

Charakterisierung von otischen Stammzellen zur
Entwicklung eines *in vitro* Modells vom Innenohr

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Luu, Ngoc-Nhi Catharina

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Löwenheim

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Meiner Familie, meiner Großmutter,
in Liebe und Dankbarkeit.

*„Das ist faszinierend! Ich kann einfach nicht aufhören, Ihnen zuzuhören und wünsche mir, es meinen Patienten ähnlich sagen zu können.“ – „**Ich habe gelernt, dass Menschen vergessen, was man gesagt hat, dass Menschen vergessen, was man getan hat, aber dass Menschen niemals vergessen, welche Gefühle man in ihnen hervorgerufen hat.**“*

*„This is fascinating! I just can't stop listening to you and wish to tell it my patients the same way.“ – „**I've learned that people will forget what you said, people will forget what you did, but people will never forget how you made them feel.**“*

- Stephen D. Rauch, zitiert nach Maya Angelou

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Strategien der Haarzellregeneration im Corti'schen Organ	5
1.2	Stützzellen als otische Progenitorzellen	9
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	10
1.3.1	Oberflächenmarker zur Selektion distinkter Stützzellpopulationen	10
1.3.2	MACS zur Anreicherung distinkter Stützzellpopulationen	11
1.3.3	FACS zur Anreicherung distinkter Stützzellpopulationen	12
1.3.4	Otische Progenitorzellen zur Regeneration von Corti'schen Zellen	13
1.3.5	Inhibition des Notch-Signalwegs als chemisches <i>in vitro</i> Stimulanz	15
1.3.6	Ziele dieser Arbeit im Überblick.....	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Für Organentnahme verwendete Tiere.....	20
2.2	Explantation	20
2.3	Immunhistochemische Identifizierung von Stützzellen.....	21
2.3.1	Feinpräparation und chemische Fixierung der Cochlea von Mäusen	21
2.3.2	Anfertigung von Kryoschnitten	22
2.3.3	Immunhistochemische Markierung der Oberflächenmarker GLAST und p75 ^{NTR} an Kryoschnitten der murinen Cochlea.....	23
2.4	MACS zur Gewinnung von distinkten Stützzellpopulationen	24
2.4.1	Feinpräparation des postnatalen Corti'schen Organs der Maus	24
2.4.2	Gewinnung einer Einzelzellsuspension	25
2.4.3	Abgrenzung einer geeigneten Einzelzellpopulation	27
2.4.4	Untersuchung von Autofluoreszenz und Antikörperbindung	29
2.4.5	Unsortierte markierte Zellen zur Effizienzkontrolle	32
2.4.6	Markierung und Durchführung von MACS	34
2.4.7	Effizienzkontrolle von MACS	38
2.5	FACS zur Gewinnung von distinkten Stützzellpopulationen	42
2.5.1	Durchflusszytometrische Kontrollmessungen	42
2.5.2	Markierung und Durchführung von FACS	42
2.6	Zellkultur unter Proliferationsbedingungen	47
2.6.1	Proliferations-Assay.....	47
2.6.2	Quantifizierung von morphologisch unterschiedlichen Sphären	48
2.6.3	EdU-Assay zur Bestimmung des Proliferationspotenzials	49
2.7	Zellkultur unter Differenzierungsbedingungen	50

