml) gegenüber NGF- β (25 ng/ml) mit $p > 0,05$ keinen signifikanten Unterschied, indes wurde ein hochsignifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ bei der Neurotrophinkombination gegenüber BDNF (10 ng/ml) festgestellt.

Im Vergleich zu der Kontrollversuchsreihe lag bei Zugabe aller neurotrophen Faktoren ein hochsignifikanter Unterschied im Längenwachstum mit $p < 0,01$ vor; damit zeigten alle Wachstumsfaktoren einen signifikant positiven Einfluss auf das Längenwachstum der Neuriten.

Tabelle 4: Übersicht über die Verteilung der SG-Explantate sowie deren Längen und Anzahl auswachsender Neuriten bei verschiedenen Konzentrationsstufen des jeweiligen neurotrophen Faktors

Wachstumsfaktor <i>n</i> = Explantatanzahl	Konzentration in ng/ml	Neuritenlänge in μm (Standardabweichung)	Gesamtneuritenanzahl (durchschnittliche Neuritenanzahl pro Quadrant)
NT-3 (<i>n</i> = 19)	10 ng/ml	414 μm (180 μm)	58 (σ 3.0)
NT-3 (<i>n</i> = 23)	50 ng/ml	279 μm (181 μm)	27 (σ 1.1)
NT-3 (<i>n</i> = 12)	100 ng/ml	255 μm (89 μm)	40 (σ 3.3)
GDNF (<i>n</i> = 18)	10 ng/ml	400 μm (231 μm)	24 (σ 1.3)
GDNF (<i>n</i> = 13)	25 ng/ml	465 μm (245 μm)	38 (σ 2.9)
GDNF (<i>n</i> = 10)	50 ng/ml	348 μm (215 μm)	11 (σ 1.1)
BDNF (<i>n</i> = 16)	10 ng/ml	484 μm (322 μm)	41 (σ 2.5)
BDNF (<i>n</i> = 14)	50 ng/ml	529 μm (266 μm)	21 (σ 1.5)
BDNF (<i>n</i> = 12)	100 ng/ml	541 μm (269 μm)	62 (σ 5.1)
BDNF (<i>n</i> = 15)	250 ng/ml	540 μm (192 μm)	32 (σ 2.1)
NGF- β (<i>n</i> = 18)	5 ng/ml	172 μm (88 μm)	84 (σ 4.6)
NGF- β (<i>n</i> = 17)	25 ng/ml	266 μm (91 μm)	117 (σ 6.8)
NGF- β (<i>n</i> = 11)	50 ng/ml	209 μm (65 μm)	72 (σ 6.5)
NGF- β (<i>n</i> = 19)	100 ng/ml	196 μm (71 μm)	72 (σ 3.7)
Kombi aus BDNF und NGF- β (<i>n</i> = 14)	10 ng/ml 25 ng/ml	287 μm (99 μm)	39 (σ 2.7)
Kontrolle (<i>n</i> = 41)		163 μm (73 μm)	64 (σ 4)

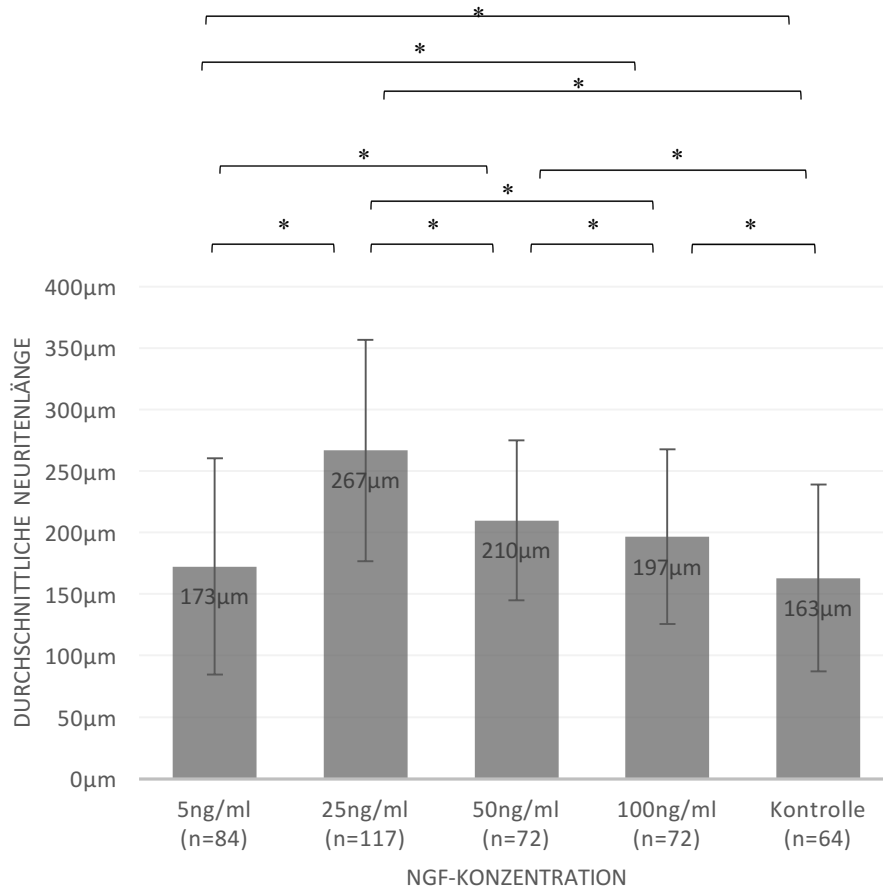


Abb. 6: Durchschnittliche Neuritenlänge (mit Standardfehler) in Abhängigkeit von der NGF- β -Konzentration und in der Kontrollgruppe

Signifikante Längenunterschiede der auswachsenden Neuriten zwischen NGF- β -Konzentrationsstufen und im Vergleich zur Kontrollgruppe mit * $p < 0,01$.

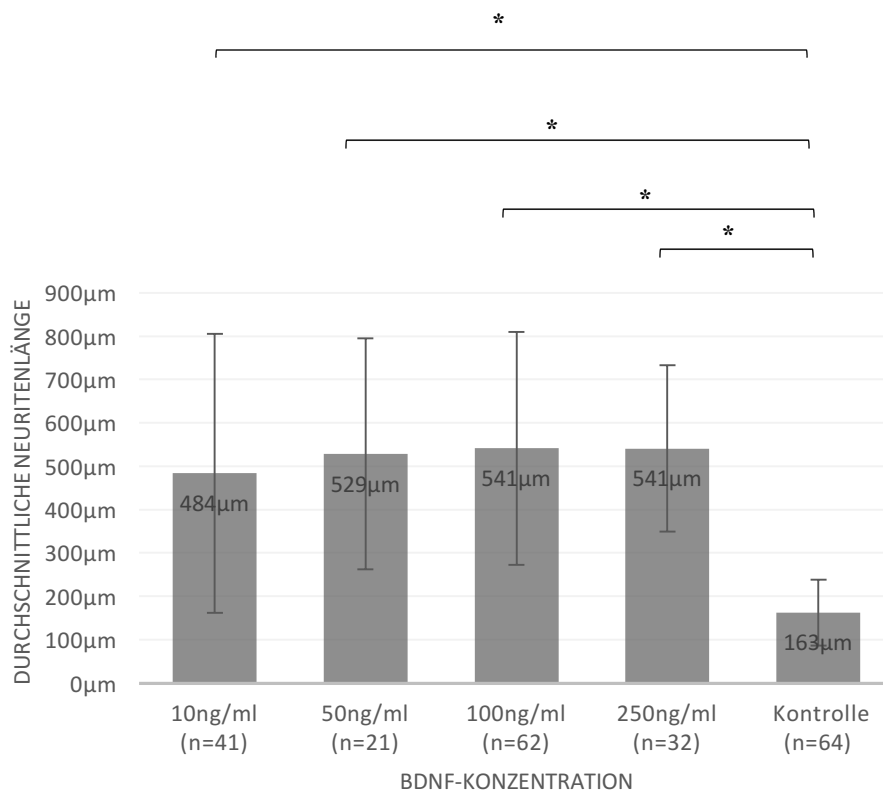


Abb. 7: Durchschnittliche Neuritenlänge (mit Standardfehler) in Abhängigkeit von BDNF-Konzentration und in der Kontrollgruppe

Kein signifikanter Längenunterschied der auswachsenden Neuriten zwischen BDNF-Konzentrationsstufen, signifikanter Längenunterschied aller Konzentrationsstufen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit * $p < 0,01$.

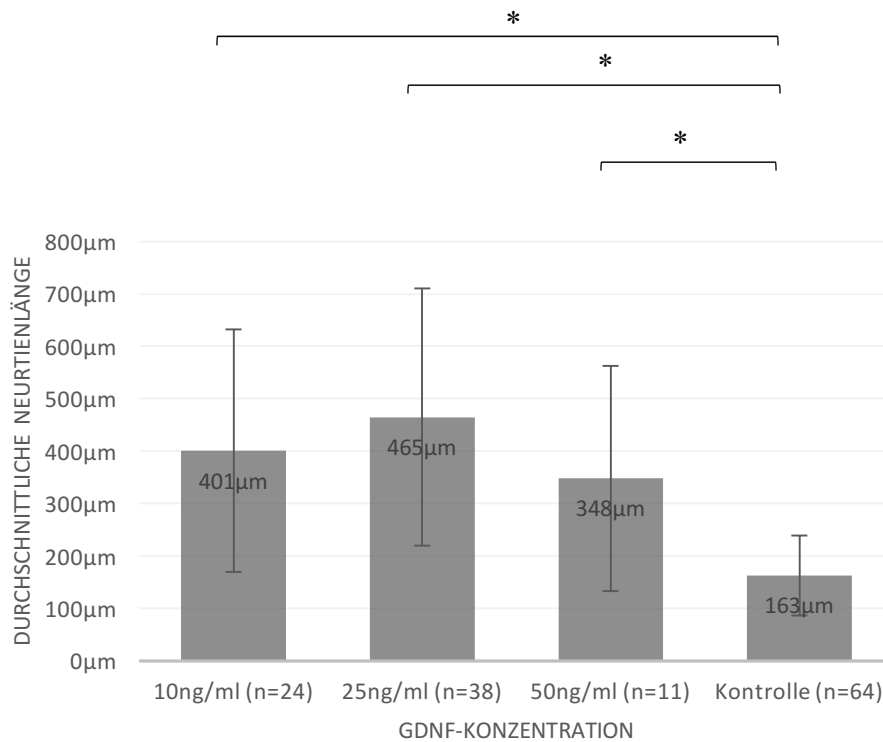


Abb. 8: Durchschnittliche Neuritenlänge (mit Standardfehler) in Abhängigkeit von GDNF-Konzentration und in der Kontrollgruppe

Kein signifikanter Längenunterschied der auswachsenden Neuriten zwischen GDNF-Konzentrationsstufen, signifikanter Längenunterschied aller Konzentrationsstufen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit * $p < 0,01$.

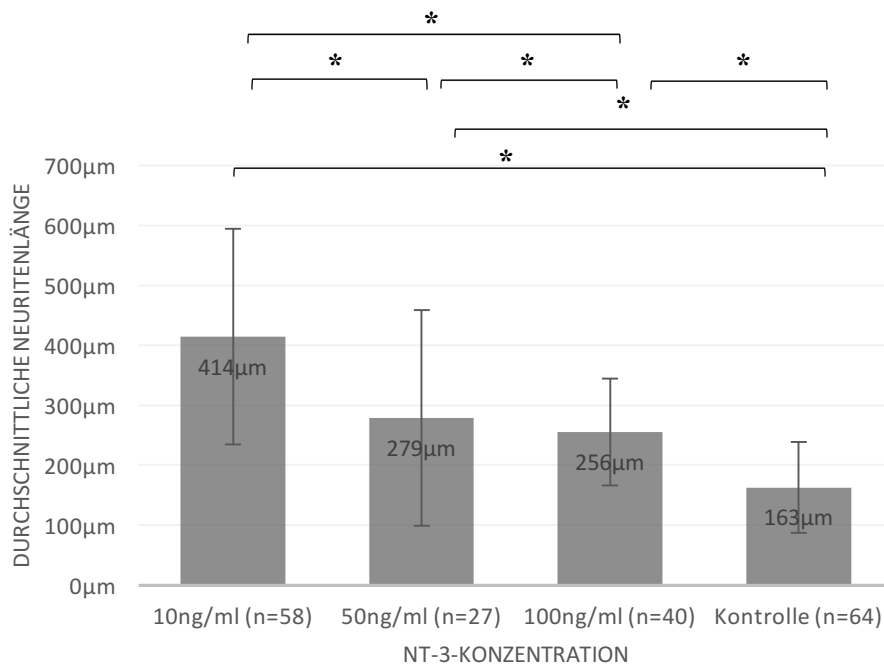


Abb. 9: Durchschnittliche Neuritenlänge (mit Standardfehler) in Abhängigkeit von NT-3-Konzentration und in der Kontrollgruppe

Signifikanter Längenunterschied der auswachsenden Neuriten zwischen NT-3-Konzentrationsstufen und im Vergleich zur Kontrollgruppe mit * $p < 0,01$.

3.2 Einfluss von Neurotrophinen auf glia-neuronale Interaktion

3.2.1 Reduziertes Neuritenlängenwachstum bei überwiegender glialer Zellpopulation unter Einfluss von NGF- β

Unter dem Einfluss von NGF- β zeigten sich ein Auftreten zahlreicher nicht myelinisierter Schwannzellen sowie ein vermehrtes Auswachsverhalten der Neuriten aus der Spiralganglienzelle (Abb. 10). Eine intensive glia-neuronale Interaktion ließ sich erkennen. Die auswachsenden Neuriten wurden von den nicht myelinisierenden Schwannzellen dicht ummantelt, sodass sie verborgen blieben. Im weiteren Verlauf trafen sich die Neuriten wieder und bildeten Bündelungen (Abb. 12).

Die Schwannzellen bildeten insbesondere untereinander Faszikulationen (Abb. 11 und 12). Auch bei fehlendem Auswachsen der Neuriten interagierten die Schwannzellen untereinander und wiesen ein großes Migrationsverhalten auf. Zunächst traten die Schwannzellen gebündelt in einer vertikalen Linie zum SG-Explantat auf, dann änderten sie ihre Richtung und drehten sich horizontal zum Explantat und hielten sich in der unmittelbaren Umgebung auf (Abb. 11). Eine vermehrte Anreicherung von β -III-Tubulin-AK fand im Zytoplasma der Schwannzellen neben der eigentlichen Farbmarkierung mit p75(NTR) statt (Abb. 13). Unter diesen Bedingungen ließen sich die aussprossenden Neuriten aus der Spiralganglienzelle nur morphologisch von den Gliazellen abgrenzen.

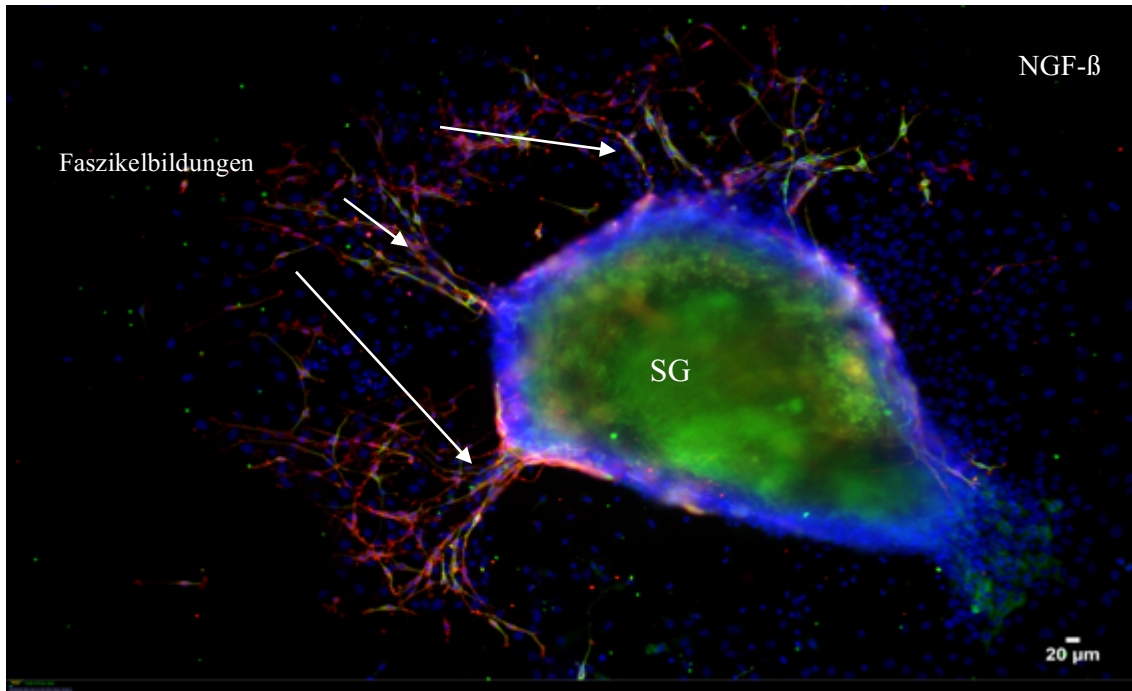


Abb. 10: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von NGF- β (5 ng/ml), 10-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Überwiegende Faszikelbildung innerhalb der Schwannzellpopulation. Dominierende Schwannzellproliferation unter Einfluss von NGF- β .