2.7.1	Zellkammerbeschichtung	50
2.7.2	Differenzierungs-Assay	51
2.7.3	Kultivierung unter <i>in vitro</i> Zugabe eines Notch-Inhibitors	52
2.8	Kultivierung von segmental getrennten Corti'schen Zellen	53
2.9	Immunhistochemische Markierung von Sphären	56
2.10	Immunhistochemische Markierung von differenzierten Sphären	57
2.11	Mikroskopische Analyse	59
2.12	Programme	60
2.13	Statistische Datenauswertung	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Identifizierte Stützzellpopulationen zur Stammzellenanreicherung	62
3.1.1	Immunhistochemische Darstellung der Stützzellpopulationen	62
3.1.2	Einzelzellsuspension als zelluläres Ausgangsmaterial	64
3.2	Identifizierung einer Stammzellpopulation mittels MACS	64
3.2.1	Isolierung von p75 ^{NTR} und GLAST markierten Zellen mittels MACS	64
3.2.2	Sphärenbildungskapazität von MACS-sortierten Zellen	67
3.2.3	Proliferationspotenzial von Sphären aus MACS-sortierten Zellen	71
3.2.4	Stammzellartigkeit von Sphären aus MACS-sortierten Zellen	72
3.2.5	Differenzierungspotenzial von Sphären aus MACS-sortierten Zellen	74
3.3	Identifizierung einer Stammzellpopulation mittels FACS	78
3.3.1	Isolierung von p75 ^{NTR} und GLAST markierten Zellen mittels FACS	78
3.3.2	Sphärenbildungskapazität von FACS-sortierten Zellen	81
3.3.3	Proliferationspotenzial von Sphären aus FACS-sortierten Zellen	83
3.3.4	Stammzellartigkeit von Sphären aus FACS-sortierten Zellen	84
3.4	Identifizierung einer Stammzellpopulation aus Corti'schen Zellen nach <i>in vitro</i> Inhibition des Notch-Signalwegs	85
3.4.1	Sphärenbildungskapazität von Zellen aus verschiedenen Segmenten des Corti'schen Organs	85
3.4.2	Differenzierungspotenzial von Sphären aus verschiedenen Segmenten des Corti'schen Organs	89
3.4.3	Inhibition des Notch-Signalwegs in differenzierenden Sphären	91
4	Diskussion	95
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	95

4.2	p75^{NTR}- und GLAST- exprimierende Stützzellen als Progenitorzellen von Haarsinneszellen und Stützzellen.....	96
4.3	Beurteilung von MACS zur Stammzellenanreicherung	99
4.3.1	Effizienz von MACS.....	99
4.3.2	Sphärenbildung nach MACS	103
4.3.3	Zelldifferenzierung nach MACS.....	106
4.4	Beurteilung von FACS zur Stammzellenanreicherung	108
4.4.1	Effizienz von FACS.....	108
4.4.2	Sphärenbildung nach FACS	110
4.4.3	Zelldifferenzierung nach FACS	111
4.5	Chemische Stimulation zur Beeinflussung des Zellschicksals	116
4.5.1	Notch-Signalweg-Inhibition während der Zelldifferenzierung	116
4.5.2	Regeneration von Corti'schen Zellen ohne Transdifferenzierung	118
4.5.3	Beeinflussung der zellulären Organisation nach Zelldifferenzierung	119
4.6	Ausblick	120
5	Zusammenfassung	122
6	Literatur	124
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	134
8	Anhang	135
8.1	Verzeichnis der Materialien	135
8.2	Verzeichnis der Protokolle	142
8.2.1	Immunhistochemische Markierung an Kryoschnitten der Maus.....	142
8.2.2	Kontrolluntersuchungen zur Zellsortierung mittels MACS und FACS	143
8.2.3	MACS-Sortierung	145
8.2.4	FACS-Sortierung	147
8.2.5	Immunhistochemische Markierung von Sphären	147
8.2.6	Proteinbeschichtung von Kulturplatten zur Adhäsion von Sphären	149
8.2.7	Immunhistochemische Markierung von differenzierten Sphären	150
8.3	Verzeichnis der Abbildungen.....	152
9	Danksagung.....	154
10	Lebenslauf.....	156

Abkürzungsverzeichnis

(h)-Sphären	hohle Sphären
(s)-Sphären	solide Sphären
(t)-Sphären	transitionale Sphären
°C	Grad Celsius
3R	3R-Prinzipien: Replacement, Reduction, Refinement
Abb.	Abbildung
ÄHZ	Äußere Haarzelle
ÄPhZ	Äußere Phalangenzelle
ÄPZ	Äußere Pillarzelle
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor
BM	Basilarmembran
BP	Blockadepuffer
BP-Filter	Band Pass-Filter
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
CD	Oberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation)
cLSM	Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (Confocal laser scanning microscope)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	Differentialinterferenzkontrast, Durchlicht
DIV	Tage in Kultur (day in vitro)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Denaturierungspuffer
E13,5	Embryonales Alter 13,5
EAAT1	Exzitatorischer Aminosäure-Transporter (Excitatory Amino Acid Transporter 1) = GLAST
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward scatter)
FSC-A	Vorwärtsstreulicht-Bereich (Forward scatter area)
GER	großer epithelialer Wulst (Greater epithelial ridge)
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter; CD11
GLAST ⁺	GLAST positiv markiert
GLAST ⁻	GLAST negativ markiert
HAc	Histon-Acetyltransferase
HHBSS	Hepes-gepufferte Hank's ausgeglichene Salzlösung (Hepes-buffered Hank's balanced salt solution)
HZ	Hensenzellen
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor)
IHZ	Innere Haarzelle
IPhZ	Innere Phalangenzelle
IPZ	Innere Pillarzelle
Ktrl.	Kontrolle
LER	kleiner epithelialer Wulst (Lower epithelial ridge)
LP-Spiegel	Long Pass-Spiegel