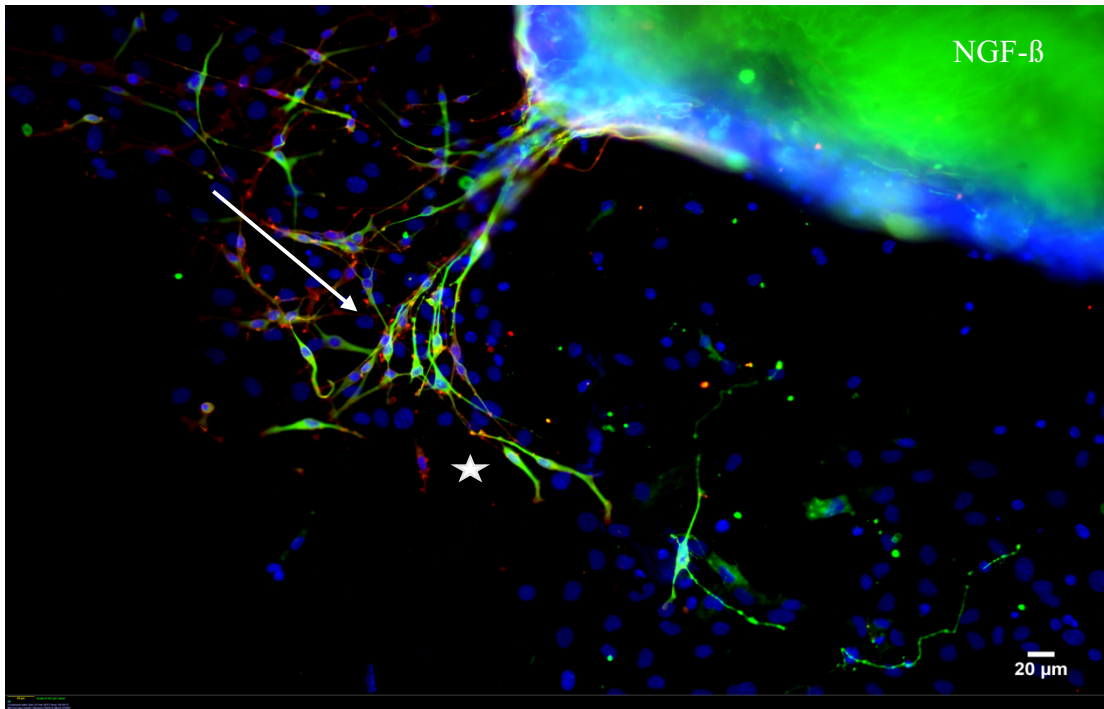


Abb. 11: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von NGF- β (5 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Verborgene Neuriten innerhalb der Faszikel durch Schwannzellen. Unter dem Einfluss von NGF- β Aufnahme von β -III Tubulin durch Schwannzellen (Pfeil) und horizontale Ausrichtung der Schwannzellen (*).

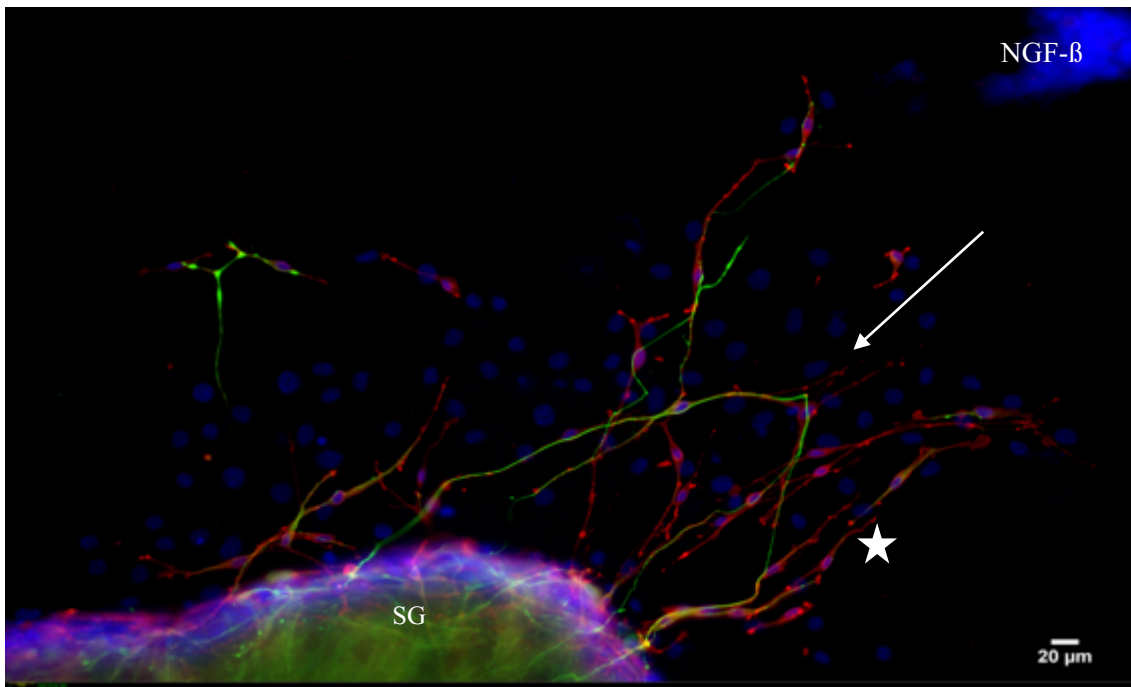


Abb. 12: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von NGF- β (5 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Zusammentreffen der Neuriten (Pfeil). Schwannzellen begleiten den Neuriten, interagieren auch untereinander mit Faszikelbildung (*).

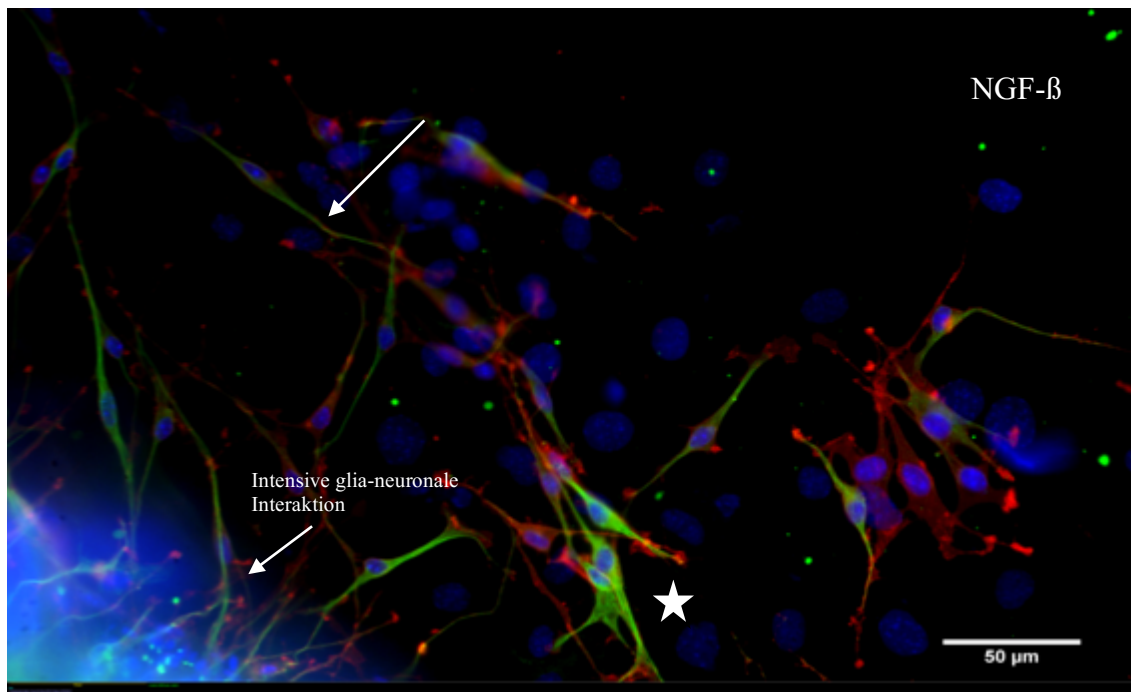


Abb. 13: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von NGF- β (5 ng/ml), 40-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Aufnahme von β -III Tubulin im Zytoplasma der Schwannzellen (*). Unter Einfluss von NGF- β demaskiert sich eine intensive glia-neuronale Interaktion, vermehrtes Auswuchsverhalten der Neuriten. Neuriten sind von Schwannzellen teilweise verdeckt (Pfeile).

3.2.2 Dominierendes Neuritenlängenwachstum und erhöhtes Migrationsverhalten der Schwannzellen unter Einfluss von BDNF

Unter den neurotrophen Faktoren GDNF, NT-3 und NGF- β imponierte besonders bei BDNF ein deutliches Neuritenwachstum mit dominierendem Längenwachstum aus dem Spiralganglienexplantat. Dabei zeigte sich ein asymmetrisches Aussprossungsmuster der Neuriten aus den Spiralganglienzellen (Abb. 14). An den Neuritenaustrittsstellen am Explantat konnte ein dichtes Auftreten von nicht myelinisierten Gliazellen beobachtet werden. Diese dockten mit ihrem Perikaryon in der gesamten Länge an den Neuriten an. Die Mehrheit stand in engem Kontakt mit den aussprossenden Neuriten in der unmittelbaren Umgebung des Spiralganglienexplantates. Anschließend nahmen die meisten Neuriten bezüglich des Längenwachstums einen radiären Verlauf ein. Dabei überkreuzten sie sich, zweigten sich weiter auf und gaben weitere Seitenäste ab. Während einzelne Neuriten „ungehemmt“ in die Länge wachsen konnten, waren zunächst keine Interaktionen zwischen den Neuriten und nicht neuronalen Zellen auf längere Strecken erkennbar. Erst an der distalen Neuritenendigung befanden sich erneut kleine Gliazellen, die sich an Neuriten anlagerten und auf eine erhöhte Migrationseigenschaft deuteten (Abb. 15). Diese „kleinen“ Schwannzellen zeigten eine Zellkern-Zytoplasma-Verschiebung zugunsten des Zytoplasmas.

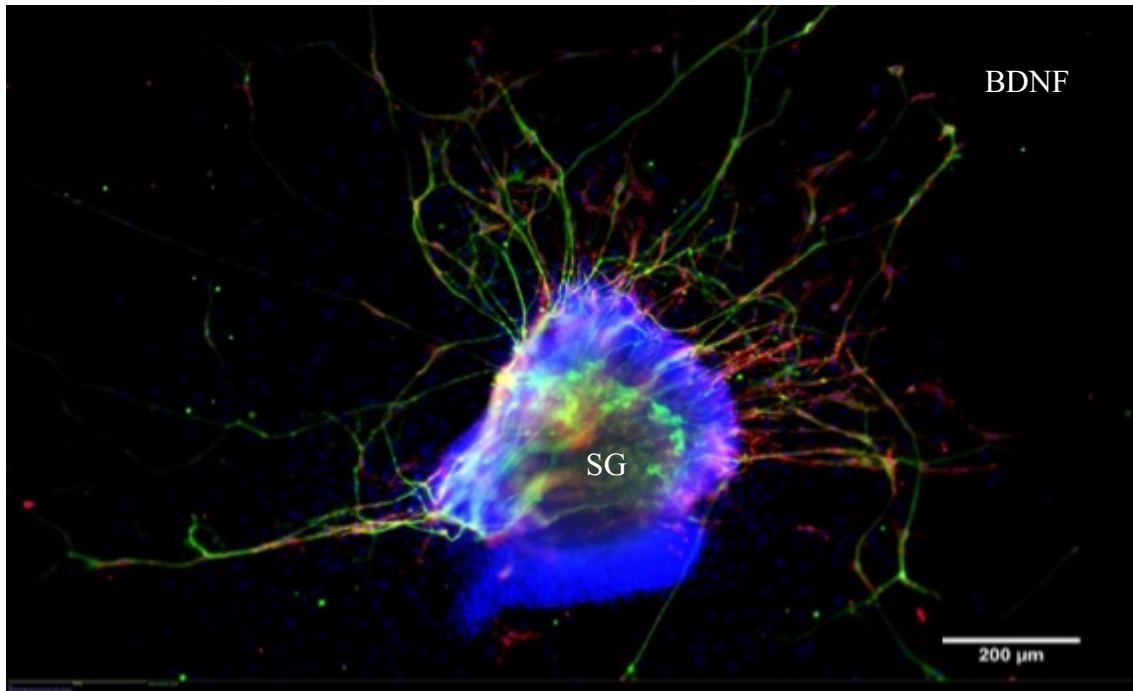


Abb. 14: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von BDNF (10 ng/ml), 10-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwanzzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Asymmetrisches Wachstumsmuster der Neuriten. Starkes Neuriten- und Schwanzzellenwachstum unter dem Einfluss von BDNF.

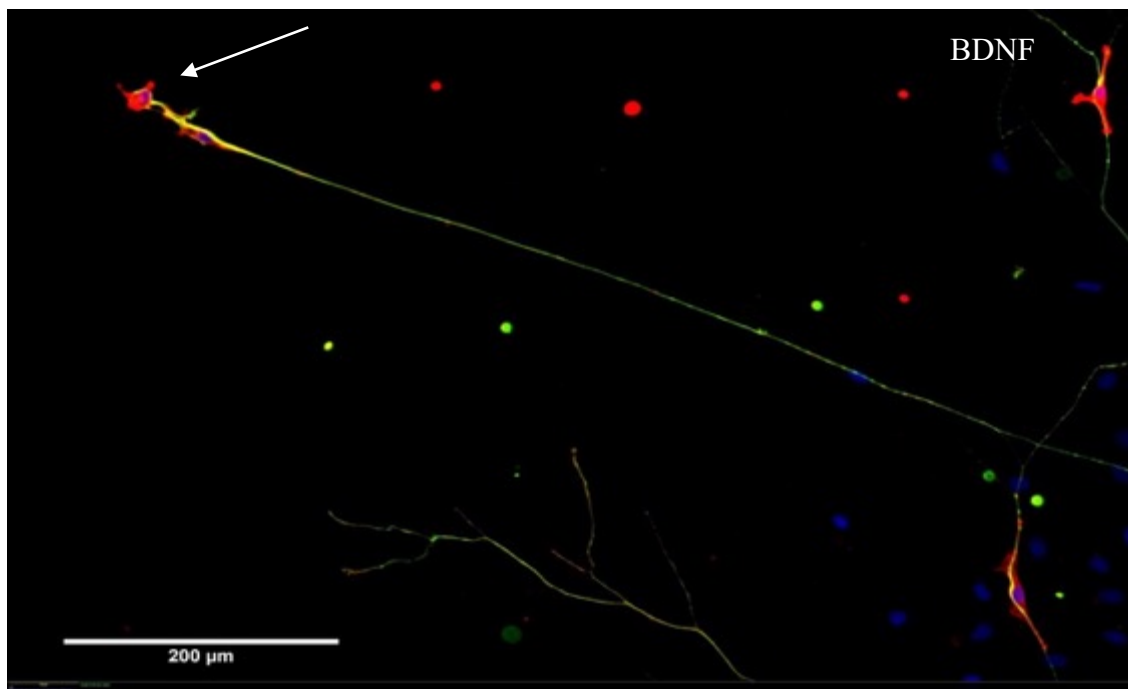


Abb. 15: Immunfluoreszenzbild eines aussprossenden Neuriten aus dem Spiralganglienexplantat nach Zugabe von BDNF (10 ng/ml), 40-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwanzzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Erhöhte Migration der Gliazellen. Verminderter glialer Kontakt bei starkem Längenwachstum der Neuriten unter BDNF-Wirkung sowie Lokalisation der Schwanzzellen am distalen Neuritenende.