M	MyosinVIIa
MACS	Magnet-assoziierte Zellsortierung
MET	Mechano-elektrische Transduktion
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger-RNA)
MS	Modiolous mit Spiralganglion
MyoVIIa	MyosinVIIa
n	Anzahl der Versuche (Number)
NI	Notch-Inhibitor
NICD	Notch-intrazelluläre Domäne
OC	Corti'sches Organ
p	Postnatal
$p = p$ -Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert (p -value, Probability-value)
p0	Postnatales Alter von 0 Tagen; bei Geburt
P1	Zellpopulation zur FACS-Analyse oder –Sortierung
p27 ^{Kip1}	zyklinabhängiger Kinaseinhibitor
p3-5	Postnatales Alter von 3-5 Tagen
p75 ^{NGFR}	p75-Nerve growth factor receptor = p75 ^{NTR}
p75 ^{NIR}	p75-Neurotrophinrezeptor; CD271
p75 ^{NIR+}	p75 ^{NIR} positiv markiert
p75 ^{NIR-}	p75 ^{NIR} negativ markiert
Patch	aus Sphären generierte epitheliale Zellverbände, differenzierte Sphären
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphat buffered salt solution)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMT	Photomultiplier Tube
Q1-Q4	Quadranten 1-4
Ref.	Referenznummer
RP	Reaktionspuffer
rpm	Runde pro Minute (Rounds per minute)
RT	Raumtemperatur, ca. +21°C
S	Sox2
SL	Spiralligament
SMZ	submembrane Zone
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side scatter)
SSC-A	Seitwärtsstreulicht-Bereich (Side scatter area)
TACE	TNF- α -konvertierendes Enzym (TNF- α -converting enzyme)
TGF α	Transforming / Tumor growth factor α
TM	Tektorialmembran
U	Einheit (Unit)
US	Unsortiert (Unsorted)

1 Einleitung

Das Hören ist die Sinneswahrnehmung, die bei Lebewesen für die Weiterleitung und Interpretation von akustischen Signalen aus der Umwelt verantwortlich ist. Akustische Signale bestehen aus Schallwellen, die vom äußeren Ohr aufgenommen und durch den Gehörgang zum Trommelfell weitergeleitet werden. In Schwingungen versetzt gibt das Trommelfell die Schallwellen als Vibration, als sogenanntes akustisches Schallsignal, an die Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) des Mittelohres weiter. Der Stapes ist mit seiner Fußplatte beweglich in das ovale Fenster (Fenestra ovalis) des Innenohres verankert und leitet die Vibration an die Perilymphe der Cochlea weiter. Die vibrierende Flüssigkeit versetzt die Basilarmembran in Form einer Wanderwelle in Schwingung. Diese beginnt an der Basis und setzt sich bis in die Apex fort, um dort am Helicotrema in Richtung des runden Fensters zu wenden. Auf der Basilarmembran, innerhalb des Schneckengangs (Ductus cochlearis) befindet sich das Corti'sche Organ mit den Haarzellen, deren Stereozilien korrelierend mit der Intensität der Wanderwelle und damit des Schallsignals ausgelenkt werden. Jedem Ort auf der Basilarmembran ist dabei eine bestimmte Frequenz zugeordnet, sodass diese anatomische und physikalische Besonderheit eine frequenzabhängige, tonotopische Weiterleitung des Schallsignals durch die Haarzellen an die Hörnerven ermöglicht. Die Haarsinneszellen geben das elektromechanisch transformierte Signal an die Hörbahn und schließlich an die Hörrinde, an den Gyrus temporalis superior und die Gyri temporales transversi (Heschl'sche Querwindungen) des Temporallappens weiter. Hier erfolgt schließlich die Verarbeitung und Interpretation des akustischen Schallsignals. Töne und Geräusche gelangen zu Bewusstsein und bestimmen unser Hörvermögen. Neben dem Richtungshören, der Wahrnehmung von Warnsignalen und der akustischen Erfassung der Umwelt basiert ein großer Teil der sozialen Kommunikation auf das Hörvermögen. Eine gesonderte Rolle spielt speziell bei uns Menschen die differenzierte Wahrnehmung von Musik und das Verständnis von Sprache. Eine Schwächung oder Verlust dieser Sinneswahrnehmung geht

daher mit erheblichen Auswirkungen auf die subjektive Lebensqualität in sozialen wie auch beruflichen Bereichen einher.

Schwerhörigkeit ist die häufigste Berufserkrankung und hat neben der individuellen Arbeitsunfähigkeit erhebliche volkswirtschaftliche Produktivitätsverluste als Folge. Allein in Europa wird die Anzahl der Schwerhörigen auf insgesamt 22,5 Millionen Menschen geschätzt, dabei 2 Millionen Menschen mit kompletter Ertaubung (Schneider, 2005). Die geschätzten Gesamtkosten inklusive Sprachtherapie, Hörhilfen und Arztkosten belaufen sich auf 3.500 Euro pro Patient und 78 Milliarden Euro insgesamt pro Jahr (Schneider, 2005, European agency for safety and health at work). Dem gegenüber stehen die Kosten für unbehandelten Hörverlust, die in Europa eine Höhe von 213 Milliarden Euro pro Jahr erreichten (Shield, 2006, Evaluation of the social and economic costs of hearing impairment. A report for Hear-it). Dass Schwerhörigkeit auch ein internationales Problem ist, zeigten Daten der Weltgesundheitsorganisation 2015: Weltweit leiden 360 Millionen Menschen und damit etwa 5 % aller Menschen unter einer Schwerhörigkeit (WHO, 2015). Davon lebt die Mehrheit in Entwicklungsländern, in denen es an nötigen Versorgungsmöglichkeiten und Fachzentren mangelt. Insgesamt ist die Schwerhörigkeit die häufigste Sinneserkrankung und dritthäufigste chronische Erkrankung aller Menschen weltweit.

Per Definitionem beschreibt die Schwerhörigkeit eine Minderung des Hörvermögens, der Fähigkeit, akustische Reize bzw. Schall wahrzunehmen. Die Ursache kann dabei in allen Abschnitten des Hörorgans lokalisiert sein. Dazu zählen das äußere Ohr mit Ohrmuschel und Gehörgang, das Mittelohr, das Innenohr inklusive der Hörschnecke (Cochlea) sowie weiter tiefer liegende Strukturen wie Hörnerv, Hörbahn bis hin zur zerebralen Hörrinde. Basierend auf der anatomischen Lokalisation wird zwischen Schalleitungsschwerhörigkeit, Schallempfindungsschwerhörigkeit, Schallwahrnehmungsschwerhörigkeit sowie kombinierter Schwerhörigkeit als Mischform differenziert. Während die Ursachen der Schalleitungsschwerhörigkeit sich auf Pathologien im Mittelohr oder im äußeren Gehörgang beschränken, liegt die Störung bei einer

Schallwahrnehmungsstörung weiter zentral in der Hörrinde, im primären oder sekundären auditiven Cortex des Temporallappens. Hier spricht man von einer retrocochleären Schallwahrnehmungsstörung, für die nicht die Weiterleitung, sondern die Verschaltung und Interpretation der akustischen Signale bei intakter Cochlea ursächlich ist. Vermehrte Wahrnehmung von Tönen und Geräuschen als Tinnitus ist oftmals die Folge. Wird dagegen das Innenohr geschädigt spricht man von einer Schallempfindungsstörung, einer sensorineuralen Schwerhörigkeit, bei der ein Defekt auf sensorischer, zellulärer Rezeptorebene oder auf neuronaler Ebene vorliegt.