3.2.3 Intensiver glialer Kontakt beim Neuritenwachstum unter Einfluss von GDNF

Die nicht myelinisierten Schwannzellen zeigten unter dem Einfluss von GDNF eine differenzierte Morphologie. In der Peripherie befanden sich vermehrt Schwannzellen mit rundlichem Perikaryon, einem breiten Zytoplasmasaum mit unregelmäßigen Zytoplasmarrändern (Zytoplasmabegrenzungen) und mit multiplen Zytoplasmaausläufern. Morphologisch entsprach dies einer vermehrten Ausbildung von Lamellipodien (Abb. 16). Die Schwannzellen, die engen Kontakt zu den Neuriten hatten, besaßen wie unter der Wirkung von den neurotrophen Faktoren BDNF, NGF- β sowie NT-3 eine längsovale Form mit einem feinen, schmalen Zytoplasma (Abb. 17 und 18). Eine intensive Bindung bestand zwischen den auswachsenden Neuriten und den Schwannzellen. Die Schwannzellen umhüllten den Neuriten dicht, welcher als einer der wenigen Neuriten aus dem Spiralganglienexplantat herauswuchs. Die Ausrichtung der Gliazellen vermittelte den Eindruck, den heranwachsenden Neuriten in eine bestimmte Richtung zu lenken. Wie „Wegweiser“ positionierten sich die Schwannzellen vertikal zum Spiralganglienexplantat. Insgesamt war die Anzahl der Schwannzellen viel höher als die der aus dem SG-Explantat aussprossenden Neuriten (Abb. 16). Die Neuriten neigten dazu, Faszikeln zu bilden. An der Faszikelbildung und den nervalen Endverzweigungen waren auch die Gliazellen zu finden (Abb. 19).

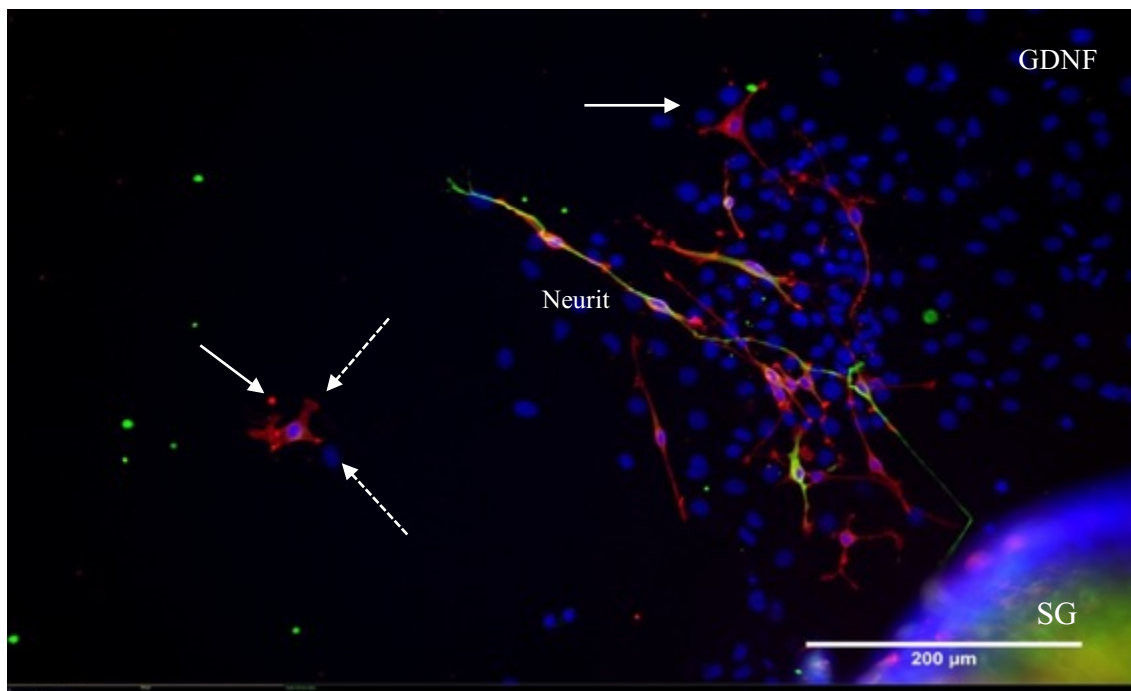


Abb. 16: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von GDNF (10 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Intensive Anbindung der Schwannzellen an isolierte aussprossende Neuriten. Rundliches Perikaryon (Pfeile) und lamellipodiale Erscheinung des Zytoplasmas der Schwannzellen in der Peripherie unter Einfluss von GDNF (gestrichelte Pfeile).

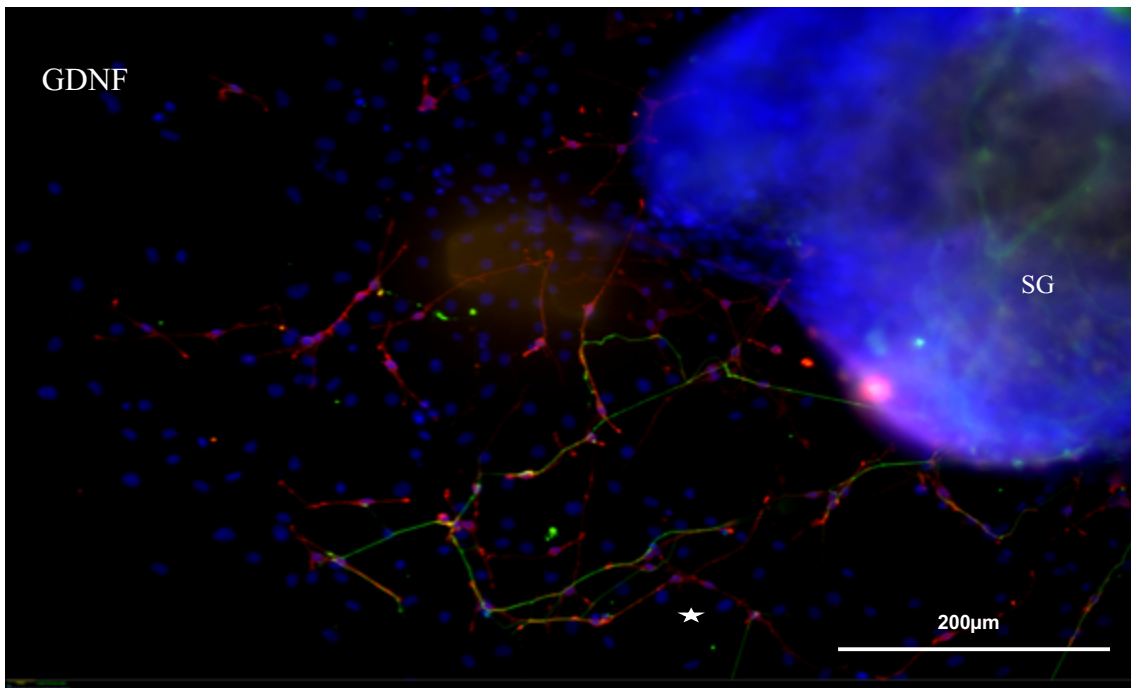


Abb. 17: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von GDNF (50 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Schwannzellen als „Wegweiser“ für auswachsende Neuriten. Lang gestreckte, schmale Schwannzellen im engen neuronalen Kontakt unter GDNF (*).

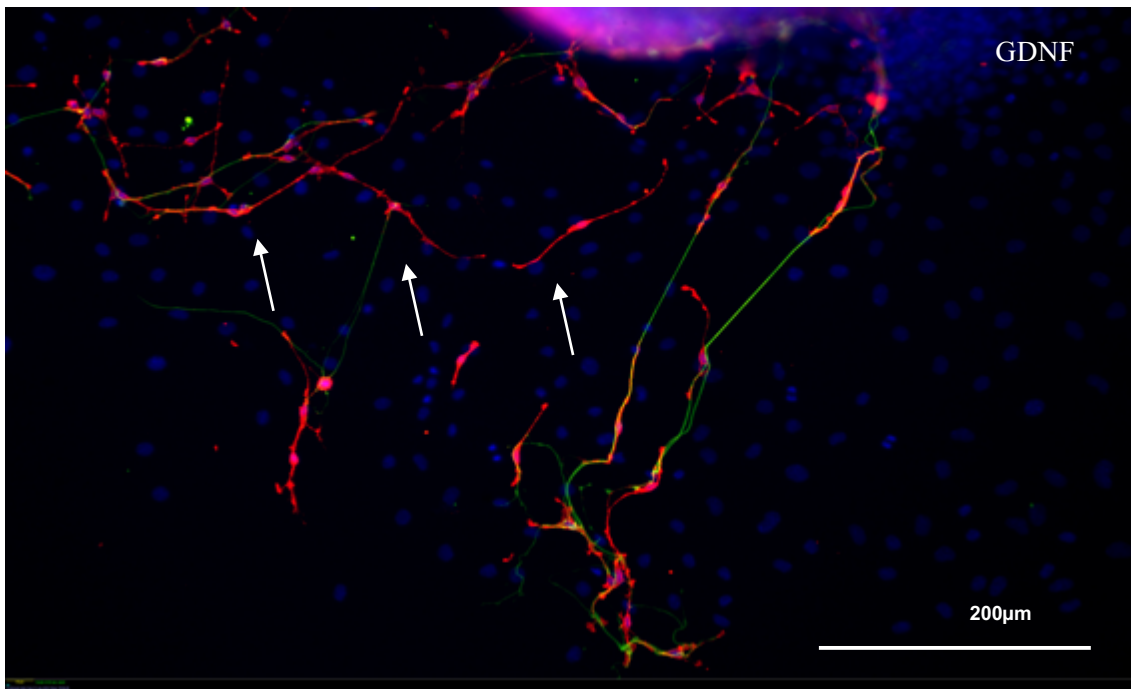


Abb. 18: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von GDNF (50 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Intensive Schwannzellen-Neuriten-Anbindung. Schwannzellen zeigen eine schmale, längliche Morphologie im engen Kontakt mit den Neuriten, dichte Ummantelung der auswachsenden Neuriten unter Einfluss von GDNF (Pfeile).

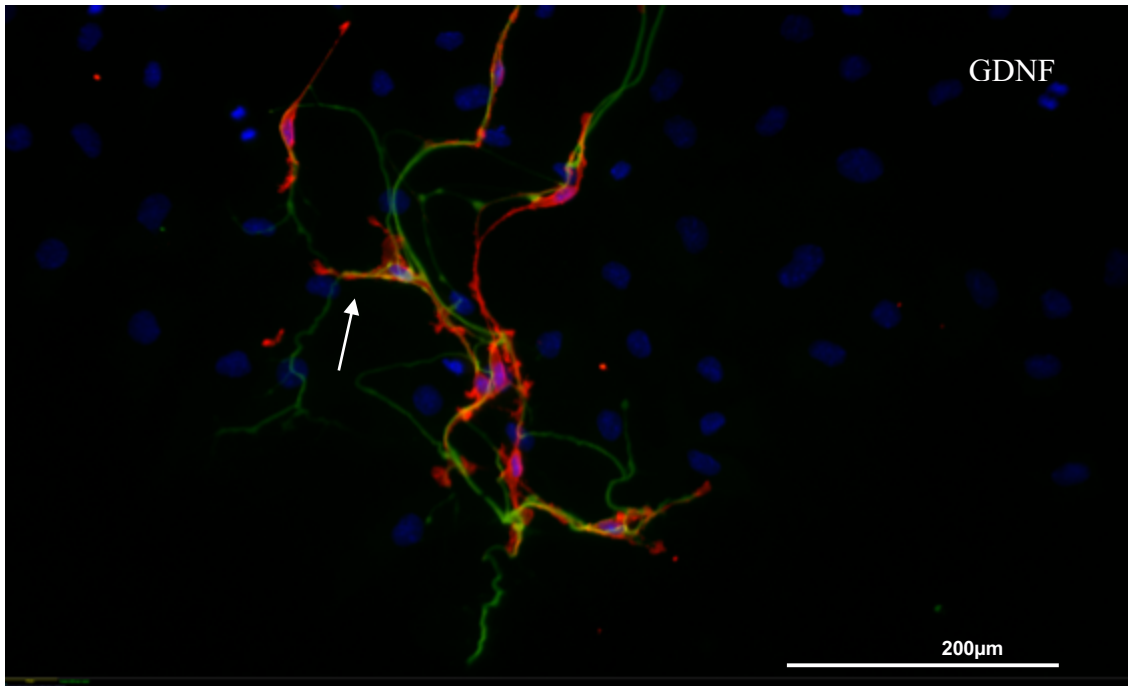


Abb. 19: Immunfluoreszenzbild von aussprossenden Neuriten aus dem Spiralganglienexplantat nach Zugabe von GDNF (50 ng/ml), 40-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Bildung eines Faszikels durch Neuriten unter GDNF-Einfluss. Parallel ausgewachsene Neuriten treffen sich, bilden Bündelungen am distalen Neuritenabschnitt durch multiple Endverzweigungen; intensive Ummantelung der Neuriten durch Schwannzellen. Lamellipodial geformte Schwannzelle, die Neuritenendigungen verbindet (Pfeil).

3.2.4 Interaktion von Schwannzellen mit den Spiralganglienzellen unter Einfluss von NT-3

Unter Einfluss von NT-3 sprossen kleine Neuriten aus dem Spiralganglienexplantat (Abb. 20), welche sich verzweigten und zusammen mit Gliazellen eine netzförmige Struktur bildeten. Die Gliazellen positionierten sich in unmittelbarer Nähe zum SG-Explantat und behielten weiterhin den Kontakt zum SG. Die Anzahl der Gliazellen überwog deutlich die Anzahl der Neuriten (Abb. 21).

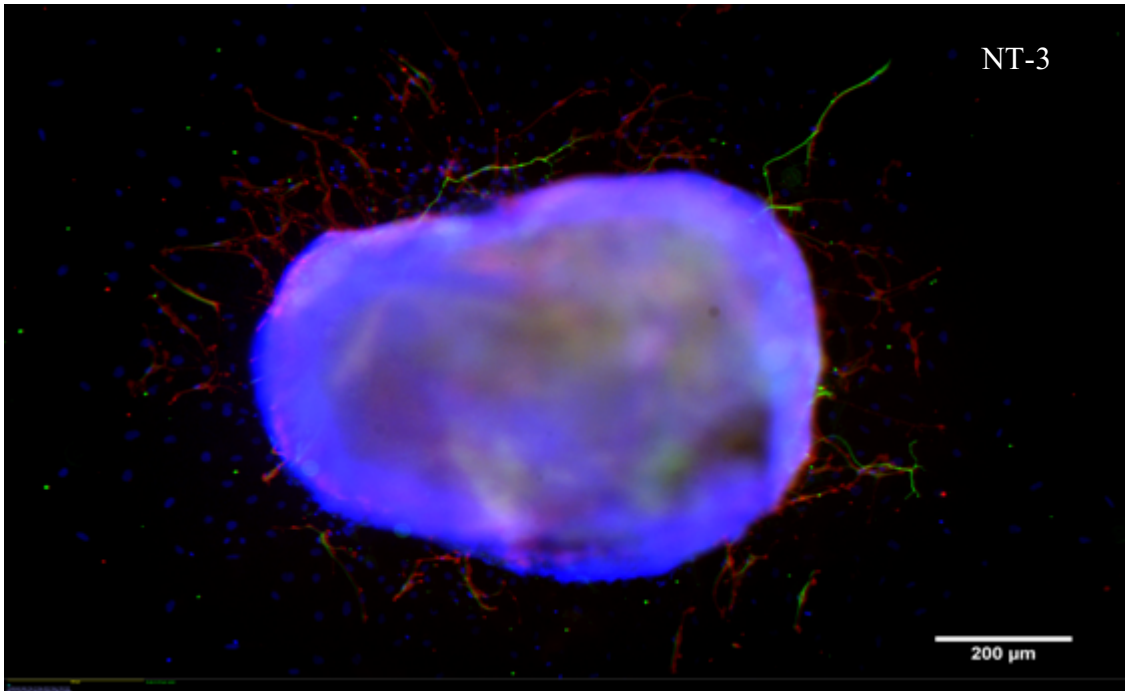


Abb. 20: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von NT-3 (50 ng/ml), 10-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). An den Stellen mit fehlenden Neuriten hafteten die Schwannzellen am SG. Vereinzelt aussprossende Neuriten aus der Spiralganglienzelle unter NT-3-Zugabe.