Der sensorineurale Innenohrschaden stellt die häufigste Form einer einseitigen Schwerhörigkeit dar und geht häufig mit einem Verlust von Haarsinneszellen einher (Nadol, 1993): Die Ursachen hierfür sind vielseitig und reichen von angeborener, genetisch bedingter Schwerhörigkeit, physiologischer Altersdegeneration (Presbyakusis), Intoxikation bei Mittel- oder Innenohrentzündung, Infektionskrankheiten über akuten und chronischen Schalltraumata, Schädeltraumata bis zur Menière'schen Krankheit und Tumoren. Ebenso können ototoxische Substanzen das Innenohr bis zur kompletten Ertaubung schädigen. Oftmals müssen derartige ototoxische Effekte insbesondere im Rahmen einer medikamentösen Behandlung als Nebenwirkung in Kauf genommen werden. Resultat ist häufig ein permanenter sensorineuraler Schaden mit konsekutiv irreversibler Ertaubung, da der Mensch nicht in der Lage ist, verlorene Haarsinneszellen neu zu bilden oder geschädigte Haarsinneszellen zu regenerieren. Die Irreversibilität liegt auch in den aktuell noch sehr beschränkten Behandlungsmöglichkeiten begründet: Die Schallempfindungsschwerhörigkeit lässt sich meistens weder medikamentös noch operativ therapieren. Ist der Innenohrschaden infektionsbedingt kann eine antibiotische oder eine operative Behandlung zumindest ein Fortschreiten des Haarzellverlusts verhindern. Liegt bereits ein Funktionsverlust des Innenohres vor, können Hörgeräte helfen, das reduzierte Hörvermögen zu kompensieren. Im Fall einer kompletten Ertaubung stehen Cochlea-, Mittelohr- oder Hirnstammimplantate als therapeutische Optionen zur Verfügung, bei denen die Prognose jedoch wesentlich vom Alter des Patienten und einer rechtzeitigen

Implantation abhängt. Alle bisherigen Behandlungsstrategien sind jedoch nicht in der Lage, einen permanenten Haarzellverlust adäquat auszugleichen.

Trotz des hohen Bedarfs stehen bisher keine kausalen, auf pharmakologischen Wirkstoffen basierenden Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Die experimentelle Untersuchung des Innenohres von Säugetieren stellt aufgrund der schwierigen anatomischen Zugänglichkeit und der komplexen Zytoarchitektur eine große Herausforderung dar und wird durch die geringe Zellzahl des sensorischen Epithels zusätzlich erschwert. Die Verwendung von *in vitro* Kulturen kann für die Entwicklung eines Modells zum „Wirkstoffscreening“ otoprotektiver und ototoxischer Substanzen von besonderem Vorteil sein, da definierte Kulturparameter ohne pharmakokinetische Einflüsse bei gleichzeitiger Reduktion aufwendiger Tierversuche besser kontrolliert werden können. Die Kultivierung von murinen Cochleae postnataler Altersstadien hat den Nachteil, dass pro eingesetztes Ohr nur ein Versuch durchgeführt werden kann, sodass die Anzahl an Versuchstieren im Vergleich zu *in vivo* Modellen nicht wesentlich verringert wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aus dem Corti'schen Organ von Säugetieren otische Stammzellen gefunden (Izumikawa et al., 2005, Oshima and Heller, 2005) und *in vitro* isoliert zur Proliferation gebracht werden können (Diensthuber et al., 2009, Oshima et al., 2009, Waldhaus et al., 2012). Die Stammzellen bilden zunächst sogenannte Sphären aus, die das Potenzial besitzen, sich unter entsprechenden Kulturbedingungen in epitheliale Zellverbände, den differenzierten Sphären („Patches“) zu differenzieren. Da die Zellen dieser Patches typische, immunhistochemische Merkmale von Haar- und Stützzellen des sensorischen Sinnesepithels besitzen, werden sie als „Mini-Ohren“ bezeichnet und stellen den Ausgangspunkt zukünftiger Wirkstoffscreening-Verfahren dar. Trotz des Fortschritts muss diese Methode hin zu einem „high-throughput“-Screeningmodell und gemäß der Prinzipien der 3R-Forschung weiter optimiert und standardisiert werden:

(1) **Replacement**, der Ersatz von Tierversuchen durch tierversuchsfreie Verfahren, (2) **Reduction**, die Reduktion der notwendigen Tierversuche und der

dafür eingesetzten Versuchstiere und (3) **Refinement**, die Verfeinerung und Verbesserung der Versuchsabläufe, sodass die Beanspruchung der eingesetzten Versuchstiere reduziert und gleichzeitig mehr Informationen aus Experimenten gewonnen werden können (SET).