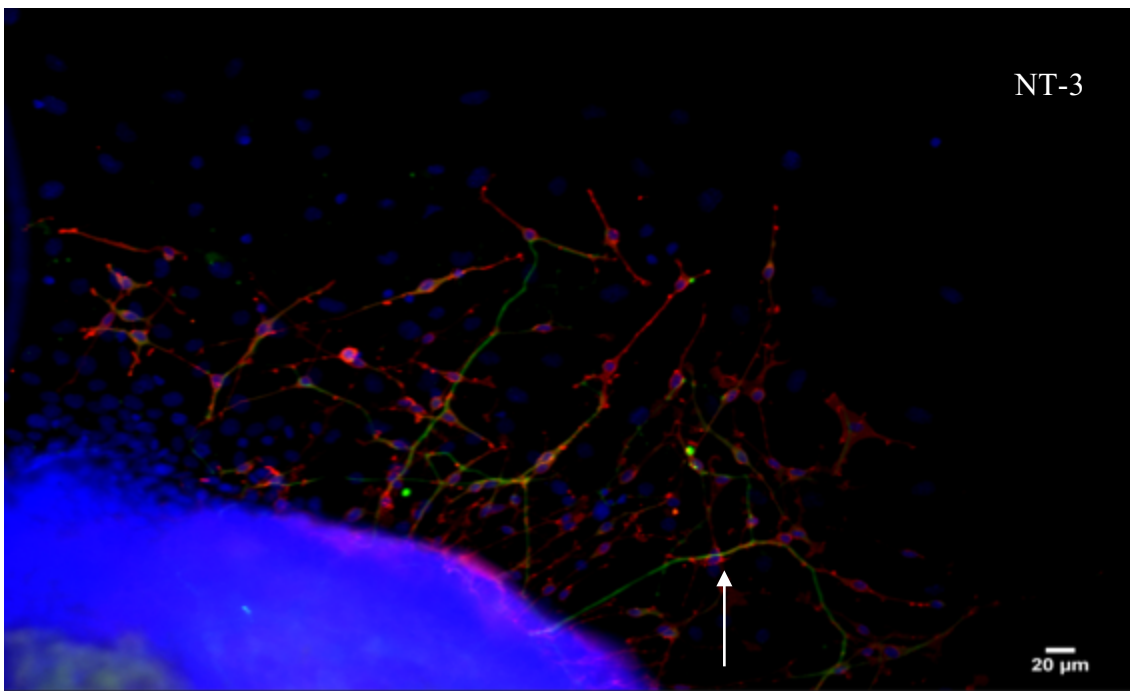


Abb. 21: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von NT-3 (10 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Intensive Begleitung der aussprossenden Neuriten durch Schwannzellen unter NT-3-Einfluss (Pfeil).

3.2.5 Erhöhte Motilität der Schwannzellen bei vermindertem Neuritenüberleben Einfluss von NGF- β mit BDNF

Die Kultivierung der Spiralganglienexplantate mit zwei Wachstumsfaktoren, NGF- β in einer Konzentration von 25 ng/ml und BDNF in einer Konzentration von 10 ng/ml, zeigte morphologisch ähnliche Interaktionen der Gliazellen mit Neuriten wie zuvor bei der isolierten Applikation der neurotrophen Faktoren. Die herauswachsenden Neuriten aus dem Explantat wurden eng von Schwannzellen umgeben. Die Schwannzellen konzentrierten sich dabei auf die Stelle der Neuritenausprossung aus dem SG und wanderten weiter zum distalen Ende der Neuriten (Abb. 22). Zudem trat eine enge Interaktion der Schwannzellen mit den Neuriten an den Verzweigungsstellen auf (Abb. 23). Ferner ließen sich einige Schwannzellen mit β III-Tubulin-AK im Zytoplasma markieren (Abb. 22). Die Neuritenanzahl verhielt sich unter dieser Kombination wie bei der isolierten Gabe von BDNF; eine vermehrte Neuritendichte wie bei NGF- β konnte nicht beobachtet werden.

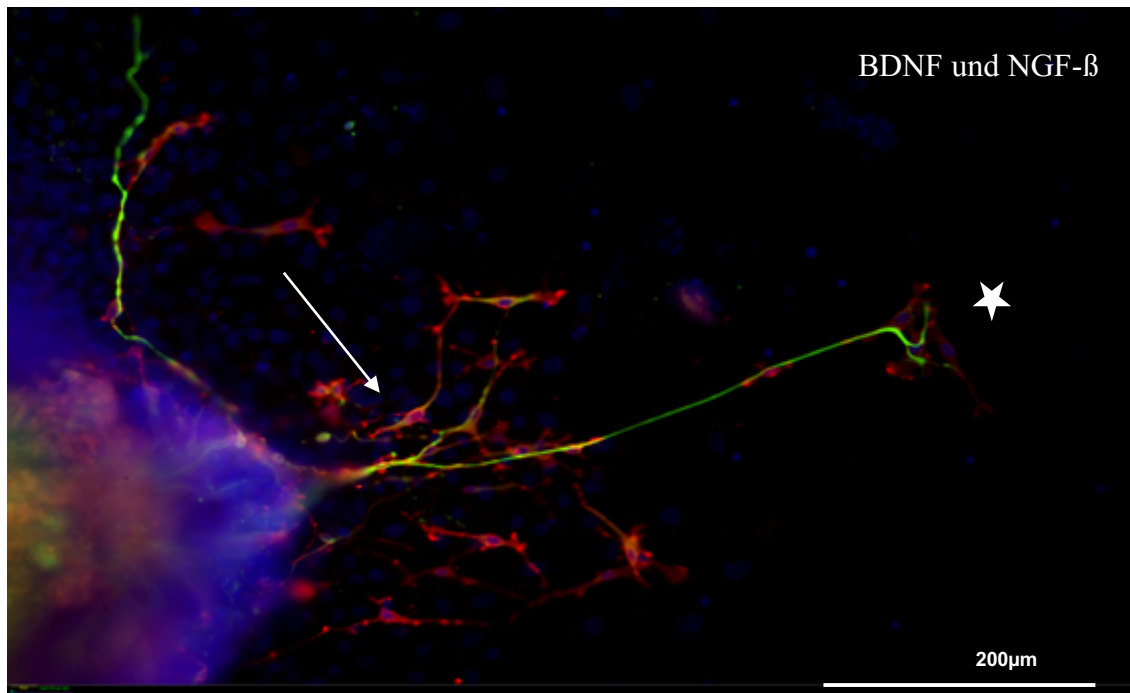


Abb. 22: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von BDNF (10 ng/ml) und NGF- β (25 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β -III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Vermehrtes Auftreten von Schwannzellen an Neuritenaustrittspunkten. Migrationseigenschaft der Schwannzellen mit Lokalisation an distalen Neuritenendigungen unter der Kombination aus BDNF und NGF- β (*).

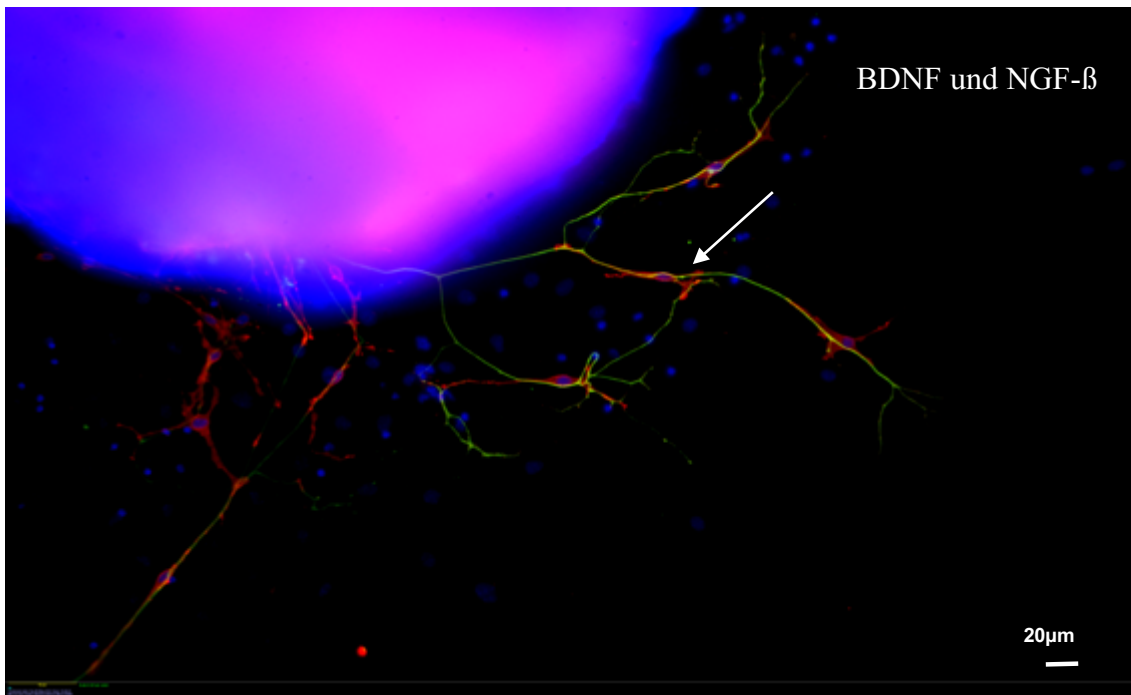


Abb. 23: Immunfluoreszenzbild eines Spiralganglienexplantates nach Zugabe von BDNF (10 ng/ml) und NGF-β (25 ng/ml), 20-fache Vergrößerung

Markierung der nicht myelinisierten Schwannzellen mit p75(NTR) (rot), Neuriten mit β-III Tubulin (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Interaktion der Schwannzellen an Neuritenverzweigungsstellen (Pfeil). Ein auswachsender Neurit teilt sich in mehrere Äste auf, Neuritenbegleitung durch Schwannzellen unter dem Einfluss einer Kombination aus BDNF und NGF-β.

4 Diskussion

4.1 Neurotrophine in der Cochlea

NGF, BDNF und NT-3 zählen aufgrund der strukturellen Homologie zur gleichen Neurotrophin-Familie (Levi-Montalcini et al., 1953; Barde, 1982; Leibrock, 1989). Anders gehört der neurotrophe Faktor GDNF zu der GDNF-Liganden-Familie (Stöver et al., 2000). Charakteristische Eigenschaften besitzen die Neurotrophine beim Überleben sowie bei der Differenzierung der embryonalen sensorischen und sympathischen Nervenzellen. Darüber hinaus wurden auch Effekte im neuroendokrinen System und auf nicht neuronale Zellen, beispielsweise aus der Hämatopoese und epithelialen Zellreihe, beschrieben (Levi-Montalcini, 1995; Lewin und Barde, 1996; Braun und Renz, 2001).

Während der embryonalen Entwicklung der Cochlea wurde die Expression von Neurotrophinen in den Haarzellen und Stützzellen nachgewiesen (Ylikoski et al., 1993, Ramekers et al., 2012). Allerdings unterlag die Expression von NT-3 und BDNF wie bei der Tonotopie einem räumlichen Gradienten entlang der basoapikalen Ausdehnung der Basalmembran. Dabei war die Expression von beiden Neurotrophinen in der Cochlea-Spitze am höchsten und in der Basis am niedrigsten. NT-3 wurde überwiegend in den Stützzellen des sensorischen Epithels als in den Haarzellen exprimiert (Farinas et al., 2001, Ramekers et al., 2012). BDNF-Expression war auf Haarzellen in der Cochlea beschränkt. Postnatal befand sich die NT-3-Expression in den inneren Haarzellen; dagegen war die BDNF-Expression an P1 in der Cochlea wenig zu detektieren, zwischen P4 und P9 stieg sie entlang des basoapikalen Gradienten vorübergehend aber an (Wiechers et al., 1999; Tan und Shepherd, 2006; Flores-Otero und Davis, 2011; Green et al., 2012). In der postnatalen Cochlea wurden NT-3 und BDNF weiter in den Spiralganglien und Gliazellen exprimiert (Hansen et al., 2001; Wiechers et al., 1999; Zha et al., 2001, Schimmang et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass die BDNF-Expression bei den Spiralganglien einen basoapikalen Gradienten aufweist (Schimmang et al., 2003; Green et al., 2012; Ramekers et al., 2012). Spiralganglien exprimieren Neurotrophin-Rezeptoren, TrkB und TrkC (Ylikoski et al., 1993; Pirvola et al., 1994). In vivo und in vitro zeigten BDNF und NT-3 einen protektiven Effekt auf das Überleben von Spiralganglien (Lefebvre et al., 1994; Malgrange et al., 1996; Hegarty et al., 1997).

GDNF-Expression wurde postnatal ab P7 in den Haarzellen nachgewiesen (Ylikoski et al., 1998; Green et al., 2012). Dabei waren die neonatalen und adulten inneren Haarzellen für die Synthese von GDNF und GDNF-Rezeptor- α (ohne RET-Synthese) verantwortlich (Ylikoski et al., 1998). In der reifen Maus zeigte sich ein höherer GDNF- als NT-3-Spiegel (Stankovic und Corfas, 2003). In der Zellkultur unterstützte GDNF das Überleben von Spiralganglien (Ylikoski et al., 1998). Subtypen des GDNF Family Rezeptor- α (GFR α) wurden in den Spiralganglien detektiert (Stöver et al., 2001).

Die Expression von NGF und dem korrespondierenden TrkA-Rezeptor konnten in der embryonalen Entwicklung der Cochlea nicht belegt werden (Ylikoski et al., 1993; Schecterson und Bothwell, 1994; Green et al., 2012). Postnatal P6 zeigte sich in den inneren und äußeren Haarzellen eine schwache immunhistochemische Markierung von TrkA. Bei den adulten Mäusen und Ratten konnte dann eine deutliche TrkA-Expression in den äußeren

und inneren Haarzellen, Stützzellen der gesamten Cochlea und in Spiralganglionneuronen bestätigt werden (Dai et al., 2004).

4.2 Rezeptoren der Neurotrophine

Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk-Rezeptoren) sind am Nervenwachstum, an der neuronalen Unterstützung sowie Differenzierung und synaptischen Interaktion und Plastizität im Nervensystem beteiligt. Diese Trk-Rezeptoren werden in vielen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert. Im Rahmen der entwicklungsphysiologischen Prozesse liegt eine temporäre oder dauerhafte Expression der Rezeptoren vor (Huang und Reichardt, 2001; Huang und Reichardt, 2003; Green et al., 2012).

Neurotrophine leiten ihre Signale über hochaffine Trk-Rezeptoren der Trk-Familie: TrkA, TrkB und TrkC. Dabei zeigt NGF- β eine hohe Affinität zu TrkA, BDNF und NT-4/5 zu TrkB und NT-3 zu TrkC, welcher auch in höheren Konzentrationen, allerdings niedrigaffin an TrkA und TrkB binden kann (Huang und Reichardt, 2001). Durch die Bindung des Neurotrophins an den transmembranen Trk-Rezeptor dimerisieren sich zwei Trk-Monomere. Mit Entstehung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes kommt es zur Änderung der Proteinstruktur mit anschließender Aktivierung der Tyrosinkinase, welche die Autophosphorylierung in den zytoplasmatischen Domänen vermittelt (Kaplan und Miller, 2000). Der Neurotrophin-Rezeptor-Komplex wird via Endozytose intrazellulär axonal aufgenommen und retrograd in den Zellkörper transportiert, in dem die Transkription von verschiedenen Proteinen stattfindet (DiStefano et al., 1992).

Der spezielle Rezeptor von GDNF ist der GDNF Family-Rezeptor- α (GFR- α -Rezeptor), ein Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker assoziiertes Membranprotein (Saarma und Sariola, 1999). Um eine Bindung mit dem GFR- α -Rezeptor eingehen zu können, dimerisieren sich zunächst zwei gleiche Liganden, dementsprechend zwei gleiche Wachstumsfaktoren aus der GDNF-Familie (Jing et al., 1996). Es sind vier Untereinheiten des GFR- α -Rezeptors, GFR α 1 bis GFR α 4, bekannt. GDNF bindet bevorzugt an GFR α 1, ist aber auch in der Lage, an GFR α 2 und GFR α 3 zu binden (Saarma und Sariola, 1999). Nach der Faktorendimerisierung und der Bindung an den GFR-Rezeptor bildet sich ein Komplex, welcher an den RET-Rezeptor, dem Tyrosinkinase-Rezeptor, andockt. Der RET-Rezeptor dimerisiert sich ebenfalls mit einem zweiten RET-Rezeptor und initiiert eine Autophosphorylierung. Folglich werden nachgeschaltete Signalwege über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), und zwar über die extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK 1/2), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) sowie Phospholipase C γ (PLC γ), aktiviert (Airaksinen und Saarma, 2002; Arnold et al., 1980). Diese intrazellulären Kaskaden, auch durch die Trk-Rezeptoren ausgelöst, führen zu Veränderungen in der Transkription, welche die neuronale Proliferation, die Differenzierung sowie das neuronale Überleben fördern (Huang und Reichardt, 2001).

Mit niedriger Affinität binden alle Neurotrophine in höheren Konzentrationen an p75(NTR)-Rezeptoren (Teng et al., 2010). p75(NTR)-Rezeptoren führen über intrazelluläre Mechanismen zum Untergang (Apoptose), zur Atrophie, Wachstumshemmung sowie Abschwächung der synaptischen Aktivität der Zellen (Teng et al., 2010). Bei Aktivierung dieser Rezeptoren durch Neurotrophine wird der Zelltod im Nervensystem induziert. Zudem bewirken die p75(NTR)-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Co-Rezeptor (bspw. Sortilin) eine

Apoptose oder bei gleichzeitiger Co-Existenz eines Trk-Rezeptors eine neuronale Differenzierung sowie ein neuronales Überleben (Teng et al., 2010). Das bedeutet, dass sich Neurotrophine in Abhängigkeit vom vorliegenden Rezeptortyp sowohl proliferativ und protektiv als auch proapoptotisch auf neuronale Zellen auswirken können (Frade et al., 1996).

Die Vorläuferform der Neurotrophine, die sogenannten Pro-Neurotrophine, bindet mit hoher Affinität an p75(NTR)-Rezeptoren.

4.3 Einfluss von Neurotrophinen auf das Neuritenwachstum von Spiralganglienzellen

4.3.1 Nerve growth factor

In dieser vorliegenden Arbeit konnte unter dem Einfluss von NGF- β ein verstärktes Längenwachstum von Spiralganglienneuriten beobachtet werden. Innerhalb der Konzentrationsstufen 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml und im Vergleich zur Kontrollversuchsreihe lag ein hochsignifikanter Längenunterschied der Neuriten mit $p < 0,01$ vor. Allerdings wurden unter der NGF- β -Kultivierung kürzere Neuriten im Vergleich zu BDNF, GDNF und NT-3 ermittelt. Die mittlere Neuritenlänge variierte zwischen 172 μm und 266 μm . Nach dem Erreichen eines Wachstumspicks bei einer Konzentration von 25 ng/ml trat kein weiterer wachstumssteigernder Effekt bei zunehmender NGF- β -Konzentration ein. Ferner wurde unter NGF- β ein besseres Auswuchsverhalten aus der Spiralganglienzelle beobachtet. Die Anzahl der auswachsenden Neuriten war unter NGF- β am höchsten. Bisher konnte in der Literatur eine Expression von NGF- β zu keinem Zeitpunkt in der Cochlea belegt werden. Der Nachweis von spezifischen Neurotrophinrezeptoren, den TrkA-Rezeptoren wurde in der Cochlea bestätigt (Dai et al., 2004). Über die Aktivierung von TrkA-Rezeptoren konnte NGF- β möglicherweise seine Wirkung entfalten. In einer früheren Studie mit Spiralganglienexplantaten konnte Malgrange et al. nachweisen, dass NGF- β ab einer unphysiologischen Konzentration von über 200 ng/ml wachstumsfördernde Effekte auf das Neuritenwachstum hervorruft (Malgrange et al., 1996). Wie bei den sensorischen Neuronen von Hühnern wurde eine unspezifische Bindung an TrkB- oder TrkC-Rezeptoren durch NGF- β diskutiert (Rodriguez-Tebar et al., 1992). Bei fehlendem Nachweis von postnataler neuronaler p75(NTR)-Rezeptor-Expression in der Cochlea ließ sich eine Aussage über die direkte Interaktion der p75(NTR)-Rezeptoren mit NGF- β und anderen inspezifizierten neurotrophen Faktoren schwer treffen (Ylikoski et al., 1993). Allerdings gibt es Hinweise, dass p75(NTR)-Rezeptoren bei den Schwanzzellen nach neuronaler Verletzung oder Verlust der Haarzellen im Corti-Organ exprimiert werden. Die Schwanzzellen exprimierten in solchen Situationen BDNF und NT-3 und förderten das Überleben von Spiralganglienneuronen *in vitro* und *in vivo* (Hegarty et al., 1997; Roehm und Hansen, 2005; Shepherd et al., 2008). Auch im Rahmen der Regenerationsprozesse wie bei Nervenverletzungen wurden NGF-Expressionen sowie Expressionen von niedrigaffinen NGF-Rezeptoren in den Schwanzzellen beobachtet. Es ist anzunehmen, dass eine Korrelation zwischen erhöhter Schwanzzellenmigration und neuronaler Regeneration

existiert (Anton et al., 1994). Eine weitere Studie mit Tiermodellen bestätigte, dass NGF das Überleben und die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu funktionellen Neuronen moduliert und somit das Neuritenwachstum fördert (Han et al., 2017).

4.3.2 Brain derived neurotrophic factor

In der SG-Zellkultur zeichnete sich die Zugabe von BDNF durch ein vermehrtes Längenwachstum der Spiralganglienneuriten in allen untersuchten Konzentrationsstufen im Vergleich zu den neurotrophen Faktoren NGF- β , GDNF und NT-3 aus. Zwischen den Konzentrationsstufen 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 250 ng/ml gab es mit $p > 0,05$ keinen signifikanten Längenunterschied; allerdings zeigte sich gegenüber der Kontrollversuchsreihe ein signifikantes höheres Längenwachstum der Neuriten. Bei den Ergebnissen ließen sich keine Hinweise auf ein konzentrationsabhängiges Auswuchsverhalten der Neuriten ableiten. Hingegen konnte die Arbeitsgruppe von Stöver darlegen, dass die Kultivierung von Spiralganglienzellen mit 50 ng/ml BDNF für 48 h zu einem signifikanten Aussprossen der Neuriten im Vergleich zu den BDNF-Konzentrationen von 25 ng/ml und 100 ng/ml sowie der Kontrollgruppe führte (Stöver et al., 2007). Darüber hinaus konnte durch eine andere Studie ein maximaler BDNF-Effekt hinsichtlich des Neuritenlängenwachstums in einer Konzentration von 50 ng/ml belegt werden (Gillespie et al., 2001). Außerdem zeigte BDNF in weiteren Zellkulturmodellen mit Spiralganglien eine Wirkung bereits in einer niedrigen Konzentration von 5 ng/ml und begünstigte das Neuritenwachstum (Malgrange et al., 1996). In Zusammenschau der Studienergebnisse induziert BDNF in allen Untersuchungsreihen ein signifikantes Längenwachstum der Neuriten. Es zeigen sich aber auch Diskrepanzen bei der minimal effektiven Dosis von BDNF hinsichtlich des optimalen Längenwachstums der Spiralganglienneuriten. Bei den Ratten wurde die Expression von BDNF und seinem hochaffinen TrkB-Rezeptor in den Spiralganglien bestätigt (Ylikoski et al., 1993). Auch während des Erwachsenenalters lag eine Expression von den TrkB-Rezeptoren in Spiralganglien und in den cochlearen Neuronen vor (Ylikoski et al., 1993). Möglicherweise basiert die Wirkung von BDNF in diesem Zellkulturmodell auf die Aktivierung von vorhandenen TrkB-Rezeptoren. Neuere Studien zeigen, dass der neuroprotektive Effekt von BDNF durch Koenzyme in vitro verstärkt werden kann. Das C3-Exoenzym (C3), welches von *Clostridium botulinum* abgeleitet ist, potenzierte die durch BDNF vermittelte neuroprotektive Wirkung auf Spiralganglienzellen (Harre et al., 2021). Durch die Hemmung der Rho-GTPase über ADP-Ribosylierung entfaltete C3 seine Wirkung (Sekine et al., 1989; Schmidt, 2018). Rho-Proteine regulieren Proliferation, Apoptose und insbesondere die Aufrechterhaltung von neuronalen Wachstumskegeln (Leemhuis et al., 2007; Huelsenbeck et al., 2012; Schröder et al., 2015).

Auch isolierte Gaben von TrkB-Rezeptor-Agonisten wie der monoklonale Antikörper M3 zeigten protektive Eigenschaften auf Spiralganglien, die mit BDNF vergleichbar waren (Szobota et al., 2019). Der TrkB-Agonist 7,8,3'-Trihydroxyflavon (THF) lieferte nur teilweise reproduzierbare Effekte in den Spiralganglien-Zellkulturen wie bei BDNF (Frick et al., 2020).

Durch die exogene Applikation von BDNF konnte *in vitro* eine Regeneration sowie eine Myelinisierung bei peripherer Neuropathie und nach Nervenverletzung induziert werden (Notterpek, 2003). Ferner nahm BDNF eine besondere Rolle bei der Modulation der synaptischen Konnektivität, bei der Erhöhung der synaptischen Anzahl sowie bei der Beeinflussung und Stabilisierung der Axone während der neuronalen Entwicklung ein (Hu et al., 2005).

4.3.3 Glial cell line-derived neurotrophic factor

Unter dem Einfluss von GDNF konnten positive Effekte auf das Längenwachstum der Spiralganglienneuriten im Vergleich zur Kontrollversuchsreihe ($p < 0,01$) hervorgerufen werden. Allerdings lagen zwischen den Konzentrationsstufen 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml keine Längenunterschiede der Neuriten mit $p > 0,05$ vor. Eine konzentrationsabhängige Wechselbeziehung bezüglich des Längenwachstums der Neuriten konnte nicht hergeleitet werden. Bei einer GDNF-Konzentration von 25 ng/ml konnte eine durchschnittliche maximale Neuritenlänge von 460 μm erzielt werden. Die Arbeitsgruppe von Boström konnte aufzeigen, dass unter GDNF-Einfluss ein starker Effekt auf die Aussprossung von Spiralganglienneuriten eintritt und das Längenwachstum der Neuriten unterstützt wird. Dabei wurden Spiralganglien von 200 g schweren Meerschweinchen mit GDNF in Konzentrationen von 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert und die Neuriten an verschiedenen Tagen (bis P11) ausgemessen. Neuritenlängen von über 800 μm am 3. Tag und 2.000 μm am 11. Tag konnten in jeder Konzentrationsstufe festgehalten werden. Neurotoxische oder apoptotische Effekte konnten durch die hohen GDNF-Dosen nicht beobachtet werden (Boström et al., 2010). Die Arbeitsgruppe von Stöver untersuchte hingegen Spiralganglienzellkulturen mit GDNF von Ratten (P3–5) nach einer Inkubationszeit von 48 h. In der GDNF-Konzentration von 25 ng/ml zeigte sich ein durchschnittliches Längenwachstum von 258 μm (Stöver et al., 2007). Damit wurden viel kürzere Neuriten ausgemessen. Die Inkubationszeit der Spiralganglienkulturen scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen; in Studien zeigte sich ein besseres Längenwachstum der Neuriten bei Verlängerung der Inkubationszeit (Stichel und Müller, 1991; Neale et al., 1993). Der besondere GDNF-Rezeptor, der GFR α -Rezeptor, konnte in den Spiralganglien der Meerschweinchen belegt werden (Stöver et al., 2001). Die Aktivierung der GDNF-Rezeptoren durch die iatrogene GDNF-Zufuhr ist vermutlich für das Auswachsen der Spiralganglienneuriten verantwortlich. Genauso scheint das Wachstumsverhalten der Spiralganglienneuriten durch die GDNF-Applikation nicht toxisch beeinflusst worden zu sein. Es ist beschrieben, dass nach Lärmtrauma und Beschädigung des Corti-Organs durch die exogene Applikation von GDNF in die Cochlea eine sekundäre Degeneration von auditorischen Nerven verhindert wurde. Auch im Rahmen der Nervenregeneration konnte GDNF-Expression von Schwannzellen induziert werden (Xu et al., 2013). GDNF übt einen positiven Einfluss auf die nervale Regeneration nach der Nervenverletzung aus (Bär et al., 1998).

4.3.4 Neurotrophin-3

Eine Veränderung des Wachstumsverhaltens der Spiralganglienneuriten konnte in der Zellkultur unter NT-3-Einfluss beobachtet werden. Innerhalb der Konzentrationsstufen 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml und im Vergleich zur Kontrollversuchsreihe lag ein hochsignifikanter Längenunterschied mit $p < 0,01$ vor. Bei einer NT-3-Konzentration von 10 ng/ml wurde ein verstärktes Längenwachstum der Neuriten beobachtet. Nach Erreichen des maximalen Längenwachstums einer durchschnittlichen Neuritenlänge von 414 μm bei einer NT-3-Konzentration von 10 ng/ml war ein geringeres Neuritenwachstum mit zunehmender NT-3-Menge auszumachen. Eine derartige Beobachtung wurde vorher durch eine frühere Studie mit postnatalen Spiralganglienexplantaten beschrieben. Bei einer NT-3-Konzentration von 10 ng/ml konnte ein neuronales Überleben mit deutlichem Anstieg der Länge ausgewachsener Neuriten dargestellt werden (Malgrange et al., 1996). Eine weitere Steigerung der Effektivität durch die Steigerung der NT-3-Konzentration war ebenfalls nicht beobachtet. NT-3 aktiviert bevorzugt seinen hochaffinen Rezeptor TrkC, dessen postnatale Expression in den Spiralganglien bei den Ratten und Mäusen nachgewiesen wurde (Ylikoski et al., 1993). Bei steigender NT-3-Konzentration ist eine unspezifische Aktivierung von TrkB-Rezeptoren denkbar, allerdings zeigte die Aktivierung von TrkB durch den hochaffinen Liganden BDNF kein vermindertes Neuritenwachstum. In einer Studie wurde beobachtet, dass TrkC-Rezeptoren durch monoklonale Antikörper (M1, M2, M7) ebenfalls aktiviert werden können, die Neuritenwachstum induzieren. Das Ausmaß des Neuritenwachstums unter den TrkC-Agonisten war aber NT-3 unterlegen (Szobota et al., 2019).

NT-3 zählt zu den wichtigsten Neurotrophinen, die postnatal exprimiert werden und eine besondere Rolle bei der Neuritogenese spielen. Während der ZNS-Entwicklung wurde in den unreifen Regionen eine hohe NT-3-Expression erfasst; dort fand Proliferation, Migration sowie Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen statt (Maisonpierre et al., 1990). Mit zunehmendem Alter bzw. der Reifung nahm die NT-3-Konzentration in diesen Regionen stark ab (Pirvola et al., 1992; Schachner, 1988). Eine enge Beziehung zwischen den adulten cochlearen Nervenfasern sowie Zellen des Corti-Organs konnte beobachtet werden. Es bildete sich eine reziproke Beziehung zwischen Neuronen und Stützzellen des Corti-Organs (Stankovic et al., 2004). Durch die Neuregulin-Synthese, einem Protein mit Signalübertragungsfunktion, interagierten die adulten Spiralganglien über Tyrosin-Kinasen der ErbB-Familie mit den Stützzellen (Burden und Yarden, 1997). Eine Inhibierung der ErbB-Funktion in den Stützzellen reduzierte die NT-3-Expression. Folglich wurde ein Absterben der Spiralganglien konstatiert. Diese Interaktion veranschaulicht, dass NT-3 aus dem Corti-Organ zur Aufrechterhaltung und weiteren Erhaltung sowie Funktionsausübung des adulten Spiralganglions von besonderer Bedeutung ist. Eine weitere reziproke Interaktion über Neuregulin wurde zwischen Spiralganglien und den Gliazellen der Spiralganglien erkannt. Die Proliferation sowie Synthese der beiden Neurotrophinen NT-3 und BDNF wurden durch Neuregulin der Schwannzellen gesteuert (Hansen et al., 2001). Im Weiteren konnten durch NT-3 Effekte mit neuronaler Differenzierung sowie Induktion von Progenitorzellen an unreifen Rückenwurzelganglien beobachtet werden (Hapner et al., 2006).