Diese Arbeit wurde auch von der „Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen“ (SET) unterstützt und hatte auch das Ziel, ein effizientes Stammzell-basiertes Tierersatzmodell auf Basis der 3R-Prinzipien zu etablieren.

1.1 Strategien der Haarzellregeneration im Corti'schen Organ

Haarsinneszellen sind hochspezialisierte Rezeptoren des Innenohres, die mechanische Reize in elektrische Reize umwandeln und funktionelles Hören durch Reizweiterleitung an das Gehirn ermöglichen. Die Bildung der Haarzellen beim Menschen erfolgt während des 1. Trimenons der Embryonalentwicklung und ist mit einer Gesamtanzahl von etwa 15.000 Zellen abgeschlossen. Mit steigender Lebenserwartung unserer Gesellschaft steigt die Erwartung, die Haarzellen länger funktionsfähig zu erhalten. Die Frequenzselektivität während des Hörens ist abhängig von der Funktion einzelner Haarzellen und kann bereits bei Verlust weniger Haarzellen des auditorischen Sinnesepithels zu klinisch relevanten Beeinträchtigungen führen. Das Resultat ist eine chronische, sensorische Schwerhörigkeit, für die momentan keine kausalen Therapiemöglichkeiten verfügbar sind (WHO, 2015). Ziel der regenerativen Medizin ist es daher, durch Neubildung von Haarsinneszellen den irreversiblen Zellverlust zu kompensieren und damit das Hörvermögen wiederherzustellen. Eine der größten Herausforderungen liegt in der Zellbiologie begründet, in den verschiedenen physiologischen Phasen des Zellzyklus. Während die einen Zellen im Zellzyklus verbleiben und innerhalb der Proliferationsphase zur kontinuierlicher Zellteilung fähig sind, können andere Zellen den Zellzyklus reversibel verlassen. Diese befinden sich dann in der sogenannten Quieszenz, aus der sie durch geeignete Triggersignale wieder in den Zellzyklus eintreten

und die Teilungsfähigkeit wiedererlangen können. Haarsinneszellen von Säugetieren gelten nach ihrer Ausreifung, nach dem Verlassen des Zellzyklus als terminal differenziert und sind per definitionem irreversibel von weiterer Zellteilung ausgeschlossen (Lowenheim et al., 1999). Bei Fischen, Amphibien und Reptilien befinden sich die Haarzellen auch im adulten Alter in der Proliferationsphase (Corwin, 1981, Popper and Hoxter, 1984, Wilkins et al., 1999). Ein Verlust von Haarzellen induziert hier die Zellteilung benachbarter Stützzellen nach dem Haazellersatzmechanismus, bei dem aus einer Stützzelle jeweils eine Stütz- und eine neue Haarzelle entstehen (Balak et al., 1990, Corwin et al., 1991, Lopez-Schier and Hudspeth, 2006). Eine andere beobachtete Form des Haazellersatzmechanismus ist die direkte Konversion von Stützzellen zu Haarzellen ohne vorherige Zellteilung (Baird et al., 1996, Taylor and Forge, 2005). Anders verhält sich das Sinnesepithel von Vögeln, die sogenannte Papilla basilaris. Hierbei handelt es sich um Sinneszellen, die nach einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ihre letzte Zellteilung als terminale Mitose durchlaufen und anschließend teilungsunfähig in der Quieszenz verbleiben (Cotanche, 1987, Cruz et al., 1987, Smolders, 1999). Mit dem Signal des Haazellverlusts verhalten sich Stützzellen von Vögeln biologisch wie die Stützzellen der niederen Vertebraten und teilen sich asymmetrisch in jeweils eine Stütz- und Haarzelle. Fraglich ist, ob sich durch geeignete Stimuli eine ähnliche Reaktion der Stützzellen auch bei Säugetieren induzieren lässt. Tatsächlich konnte im Vestibularorgan des Säugers eine *in vitro* durch Haazellverlust induzierte Zellteilung von Stützzellen beobachtet werden. Es bleibt jedoch unklar, ob diesem Ereignis eine direkte Umdifferenzierung durch Zellkonversion oder eine proliferative Regeneration durch Zellteilung zugrunde liegt. Bezüglich sensorischer Innenohrschwerhörigkeit ist zu klären, wie ein Haazellverlust im Corti'schen Organ von Säugetieren zu kompensieren ist. Dazu gibt es vier unterschiedliche Strategien. (I) Erste Strategie: Nach der terminalen Mitose wird versucht, durch geeignete Faktoren in die Regulation des Zellzyklus von Stützzellen einzugreifen, um die unterdrückte Zellproliferation zu reaktivieren. Die Identifikation und der funktionelle Nachweis von potenziellen Zielmolekülen

setzen eine genaue Aufklärung der molekularen Regulation des Zellzyklus voraus und erfolgt ähnlich einem Screening-Verfahren nach dem „trial and error“-Prinzip. Dies war in Ansetzen bereits erfolgreich. So konnte beispielsweise die Hemmung des zyklinabhängigen Kinase-Inhibitors p27^{Kip1} zur Induktion von Zellteilung postnataler adulter Stützzellen der Maus beitragen (Lowenheim et al., 1999). (II) Grundlage der zweiten Strategie ist es, die Situation in der Vogelcochlea auf die Cochlea der Säugetiere zu übertragen, entsprechend einer direkten Konversion von Stützzellen in Haarzellen initiiert durch geeignete Triggersignale. Der „Basic-Helix-Loop-Helix“ (bHLH-) Transkriptionsfaktor Math1 (auch Atoh1) ist für die Bestimmung des Zellschicksals in Richtung Haarsinneszelle verantwortlich und scheint ein solches Triggersignal zu sein. In der frühen Entwicklung der Cochlea ist Math1 im prosensorischen Zellen exprimiert, die sich zu sensorischen Haarzellen entwickeln (Chen et al., 2002, Driver et al., 2013). Nach Differenzierung der Haarsinneszellen ist Math1 weiter für das Überleben und die funktionelle Ausreifung der Zellen notwendig (Cai et al., 2013, Chonko et al., 2013). Im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression von Math1 zur Konversion von Stützzellen zu Haarzellen beiträgt (Liu et al., 2012a, Oujii et al., 2013). Insgesamt konnte in embryonalen, neonatalen sowie postnatal jungen Tieren gezeigt werden, dass Math1 für die Haarzellendifferenzierung, das Überleben und die funktionelle Ausreifung innerhalb der Cochlea notwendig ist (Zheng and Gao, 2000, Gubbels et al., 2008, Kelly et al., 2012). Der regenerative Effekt in adulten Altersstadien ist bisher noch begrenzt, da die Expression von Math1 altersabhängig sinkt (Liu et al., 2012a, Stojanova et al., 2015). Ein Nachteil der direkten Konversion bleibt, dass die Regeneration von Haarzellen mit einem Verlust an Stützzellen einhergeht und damit eine funktionelle Einschränkung während des komplexen Transduktionsprozesses von akustischen Reizsignalen möglich ist. Unklar bleibt, wie sich die regenerierten Haarzellen funktionell ohne eigene Stützzellen verhalten und ob die fehlenden Stützzellen wiederum ersetzt oder regeneriert werden müssen. Dennoch ist es denkbar, dass durch Induktion von Proliferation und Differenzierung in Kombination mit anschließender

Reinnervation der regenerierten Haarzellen auch eine funktionelle Regeneration erreicht werden kann. (III) Die dritte Strategie zur möglichen Haarzellregeneration bildet die Stammzelltransplantation, bei der sich applizierte Stammzellen zu Haarzellen differenzieren. Dabei wird zwischen exogener und endogener Stammzelltransplantation unterschieden. Ersteres wurde bereits für fetale neuronale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, murine embryonale Stammzellen sowie für induzierte pluripotente Stammzellen aus Mesenchymzellen beschrieben (Oshima et al., 2010, Qin et al., 2011, Ouji et al., 2012, Lou et al., 2013, Zhao et al., 2013). Neben der ethischen Problematik stellt sich hier die Frage nach der adäquaten Ansiedlung der transplantierten Zellen, insbesondere da frequenzabhängiges Hören mit der streng tonotopen Anordnung der Haarzellen zusammenhängt und einen willkürlichen Haarzellersatz nicht erlaubt. Eine weitere, ethisch vertretbare Strategie ist die Aktivierung endogener Vorläuferzellen. Voraussetzung ist, dass multipotente, im Corti'schen Organ residente Progenitorzellen vorhanden sind und Faktoren zur Induktion des Stammzellcharakters evaluiert werden. Es ist bekannt, dass otische Stammzellen aus dem Corti'schen Organ der Maus isoliert und *in vitro* zu sogenannten Sphären expandiert werden können (White et al., 2006, Savary et al., 2007, Oshima et al., 2009, Waldhaus et al., 2012). Dabei sinkt die Stammzellartigkeit dieser Progenitorzellen und damit die Fähigkeit, *in vitro* Sphären und Haarzell-ähnliche Zellen zu bilden, von neonatalen zu adulten Altersstadien (White et al., 2006, Oshima et al., 2009). Vorteilhaft ist jedoch, dass der Stammzellcharakter auch *post mortem* bestehen bleibt und die Isolierung und Expansion endogener Progenitorzellen daher nicht nur für die Stammzelltransplantation *in vivo* von besonderer Bedeutung sind. Endogene otische Progenitorzellen sind dazu geeignet, ein *in vitro* Modell des Innenohres zu etablieren, da sie näher an der natürlichen Zellbiologie liegen und dabei den Gebrauch von transgenen Tieren oder embryonalen Stammzellen vermeiden.