4.3.5 Kombination von BDNF mit NGF- β

Ein verstärktes und additives Längenwachstum der Neuriten trat unter der Kombination von BDNF mit NGF- β nicht ein. Eine verminderte Wirkung auf das Neuritenlängenwachstum im Vergleich zur alleinigen BDNF-Applikation wurde beobachtet. Ferner zeigte sich keine verstärkte Neuritendichte aus der Spiralganglienzelle wie bei isolierter NGF- β -Gabe. Obwohl beide Neurotrophine über verschiedene hochaffine Trk-Rezeptoren interagieren, konnte keine kumulative Wirkung erkannt werden. Welche unbekanntenen Faktoren und Prozesse das verstärkte Neuritenwachstum hemmen, bleibt hier unklar.

4.4 Gliazellen im peripheren Nervensystem

Neben der Myelinisierung von Neuriten besitzen die Schwannzellen im peripheren Nervensystem nicht nur Proliferations-, Motilitäts- und Migrationseigenschaften, sondern sind auch fähig, durch Synthese von Neurotrophinen die Entwicklung sowie die Regeneration von peripheren Nerven zu unterstützen. Unter den von Schwannzellen produzierten Wachstumsfaktoren befinden sich auch Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Nerve growth factor (NGF) (Ide, 1996; Bampton und Taylor, 2005; Jessen und Mirsky, 2008). Zwischen Gliazellen und Neuronen besteht eine reziproke Beziehung. Die peripheren Nervenzellen kommunizieren über die Synthese eines Wachstumsfaktors, dem Neuregulin, mit den Schwannzellen. Dadurch werden die Proliferation sowie Migration der Schwannzellen erhöht, welche die Neuronen in ihrer Entwicklung und Erhaltung fördern (Mahanthappa et al., 1996). Bei einer Nervenverletzung wandern die Schwannzellen zu den beschädigten neuronalen Stellen (Han et al., 2007). Wie auch in der Entwicklungsphase dient die Oberfläche der Gliazellen als Leitsubstrat für das Nervenwachstum (Fallon, 1985). Bei einer Nervenschädigung lösen die denervierten Gliazellen Regenerations- und Reparaturvorgänge von peripheren Axonen aus (Han et al., 2017). Eine Dedifferenzierung von Schwannzellen – ähnlich wie bei den unreifen Zellen – ist essenziell für eine erfolgreiche Regeneration von Axonen (Mirsky et al., 2008).

In Abwesenheit von Neuronen können die Gliazellen weiter überleben. Verantwortlich für diese Fähigkeit ist die autokrine Versorgung mit Neurotrophinen. Zur eigenen Erhaltung synthetisieren die Gliazellen Wachstumsfaktoren, wie NT-3, Insulin growth factor (IGF) oder Platelet derived growth factor (PDGF) (Meier et al., 1999). Dadurch verhindern sie nicht nur ihre eigene Apoptose, sondern behalten auch weiterhin ihre Funktionalität (Porter et al., 1986). Während der Entwicklungsphase des peripheren Nervensystems exprimieren die Schwannzellen Proteine und Rezeptoren der extrazellulären Matrix. Sie beeinflussen somit auch die axonale Adhäsion sowie die Differenzierung und Regeneration (Chernousov und Carey, 2000).

Neuere Studien zeigten, dass in der Entwicklungsphase der Cochlea die Vorläuferzellen der glialen Zellreihe ein schnelles und gezieltes Wachstum der peripheren Spiralganglienneuriten an das Corti-Organ ermöglichen. Eine axonale Führung und ein effizienteres Wachstum der Spiralganglienneuriten durch die Glia-Vorläufer wurden beobachtet (Druckenbrod et al., 2020).

4.5 Einfluss von Neurotrophinen auf die Interaktion von Gliazellen mit Neuriten

4.5.1 Nerve growth factor

Die höchste Dichte der neuronalen und nicht neuronalen Zellen ließ sich unter NGF- β -Einfluss demaskieren. Die Interaktion der Gliazellen untereinander und mit den Neuriten im Sinne einer Faszikelbildung erschwerte die Dokumentation der Neuritenlängen. Das Zytoplasma der Gliazellen nahm vermehrt β -III-Tubulin auf. Die Markierung durch β -III-Tubulin-AK diente primär zur Neuritendarstellung. Die intrazelluläre β -Tubulin-Aufnahme könnte im Hinblick auf eine erhöhte mitotische Aktivität in der Gliazelle von Bedeutung sein. Es wurde beschrieben, dass beispielsweise die Tumorzellen, Zellen mit hoher Teilungsrate, auf β -Tubulin stark positiv reagieren. Eine hohe Zellteilungsrate ist mit vermehrtem β -Tubulin assoziiert. β -Tubulin stellt sich als eine Komponente des Spindelapparats in der Zellteilung, in vielen Zelltypen dar (Jouhilahti et al., 2008). Vermutlich wurde unter NGF- β eine Differenzierung und/oder Proliferation der Gliazellen initiiert.

4.5.2 Brain derived neurotrophic factor

Bei gesteigertem Längenwachstum der Neuriten unter BDNF positionierten sich die Schwannzellen am distalen Ende der jeweiligen Neuriten. Diese Schwannzellen befanden sich im möglichen Proliferations- und Migrationszustand. Sie präsentierten sich klein und mit verschobenem Kern-Zytoplasma-Verhältnis – offenbar als Zeichen der erhöhten Motilität. Möglicherweise wanderten die Schwannzellen zunächst in die Peripherie, um ein günstiges Milieu für das Überleben von Neuriten zu schaffen. Es ist bekannt, dass die Schwannzellen Zelladhäsionsmoleküle, wie L1, NCAM (Myelin-assoziiertes Glykoprotein) und extrazelluläres Matrixprotein J1, exprimieren (Faissner et al., 1984; Daniloff et al., 1986; Schachner, 1988; Fahrig et al., 1987; Seilheimer und Schnacher, 1987) und so die Ausrichtung der Neuriten in der Entwicklungsphase beeinflussen (Fallon, 1985). Die Gliazellen benutzen ihre Oberfläche als Leitsubstrat für das Neuritenwachstum (Fallon, 1985).

4.5.3 Glial cell line-derived neurotrophic factor

Die Neuriten, die aus den mit GDNF kultivierten Spiralganglienzellen heraustraten, wurden dicht von Schwannzellen und deren länglichen Zytoplasmaausläufern umhüllt. Es wurde beschrieben, dass eine hohe GDNF-Konzentration die Schwannzellenmigration *in vitro* stimuliert und die neuronale Myelinisation verbessert (Höke et al., 2003). Die Schwannzellen, die nicht in eine Wechselbeziehung mit Neuriten traten, lagen peripher mit kleinen multiplen Zytoplasmaausläufern in einer lamellipodialen Struktur und befanden sich vermutlich in einem „Ruhezustand“. „Aktivere“ Schwannzellen positionierten sich

richtungsweisend und schafften so möglicherweise ein günstigeres Milieu für die Neuriten, die sie auf diese Art steuerten. Auf molekularer Ebene wurde beobachtet, dass GDNF über neuronale Adhäsionsmoleküle (NCAM) interagiert, die zusammen über GFR α -Signalwege die Zell-Zell-Interaktion zwischen den Neuriten und Schwannzellen regulieren (Sjöstrand et al., 2007). Bei erhöhten GDNF-Mengen ist eine Heraufregulation des NCAMs mit gesteigerter Schwannzelladhäsion und axonaler Faszikulation beschrieben worden (Boström et al., 2007). In einer Studie sind Schwannzellen, die sich im nicht myelinisierenden Zustand befanden, als NCAM positiv beschrieben worden (Naveilhan et al., 2006).

4.5.4 Neurotrophin-3

Verzweigte Neuriten wurden unter NT-3 dicht und eng von Schwannzellen umgeben. Dabei begleiteten die kleinen Schwannzellen mit sehr schmalen, in die Länge gezogenen Zytoplasmaausläufern den auswachsenden Neuriten. Es gab nur wenige Stellen ohne Kontakt zu den Neuriten. Wie in einer engen Wechselbeziehung bestand eine unmittelbare Nähe zwischen den Gliazellen und Neuriten. Eine verstärkte Neuritendichte wurde unter NT-3-Einfluss nicht beobachtet, die Anzahl der Gliazellen überwog die Anzahl der Neuriten. Die nicht-myelinisierten Gliazellen überlebten weiter und standen vielmehr in enger Interaktion mit der Spiralganglienzelle. Meier et al. veranschaulichten, dass die Schwannzellen in Abwesenheit der Neuronen weiter überleben können und dafür die eigene autokrine Versorgung durch Neurotrophine verantwortlich ist (Meier et al., 1999).

4.6 Rolle der p75(NTR)-Rezeptoren bei Schwannzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Darstellung der Gliazellen die Expression von p75(NTR)-Rezeptoren zur Detektion und Differenzierung von Schwannzellen herangezogen. Die myelinisierenden Schwannzellen sind p75(NTR) negativ bzw. sind diese Rezeptoren herunterreguliert und können durch den hier eingesetzten glialen Marker nicht adäquat dargestellt werden (Jessen und Mirsky, 1999; Song et al., 2005). Die nicht myelinisierenden Schwannzellen präsentieren sich wie die aus der Neuralleiste entstandenen unreiferen Vorstufen als p75(NTR)-positive Zellen. Eine Reprogrammierung von myelinisierenden Schwannzellen unter Kultivierung von speziellen Neurotrophinen, zum Beispiel von Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF-2), konnte nachgewiesen werden. Myelinisierende Schwannzellen konnten unter FGF-2 in multipotente Neuralleistenstammzellen konvertiert werden (Widera et al., 2011). In dieser Versuchsreihe zeigte sich unter NGF- β eine vermehrte Aufnahme von β -Tubulin in den Gliazellen, möglicherweise als Zeichen einer erhöhten mitotischen Zellaktivität. Morphologisch zeigte sich eine erhöhte Proliferation in der glialen Zellpopulation. Ein Umwandlungsprozess in den Gliazellen könnte hier ebenfalls eine Rolle gespielt haben. Eine Dedifferenzierung in mögliche Stammzellen könnte bei den Gliazellen vorgelegen haben. Ergänzende immunhistochemische Untersuchungen wären zur Abgrenzung der Gliazellen von Stammzellen sinnvoll gewesen.

Die Expression von p75(NTR)-Rezeptoren wurde in den Schwannzellen nach Denervierung bzw. Axotomie nachgewiesen (Reynolds und Woolf, 1993). Bei einer neuronalen Verletzung ist die Heraufregulierung der p75(NTR)-Rezeptoren mit gleichzeitig erhöhter Expression in den Schwannzellen der Spiralganglien als akute Reaktion beschrieben worden (Provenzano et al., 2011). Die p75(NTR)-Rezeptoren fungieren demnach nicht nur proapoptotisch. In der Akutphase weisen sie auch mitotische und proliferative Wirkungen auf.

Unter pathologischen Bedingungen, wie bei einer medikamenteninduzierten Ertaubung durch Aminoglykoside, sind die p75(NTR)-Rezeptoren in den degenerierenden Spiralganglienzellen hochreguliert und die eigentlichen Trk-Rezeptoren der Neurotrophinen herabreguliert. Es zeigte sich auch eine Expression von BDNF in den Haarzellen und Stützzellen der Cochlea. Eine differenzierte Prozessierung der Vorläuferform von proBDNF wurde beobachtet. Unter dem Einfluss des modifizierten proBDNFs dominierte der apoptotische p75(NTR)-Rezeptor, während die Spiralganglien zugrunde gingen (Tan und Sheherd, 2006). Allerdings zeigte sich die Anzahl der Schwannzellen bis zu 50 Tagen nach der Ertaubung konstant, obwohl proBDNF auch dort eine proapoptotische Wirkung ausübte und die p75(NTR)-Rezeptor-Expression gesteigert war (Provenzano et al., 2011).

4.7 Weitere Einflussfaktoren auf das Wachstumsverhalten der Neuriten

Für das Überleben der Nervenzellen ist ein ausgeglichenes Zusammenspiel zwischen den intrinsischen und extrinsischen Faktoren entscheidend. Die neurotrophen Faktoren interagieren mit den Spiralganglien über spezielle Tyrosinkinase-Rezeptoren, die intrazelluläre Signalkaskaden auslösen und zu Veränderungen in der Transkription führen. Zu den extrinsischen Faktoren gehören Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM), Oberflächenmoleküle und unterschiedliche Zusammensetzungen von Kulturmedien, die ein verändertes Auswachsverhalten der Neuriten aus der Spiralganglienzelle modulieren.

In einer früheren Studie konnte vermerkt werden, dass die Auswahl des Oberflächenmaterials der Zellkulturplatten das Neuritenwachstum beeinflusste (Hansen, 2006). Ein deutliches Wachstumsverhalten zeigte sich auf alloplastischen Materialien wie Plastik-, Titan- und Edelstahloberflächen im Gegensatz zu Silikon- oder Goldoberflächen. Zu verzeichnen waren ebenfalls Effekte auf die Elongation, Wachstumsrichtung und –verzweigung der Neuriten.

Ein deutliches Auswachsverhalten der Neuriten aus der Spiralganglienzelle konnte auf Lamininbeschichtung im Zellkulturmodell beobachtet werden (Aletsee et al., 2002). Schwannzellen synthetisieren Nervenwachstum stimulierende Moleküle, die sich in der ECM oder in der Plasmamembran befinden. Dazu gehört auch Laminin als Bestandteil der ECM (Tomaselli und Reichardt, 1988). Schon in der Entwicklungszeit des auditorischen Systems fungierte Laminin als Leitsubstrat für die Neuriten (Fallon, 1985). Laminin fördert nicht nur die neuronale Adhäsion, sie verändert auch die Richtung und Geschwindigkeit des neuronalen Wachstums (McKerracher et al., 1996). An retinalen Ganglienzellen konnte

gezeigt werden, dass die neuronalen Zellen über Integrin-Zelloberflächenrezeptoren (Integrin- β 1) mit den Schwannzellen interagieren (McKerracher et al., 1996; Tomaselli und Reichardt, 1988).

Ferner wurden verschiedene Supplemente in Hinblick auf Neuritenwachstum in neuronalen Zellkulturen untersucht. Dabei führte B27-Supplement zu einem besseren Überleben von embryonalen Hippocampusneuronen der Ratten und etablierte sich als serumfreier Zusatz für Anwendungen der Zellkultursystemen mit neuronalem Gewebe (Brewer et al., 1994). Auch der Säure-Basen-Haushalt ist essentiell für das neuronale Wachstum sowie für die neuronale Entwicklung und Hörfunktion. Der Natrium/Wasserstoff-Austauscher-6 (*sodium-hydrogen exchanger 6*, NHE-6) reguliert endolysosomale Signalwege und den organellen pH-Wert (Hofstetter et al., 2010; Liu et al., 2013; Ohgaki et al., 2011; Ascano et al., 2012). Bei den NHE-6-Knock-out-Mäusen zeigte sich eine gestörte Signalkaskade bei TrkB-Rezeptoren sowie einen axonalen Verlust bei den Spiralganglien, die auf die Übersäuerung zurückzuführen waren (Kucharava et al., 2020). Bei den Zellkulturmodellen ist als isotone und pH-neutrale Lösung die phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) etabliert, die hier bei den Waschvorgängen ebenfalls zur Anwendung kam.

Nach einer Inkubationszeit von 72 h erfolgte die immunhistochemische Färbung; eine intermittierende mikroskopische Begutachtung auf Vitalität der Spiralganglienzellen wurde nicht durchgeführt. Zellkulturmodelle mit Nervenzellen haben gezeigt, dass innerhalb von 48 h nach Inkubationsbeginn das Auswachsverhalten der Neuriten und die Entwicklung von interneuronalen Kontakten abgeschlossen sind und die Neuritenlängen bei weiterer Inkubation zunehmen (Stichel und Müller, 1991; Neale et al., 1993).

Auch die „richtige“ Präparation der Spiralganglien beeinflusste das Auswachsverhalten der Neuriten. Der Anteil am zusätzlichen Bindegewebe als „Gewebeplus“ neben dem Spiralganglion konnte objektiv nicht erfasst werden. Ein Neuritenwachstum zeigte sich bei 60 - 70% der SG-Explantate.

4.8 Gliazellen und Myelinisierung in der menschlichen Cochlea

Im Gegensatz zu anderen Wirbeltieren weist die Mehrzahl der menschlichen Spiralganglienzellen keine Myelinisierung auf. Bei Neugeborenen sind die Ganglienzellen im Ganglion spirale unmyelinisiert. Der Anteil von myelinisierten Neuronen unterliegt einer altersabhängigen individuellen Variation. Bei einer Untersuchung waren bei 28 % der post mortem untersuchten menschlichen Spiralganglienzellen bei Menschen mit 75 Jahren myelinisiert (Ota und Kimura, 1980; Arnold et al., 1987). Die Ursache für die zunehmende Myelinisierung der menschlichen Spiralganglienzellen ist noch Gegenstand der Forschung.

4.9 Optimierung der bioprothetischen Ankopplung von Cochlea-Implantaten – experimentelle Ansätze

Im klinischen Alltag stellt die Cochlea-Implantation die Therapie der Wahl bei Taubheit dar und zählt zu einem der wichtigsten Therapieregime bei der hochgradigen Schallempfindungsschwerhörigkeit. Dabei werden die Spiralganglienzellen über die Elektroden des Cochlea-Implantats in der Scala tympani der Cochlea direkt stimuliert. Die Impulse werden über die Hörbahn in den cerebralen bzw. auditorischen Cortex weitergeleitet. Eine wichtige Voraussetzung stellt das Vorhandensein eines funktionsfähigen Hörnervs dar. Nach der Neurotrophintheorie gibt es eine Assoziation zwischen dem Verlust des Corti-Organs und der Degeneration der bipolaren Spiralganglienzellen. In den menschlichen Cochleae degenerieren die Spiralganglienzellen allerdings langsamer. Die Spiralganglienzellen können Wochen bis Monate bei Nagetieren und über viele Jahre beim Menschen weiter zu überleben, sodass auch mehrere Jahre nach Verlust des Corti-Organs ein Cochlea-Implantat eingesetzt werden kann (Gomaa et al., 2003; Linthicum und Fayad, 2009; Alam et al., 2007; Dodson und Mohuidin, 2000). Die Expression von BDNF und den Neurotrophinrezeptoren TrkB und TrkC sowie p75(NTR)-Rezeptoren konnte in der menschlichen Cochlea während der früheren Entwicklung nachgewiesen werden (Chacko et al., 2017). Hingegen waren keine Hinweise für GDNF-Expression in der menschlichen Cochlea (Liu und Rask-Ansersen, 2014). Bei hörgeschädigten Menschen wurde eine verringerte Expression von BDNF und von ihm regulierten Proteinen festgestellt (Vries et al., 2019). Des Weiteren wiesen Untersuchungen der menschlichen Perilymphe auf ein verringertes Expressionsniveau von bestimmten microRNAs bei Patienten mit leichtem und schwerem Hörverlust hin, die die Neurotrophin-Signalübertragung regulieren und das Neurotrophinniveau widerspiegeln (Shew et al., 2021).

Es wurden bereits diverse Nervenwachstumsfaktoren identifiziert, die protektive Effekte auf das Spiralganglion *in vitro* zeigten (Malgrange et al., 1996). Das Ziel der aktuellen Forschung ist die Optimierung und Effizienz der Cochlea-Implantate, der Erhalt der vitalen Spiralganglien mit Eindämmung des Degenerationsprozesses sowie eine Induktion der Neuritenaussprossung in Richtung der CI-Elektrode, um eine möglichst enge bioprothetische Ankopplung zu erreichen. Eine dauerhafte Applikation oder lokale Expression eines Neurotrophins oder einer Neurotrophinkombination zur bestmöglichen Spiralganglienprotektion wäre erfolversprechend. Im Tiermodell wurden erste Ansätze hierzu untersucht. Das erste Konzept basierte auf einer exogenen Applikation von Neurotrophinen in die Cochlea, insbesondere von BDNF oder NT-3 in Form von osmotischen Pumpen (Pettingill et al., 2007). Auch auf genetischer Basis wurden die Schwanzzellen so verändert, dass sie in der Lage waren, neurotrophe Faktoren wie BDNF oder NT-3 selbst zu exprimieren. Allerdings konnte eine längerfristige Lösung nicht nachgewiesen werden. Die Spiralganglienzellen starben nach 4 Wochen ab (Pettingill et al., 2008). Durch die genetisch veränderten Fibroblasten, welche die aktivere Form von BDNF exprimierten und auf Spiralganglienzellen effektiver erschienen, wurde ein besseres Langzeitergebnis für 30 Wochen dokumentiert (Zanin et al., 2014). Die weitere Ausführung mit viraler Transfektion der Stützzellen im Corti-Organ zeigte ebenfalls eine begrenzte Wirkdauer von einigen Wochen (Wise et al., 2011). Die intramuskuläre Injektion von NGF führte bei bei DBA/2J-Mäusen, bei denen ein früh eingesetzender progressiver Hörverlust

beschrieben worden ist, zu einer Verhinderung von Haarzellenverlust und Hemmung der Apoptose bei Spiralganglienneuronen (Wang et al., 2017). Andere aktuelle Forschungen beziehen sich auf neuronale Stammzellen. Sichere Stammzellentransplantationsstrukturen werden in der Cochlea untersucht. Die Stammzellen sollen aus dem Injektionsort zu den degenerierten, beschädigten Spiralganglienzellen migrieren und diese ersetzen (Zhang et al., 2013). Neuere Studien basieren auf Bildung von künstlichen Stammzellnischen in Form von dreidimensionalen Sphäroiden unter kontinuierlicher Gabe von BDNF. Die humanen embryonalen Stammzellen differenzierten sich zu otischen neuronalen Vorläuferzellen und bildeten Neuriten in Richtung der knöchernen Cochlea sowohl in vitro als auch in vivo (Chang et al., 2020).

Anhand der hier durchgeführten Experimente konnten die neuroprotektiven Eigenschaften von den neurotrophen Faktoren NGF- β , BDNF, GDNF und NT-3 in Hinblick auf die Spiralganglienzellen näher charakterisiert werden. Ferner demonstrieren die Ergebnisse, dass eine enge glia-neuronale Wechselbeziehung existiert, die bisher wenig beschrieben wurde. Unter dem Einfluss von Neurotrophen zeigten sich bei den nicht myelinisierenden Schwannzellen mitotische Prozesse sowie ein Potenzial in der gesteigerten Migrations- sowie Proliferationseigenschaft. Bei der exogenen Neurotrophinapplikation sollten demnach nicht nur die Spiralganglienzellen als Zielorgan betrachtet werden, sondern auch die Gliazellen sollten näher unter die Lupe genommen werden. Die Beeinflussung der Gliazellen ist von großem Interesse, da diese Zellen Regenerationseigenschaften besitzen und durch zielgerichtete Migration die neuronale Schädigung inhibieren können. Es sollten mehr Informationen über die Aktivierung der Chemokinrezeptoren der glialen Zellreihe gewonnen werden und die örtlich-zeitliche Verteilung der Gliazellen während des Neurotrophinsupports der Spiralganglien monitort werden. Im Gegensatz zu den Wirbeltieren sind die menschlichen Spiralganglienzellen bei Neugeborenen unmyelinisiert. Mit zunehmenden Lebensalter weisen die Spiralganglienzellen Myelinisierungen auf. Auf der Suche nach therapeutischen Ansätzen bei der Versorgung mit Cochlea-Implantaten sollten die Veränderungen an den Gliazellen mit in Betracht gezogen werden.

5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Spiralganglienzellen mit den nicht myelinisierenden Schwannzellen unter Einfluss von verschiedenen neurotrophen Faktoren, die in der Entwicklungsphase der Cochlea und im peripheren Nervensystem eine besondere Rolle spielen, näher charakterisiert. Die neurotrophen Faktoren NGF- β , BDNF, GDNF und NT-3 wurden untersucht. Die Neurotrophine zeigten einen signifikanten neuroprotektiven Effekt auf das Neuritenwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das morphologische Verhaltensmuster der glialen Zellreihe war unter Einfluss des verschiedenen Neurotrophins unterschiedlich. Unter dem Einfluss von NGF- β war eine Proliferation in beiden Zelltypen auszumachen. Allerdings imponierte ein vermindertes Neuritenlängenwachstum bei gleichzeitiger Initiierung eines möglichen Redifferenzierungsprozesses in der glialen Zellpopulation. Bei BDNF konnte ein deutlich vermehrtes Längenwachstum der Neuriten eruiert werden; bei den Schwannzellen wurde entsprechend ein erhöhtes Migrationsverhalten festgestellt. Eine enge Kontaktaufnahme zwischen den nicht myelinisierenden Schwannzellen mit den Neuriten unter GDNF und NT-3 konnte gezeigt werden. Unter Zugabe von NT-3 lag zudem eine enge Interaktion der glialen Zellreihe mit den Spiralganglienzellen vor. Eine kumulative Wirkung hinsichtlich der Neuritendichte konnte durch die Zugabe von BDNF mit NGF- β nicht festgestellt werden.

Die Spiralganglienzellkulturen *in vitro* stellen zunächst eine wichtige Voraussetzung für die Tiermodelle *in vivo* dar. Für die klinische Anwendung ist es wichtig, mit der Auswahl von speziellen Neurotrophinen eine Neuritenaussprossung in Richtung der CI-Elektrode zu induzieren und eine möglichst enge bioprothetische Ankopplung zu erreichen. Auch die Gliazellen von menschlichen Spiralganglienzellen sind von besonderer Bedeutung. Mit zunehmendem Lebensalter sind die menschlichen Spiralganglienzellen immer mehr myelinisiert, die Ursache für die Induktion einer Myelinisierung ist Gegenstand der Forschung. Die hier eruierten Ergebnisse sprechen für eine enge glia-neuronale Wechselbeziehung in der Cochlea.

6 Quellen- und Literaturverzeichnis

- Airaksinen und Saarma (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.*, S. 383-394.
- Alam et al. (2007). Prosurvival and proapoptotic intracellular signaling in rat spiral ganglion neurons in vivo after the loss of hair cells. *The journal of comparative neurology*.
- Anton et al. (1994). Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, S. 2795-2799.
- Arnold, W. (1987). Myelination of the human spiral ganglion. *Acta Otolaryngol Suppl.*, S. 76-84.
- Arnold et al. (1980). Neue Aspekte zur Anatomie des menschlichen Spiralganglions. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*.
- Ascano et al. (2012). Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends Cell Biol*.
- Aschendorff et al. (2009). Technologisch-chirurgischer Fortschritt bei der Cochlea Implantation. In A. B. Ernst. *Cochlea Implantat heute*. Springer.
- Böhme (1996). Cochlea-Implantat. In R. B. Berghaus, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde Duale Reihe* (S. 193-195). Thieme.
- Bär et al. (1998). GDNF and its receptor component Ret in injured human nerves and dorsal root ganglia. *Neuroreport*, S. 43-7.
- Bampton und Taylor (2005). Effects of Schwann cell secreted factors on PC12 cell neurogenesis and survival. S. 29-48.
- Barde et al. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo*, S. 549-553.
- Battmer, R. (2009). 25 Jahre Cochlea-Implantat in Deutschland - Erfolgsgeschichte mit Perspektiven: Indikationserweiterung, Reliabilität der Systeme. In A. B. Ernst, *Cochlea Implantat heute* (S. 1-3). Springer.
- Behrends et al. (2012). *Duale Reihe Physiologie*. Thieme.
- Berghaus, A. R. (1996). Cochlea Implantat beim Erwachsenen. In A. R. Berghaus, *Hals-Nasen-Ohren Heilkunde* (S. 179-180). MLP.
- Bermingham et al. (Dec 1995). Human glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5. *Hum Genet.*, S. 671-3.
- Boström et al. (2010). Effects of Neurotrophic Factors on Growth and Glial Cell Alignment of Cultured Adult Spiral Ganglion Cells. *Audiology Neurotology*, S. 178.
- Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*(18), S. 223-53.
- Braun und Renz (1994). Die Rolle von Neurotrophen in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale (Übersicht). *Der Internist* 8, Springer, S. 1086-1095.
- Brewer et al. (1994). Neurobasal medium/B27 supplement: A new serum-free medium combination for survival of neurons. *Focus*(16), S. 6-9.
- Buecker, E. (1948). *Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system*. (Bd. 102). The Anatomical Record.
- Burden und Yarden (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, S. 847-55.
- Burette et al. (1998). Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat cochlear nucleus. *Microsc Res Tech.*, S. 224-233.

- Chacko et al. (2017). Role of BDNF and neurotrophic receptors in human inner ear development. *Cell and Tissue Research volume* .
- Chang et al. (2020). An Engineered Three-Dimensional Stem Cell Niche in the Inner Ear by Applying a Nanofibrillar Cellulose Hydrogel with a Sustained-Release Neurotrophic Factor Delivery System. *Acta Biomater*(108), S. 111–127.
- Chernousov und Carey (2000). Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histology and histopathology*, S. 593-601.
- Dai et al. (2004). Expression of Trk A receptors in the mammalian inner ear. *Hearing Res.*, S. 1-11.
- Daniloff et al. (1986). Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J. Cell Biol.*
- DiStefano et al.(1992). The neurotrophins, BDNF, NT-3 and NGF display distinct patterns of axonal transport. *Neuron*(8), S. 983-993.
- Dodson und Mohuiddin(2000). Response of spiral ganglion neurones to cochlear hair cell destruction in the guinea pig. *Journal of Neurocytology*.
- Druckenbrod et al.(2020). Neuronal processes and glial precursors form a scaffold for wiring the developing mouse cochlea. *Nat. Commun*, S. 5866.
- Emfors et al. (1992). Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur J Neurosci.*, S. 1140-1158.
- Ernst et al. (2009). Die Entwicklung minimal-invasiver chirurgischer Verfahren zur Cochlea-Implantat-Versorgung. In A. B. Ernst, *Cochlea Implantet heute* (S. 47-53). Springer.
- Eshraghi et al. (2012). The cochlear implant: Historical aspects and future prospects. *Anat Rec (Hoboken)*.
- Evans und Richards (1985). Genes for the α and γ subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO J*(4), S. 133-138.
- Fabricant und Todaro (1976). Increased levels of a nerve-growth-factor cross-reacting protein in "central" neurofibromatosis. *Lancet*, S. 4-7.
- Fahlke, C. (2015). Gehör. In C. L. Fahlke, *Taschenatlas Physiologie* (2. Auflage Ausg., S. 82-90). Urban und Fischer.
- Fahrig et al. (1987). Characterization of binding properties of the myelin-associated glycoprotein to extracellular matrix constituents. *EMBO J*.
- Faissner et al. (1984). Expression of neuronal cell adhesion molecule LI during development in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Dev. Brain Res*.
- Fallon, J. (1985). Neurite guidance by non-neuronal cells in culture: preferential outgrowth of peripheral neurites on glial as compared to nonglial cell surfaces. *J Neurosci.*, S. 3169-77.
- Farinas et al. (2001). Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neuroscience*(21), S. 6170-6780.
- Festing, M. (1979). Inbred Strains in Biomedical Research. *The Macmillan Press Ltd*.
- Festing, M. (1996). Origins and Characteristics of Inbred Strains of Mice. *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*.
- Fitzakerley, J. (2001). Survival and differentiation of neurons cultured from the mouse cochlear nucleus on extracellular matrix components. *Neurosci Lett* . .
- Flores-Otero und Davis (2011). Synaptic proteins are tonotopically graded in postnatal and adult type I and type II spiral ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, S. 1455-1475.
- Frade et al. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*(383), S. 166-168.

- Frick et al. (2020). Age-Dependency of Neurite Outgrowth in Postnatal Mouse Cochlear Spiral Ganglion Explants. *Brain Sci*.
- Götz et al. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*(372), S. 266-269.
- Gillespie et al. (2001). LIF is more potent than BDNF in promoting neurite outgrowth of mammalian auditory neurons in vitro. *Neuroreport*.
- Gomaa et al.(2003). Residual speech perception and cochlear implant performance in postlingually deafened adults. *Ear Hear*. 24, S. 539–544.
- Green et al. (2012). The Trk A, B, C's of Neurotrophins in the Cochlea. *The Anatomical Record* 295. S.1877-1895.
- Greene et al. (1969). Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7S nerve growth factor. *Biochemistry*(8), S. 3735-3741.
- Höke et al. (2003). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Alters Axon Schwann Cell Units and Promotes Myelination in Unmyelinated Nerve Fibers. *Journal of Neuroscience*, S. 561-567.
- Hallbook et al. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. *Neuron*, S. 845- 858.
- Han et al. (2017). Postinjury Induction of Activated ErbB2 Selectively Hyperactivates Denervated Schwann Cells and Promotes Robust Dorsal Root Axon Regeneration. *J Neurosci*, S. 10955–10970.
- Han et al. (2007). Cdc2- mediated Schwann cell migration during peripheral nerve regeneration. *Journal of cell science*, S. 246-255.
- Han et al. (2017). Therapeutic value of nerve growth factor in promoting neural stem cell survival and differentiation and protecting against neuronal hearing loss. *Moll Cell Biochem.*, S. 149-159.
- Hansen et al. (2001). Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. *Hearing Research*, S. 87-98.
- Hansen, S. (2006). Das Wachstumsverhalten von Spiralganglienneuriten auf alloplastischen Materialien.
- Hapner et al. (2006). NT-3 and CNTF exert dose-dependent, pleiotropic effects on cells in the immature dorsal root ganglion: Neuregulin-mediated proliferation of progenitor cells and neuronal differentiation. *Development Biology*, S. 182-197.
- Harre et al. (2021). Potentiation of Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Protection of Spiral Ganglion Neurons by C3 Exoenzyme/Rho Inhibitor. *Front cell Neurosci*.
- Hegarty et al (1997). Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and additive with that by neurotrophins or cAMP and required elevation of (Ca²⁺)_i within a set range. *J. Neuroscience* 17.
- Hofstetter et al. (2010). Sodium/hydrogen exchanger NHA2 in osteoclasts: subcellular localization and role in vitro and in vivo. *Bone*.
- Hohn et al. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*(344), S. 339-341.
- Hu et al. (2005). BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. *Development*(132), S. 4285 - 4298.
- Huang und Reichardt (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*.(24), S. 677-736.
- Huang und Reichardt (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, S. 609-642.
- Huckstorf, C. (2013). In J. W. Huppelsberg, *Kurzlehrbuch Physiologie* (4. Ausg.). Georg Thieme Verlag.

- Huelsenbeck et al. (2012). C3 peptide promotes axonal regeneration and functional motor recovery after peripheral nerve injury. *Neurotherapeutics.*, S. 185-98.
- Ide, C. (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*, S. 101-21.
- Ison et al. (2007). Age-related hearing loss in C57BL/6J mice has both frequency-specific and non-frequency-specific components that produce a hyperacusis-like exaggeration of the acoustic startle reflex. *J Assoc Res Otolaryngol*.
- Jessen und Mirsky (1999). Schwann cell and their precursors emerge as a major regulator of nerve development. *Trends Neuroscience* 22, S. 402-410.
- Jessen und Mirsky (2008). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*, S.1552-1565.
- Jing et al. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*, S. 1113-24.
- Jouhilahti et al. (2008). Class III β -Tubulin Is a Component of the Mitotic Spindle in Multiple Cell Types. *J Histochem Cytochem.*, S. 1113–1119.
- Kaplan und Miller (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*(10), S. 918-921.
- Katoh-Semba et al. (1996). Tissue distribution and immunocytochemical localization of neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats. *J Neurochem.*, S. 330-7.
- Kirsch, J. (2006). Ohr- Hör- und Gleichgewichtsorgan. In A. D. Aumüller, *Anatomie - Duale Reihe* (S. 1081-1101). Thieme.
- Kucharava et al.(2020). Sodium-hydrogen exchanger 6 (NHE6) deficiency leads to hearing loss, via reduced endosomal signalling through the BDNF/Trk pathway . *Scientific Reports volume* .
- Labs, J. (2021). *Janvier Labs Research Models*. Abgerufen am 12.5.2021 von https://www.janvier-labs.com/en/fiche_produit/c57bl-6jrl_mouse/pdf/
- Lajmi, L. (2019). *Ostfalia Hochschule für angewandte Wissenschaften*. Von www.ostfalia.de abgerufen
- Lee et al. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, S. 1945-8.
- Leemhuis et al. (2007). VIP induces the elongation of dendrites and axons in cultured hippocampal neurons: role of microtubules. *Peptides*.
- Lefebvre et al. (1991a). TGFSS1 modulates bFGF receptor message expression in cultured adult auditory neurons. *Neuroreport* 2.
- Lefebvre et al. (1992b). Peripheral and central target-derived trophic factor(s) effects on auditory neurons. *Hear Res* 58.
- Leibrock et al. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, S. 149-152.
- Levi-Montalcini et al. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J Exp Zool*.
- Levi-Montalcini, R. (1995). Update of the NGF saga. *J Neurol Sci*(130), S. 119-127.
- Levi-Montalcini, R. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.*, 116, S. 321-61.
- Lewin und Barde (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev. Neuroscience* 19, S. 289-317.
- Limberger, A. R. (2006). *Spielen Neurotrophine eine Rolle bei der Entstehung der Altersschwerhörigkeit?* DGA Jahrestagung.
- Lin et al. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, S. 1130-2.

- Linthicum und Fayad (2009). Spiral Ganglion Cell Loss is Unrelated to Segmental Cochlear Sensory System Degeneration in Humans. *Otol Neurotol.*, S. 418-422.
- Liu et al. (2013). NHE8 plays an important role in mucosal protection via its effect on bacterial adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol.*
- Liu und Rask-Andersen (2014). Immunohistological analysis of neurturin and its receptors in human cochle. *Auris Nasus Larynx.*
- Lommatzsch et al. (1999). Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol.*(155), S. 1183-1193.
- Mahanthappa et al.(1996). Glial Growth Factor 2, a Soluble Neuregulin, Directly Increases Schwann Cell Motility and Indirectly Promotes Neurite Outgrowth. *J Neuroscience*, S. 4673-4683.
- Maisonpierre et al. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, S. 501-9.
- Malgrange et al. (1996). Effects of neurotrophins on early auditory neurones in cell culture. *NeuroReport*, S. 913-917.
- McKerracher et al. (1996). Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Molecular Neurobiology* (12), S. 95–116.
- Meier et al. (1999). Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci*, S. 3847-59.
- Miller et al. (2001). Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates. *TISSUE ENGINEERING*.
- Mirsky et al. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *JPNS*, S. 122-135.
- Nagel und Gürkow (2009). Hörverlust. In P. Nagel, & R. Gürkow, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde* (2. Auflage Ausg., S. 6). Urban und Fischer.
- Nassenstein, C. (2000). Die Bedeutung von Neurotrophinen für die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale (Dissertation).
- Naveilhan et al. (2006). Differential Regulation of mRNAs for GDNF and its Receptors Ret and GDNFR α After Sciatic Nerve Lesion in the Mouse. *European Journal of Neuroscience*.
- Neale et al. (1993). Early dendrite development in spinal cord cell cultures: a quantitative study. *Neurosci Res* , S. 54-66.
- Nemoto et al. (1998). Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*(245), S. 284-288.
- Nilsson et al. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from zebrafish. *FEBS Letters*(424), S. 285-290.
- Notterpek, L. (2003). *Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor*(26), S. 232-234.
- O`Leary und Hughes (2003). Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, S. 25738-44.
- Ohgaki et al. (2011). Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions. *Biochemistry*.
- Ota und Kimura (1980). Ultrastructural Study of the Human Spiral Ganglion. *Acta Oto-Laryngologica*, S. 53-62.
- Paulsen et al. (2010). *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen*. Elsevier GmbH München.

- Pettingill et al. (2008). Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro. *Neuroscience*(152), S. 821-8.
- Pettingill et al. (2007). Neurotrophic factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in the auditory system. *IEEE Trans Biomed Eng.*, S. 1138-48.
- Pirvola et al. (1992). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *PNAS*, S. 9915 – 9919.
- Porter et al. (1986). Schwann cells stimulated to proliferate in the absence of neurons retain full functional capability. *The Journal of neuroscience*, S. 3070–3078.
- Provenzano et al. (2011). P75 NTR expression and nuclear localization of p75 NTR intracellular domain in spiral ganglion Schwann cells following deafness correlate with cell proliferation. *Molecular and Cellular Neuroscience* , S. 306-15.
- Ptok, M. (2009). Ursachen und entwicklungsphysiologische Diagnostik kindlicher Schwerhörigkeiten. In B. T. Ernst, *Cochlea Implantat heute* (S. 13-15). Springer.
- Remekers et al. (2012). Neurotrophins and their role in the cochlea (Review). *Hearing Research* 288, S. 19-33.
- Reynolds, W. (1993). Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol.*, S. 683-93.
- Rodriguez-Tebar et al. (1991). Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biol Sci*, S. 255-258.
- Rodriguez-Tebar et al. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO*.
- Roehm und Hansen (2005). Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 13.
- Roland, J. J. (2006). Cochlear Implant Electrode History, Choices, and Insertion Techniques. In R. J. Waltzman SB, *Cochlear Implants* (S. S. 110-122). Thieme.
- Ruttiger et al. (2007). BDNF mRNA expression and protein localization are changed in age-related hearing loss. *Neurobiology of aging*, S. 586-601.
- Saarma und Sariola (1999). Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech*, S. 292-302.
- Schachner, M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM and myelin associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell Biol.*
- Schecterson und Bothwell (1994). Neurotrophin and neurotrophin receptor mRNA expression in developing inner ear. *Hear Res*, S. 92-100.
- Schimmang et al. (2003). Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss. *Development*, S. 4741-50.
- Schmidt, G. (2018). Methods to Study Rho GTPases Using Bacterial Toxins. *Methods Mol Biol.*, S. 141-154.
- Schröder et al. (2015). Proteome Alterations of Hippocampal Cells Caused by Clostridium botulinum C3 Exoenzyme. *J Proteome Res.*, S. 4721-33.
- Seilheimer und Schachner (1987). Regulation of neural cell adhesion molecule expression on cultured mouse Schwann cells by nerve growth factor. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*
- Sekine et al. (1989). Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.*

- Server und Shooter (1977). Nerve growth factor. *Adv. Protein Chem.*(31), S. 339-409.
- Shepherd et al. (2008). Neurotrophins and electrical stimulation for protection and repair of spiral ganglion neurons following sensorineural hearing loss. *Hear.Res.* 242.
- Shew et al. (2021). Evaluating Neurotrophin Signaling Using MicroRNA Perilymph Profiling in Cochlear Implant Patients With and Without Residual Hearing. *Otol Neurotol.*
- Sjöstrand et al. (2007). Disruption of the GDNF binding site in NCAM dissociates ligand binding and homophilic cell adhesion. *J Biol Chem.*, S. 12734-40.
- Sobkowicz et al. (1993). Tissue culture of the organ of Corti. *ta Otolaryngol Suppl.*
- Song et al. (2005). Knockout of p75NTR impairs remyelination of injured sciatic nerve in mice. *Journal of Neurochemistry (Volume 96)*, S.833-842.
- Spaniel-Borowski, K. (2006). Zytologie und Histologie-Grundlagen. In Aumüller, Aust, Doll, Engele, Kirsch, Mense, . . . Zilch, *Anatomie Duale Reihe* (S. 69-71). Thieme.
- Stöver et al. (2000). Expression of the GDNF family members and their receptors in the mature rat cochlea. *Brain Res Mol Brain Res*(76), S. 25-35.
- Stöver et al. (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor complex are expressed in the auditory nerve of the mature rat cochlea. *Hear Res*, S. 143-51.
- Stöver et al. (2007). Neuritenwachstum in vitro durch BDNF und GDNF in Kombination mit Dexamethason auf kultivierte Spiralganglienzellen. *Laryngo-Rhino-Otol.*
- Stankovic und Corfas (2003). Real-time quantitative RT-PCR for low-abundance transcripts in the inner ear: analysis of neurotrophic factor expression. *Hear Res.* , S. 97-108.
- Stankovic et al. (2004). Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *J Neuroscience*, S. 8651-61.
- Stichel und Müller (1991). Dissociated cell culture of rat cerebral cortical neurons in serum-free, conditioned media: GABA-immunopositive neurons. *Brain Res Dev Brain Res*(64(1-2)), S. 145-154.
- Sugawara, M. M. (2007). Dynamic patterns of neurotrophin 3 expression in the postnatal mouse inner ear. *The journal of comparative neurology.*
- Szobota et al. (2019). BDNF, NT-3 and Trk receptor agonist monoclonal antibodies promote neuron survival, neurite extension, and synapse restoration in rat cochlea ex vivo models relevant for hidden hearing loss. *PLoS One* .
- Tan und Stephard (2006). Aminoglycoside-induced degeneration of adult spiral ganglion neurons involves differential modulation of tyrosine kinase B and p75 neurotrophin receptor signaling. *Am J Pathol.*, S. 528-43.
- Teng et al. (2010). Understanding Proneurotrophin Actions: Recent Advances and Challenges. *Dev Neurobiol.*(70(5)), S. 350-359.
- Tomaselli und Reichardt (1988). Peripheral motoneuron interactions with laminin and schwann cell-derived neurite-promoting molecules: Developmental regulation of laminin receptor function. *J. Neurosci. Res.* (21), S. 275–285.
- Trepel, M. (2008). *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. Elsevier.
- Van De Water und Ruben (1971). Organ Culture of the Mammalian Inner Ear. *Acta Otolaryngol.*
- Varon et al. (1970). The Nerve Growth Factor Proteins of the Mouse Submaxillary Gland. In *Biochemistry of Brain and Behavior* (S. 41-64). Springer.
- Varoon et al. (1968). Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. *Biochem.*(7), S. 1296-1303.
- Vries et al. (2019). Detection of BDNF-Related Proteins in Human Perilymph in Patients With Hearing Loss. *Front Neurosci.*

- Wang et al. (2017). Otoprotective effects of mouse nerve growth factor in DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss. *Neurosci Res.*, S. 1937-1950.
- Welsch (2010). *Lehrbuch der Histologie*. Urban&Fischer Verlag/Elsevier.
- Wheeler et al. (1994). Expression of BDNF and NT-3 mRNA in hair cells of the organ of Corti: quantitative analysis in developing rats. *Hear Res.*, S. 46-56.
- Widera et al. (2011). Schwann cells can be reprogrammed to multipotency by culture. *STEM CELLS AND Development*, 20, S. 2053-2064.
- Wiechers et al. (1999). A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice. *J Neuroscience*(19), S. 3033-3042.
- Wise et al. (2011). The effect of deafness duration on neurotrophin gene therapy for spiral ganglion neuron protection. *Hear Res.*(278(1-2)), S. 69–76.
- Woodnutt et al. (2000). Neurotrophin receptors and nerve growth factor are differentially expressed in adjacent nonneuronal cells of normal and injured tooth pulp. *Cell Tissue Res*(299), S. 225-236.
- Xu et al. (2013). Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia*, S. 1029-40.
- Ylikoski et al. (1993). Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hear Res.*, S. 69-78.
- Ylikoski et al. (1998). Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. S. 17-26.
- Zanin et al. (2014). Development of a cell-based treatment for long-term neurotrophin expression and spiral ganglion neuron survival. *Neuroscience*(277), S. 690-9.
- Zha et al. (2001). BDNF synthesis in spiral ganglion neurons is constitutive and CREB-dependent. *Hear Res.*, S. 53-68.
- Zhang et al. (2013). Stem cell transplantation via the cochlear lateral wall for replacement of degenerated spiral ganglion neurons. *Hear Res.*(298), S. 1-9.

7 Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Stefan Hansen, danke ich für seine Motivation und enorme Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Schipper, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung bedanken.