1.2 Stützzellen als otische Progenitorzellen

Bei der Suche nach potenziellen otischen Progenitorzellen stellen die Stützzellen des Corti'schen Organs vielversprechende Kandidaten dar. Es werden zwei Mechanismen beschrieben, die einer Haarzellregeneration vorangehen können: Der Haarzellersatz durch vorherige, mitotische Zellteilung oder direkte Transdifferenzierung (Konversion) anderer Zellen zu Haarsinneszellen. Stützzellen sind bei beiden Mechanismen wesentlich involviert. Wie die Haarzellregeneration von Reptilien, Amphibien, Fischen und Vögeln zeigt, können sich proliferative Stützzellen bei Haarzellverlust mitotisch in jeweils eine Haar- und Stützzelle teilen (Corwin and Cotanche, 1988, Ryals and Rubel, 1988, Stone and Cotanche, 2007, Ma et al., 2008, Warchol, 2011). Auch andere Studien zeigten, dass Stützzellen die Progenitorzellen für proliferative (mitotische) Haarzellregeneration nach Haarzellverlust darstellen (Raphael, 1992, Stone and Cotanche, 1994, Warchol and Corwin, 1996, Matsui et al., 2000). Haarzellregeneration infolge direkter Umwandlung in Haarzellen ohne Zellteilung wurde ebenfalls für Stützzellen unterschiedlicher Spezies beschrieben (Staecker et al., 2007, Kelly et al., 2012). Da alle Zelltypen des Corti'schen Organs von Säugetieren biologisch als terminal differenziert gelten, ist die Regeneration von Haarzellen infolge von Zellproliferation erschwert. Dennoch scheinen perinatale Stützzellen aus Maus, Ratte und Meerschweinchen eine latente Fähigkeit zu besitzen, sich *in vitro* zu Haar- und Stützzellen zu differenzieren (Oshima and Heller, 2005, Zhai et al., 2005, White et al., 2006, Savary et al., 2007). Zellen außerhalb des Corti'schen Organs weisen ein vergleichsweise niedrigeres Differenzierungspotenzial zu Haarsinneszellen auf (Sinkkonen et al., 2011a).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

1.3.1 Oberflächenmarker zur Selektion distinkter Stützzellpopulationen

Das Corti'sche Organ ist organisiert in eine Reihe aus inneren Haarsinneszellen, drei Reihen aus äußeren Haarsinneszellen und verschiedene Stützzellen, die sie umgeben. Es gibt viele Hinweise, dass eine funktionelle Haarzellregeneration von den unmittelbar benachbarten Stützzellen ausgehen kann. Stützzellen gelten daher als potenzielle otische Progenitorzellen. Es besteht jedoch ein Bedarf, diesen Zelltyp genauer zu definieren. Mindestens fünf verschiedene Stützzelltypen sind entlang des Corti'schen Organs in verschiedenen Reihen organisiert. In Abbildung 8C ist ihre Anordnung vom inneren großen epithelialen Wulst (GER, greater epithelial ridge) zum äußeren kleinen epithelialen Wulst (LER, lower epithelial ridge) des Corti'schen Organs schematisch dargestellt: Grenzzellen, innere Phalangenzellen, Pillarzellen, Deiterszellen und Hensenzellen. Neben ihrer Lokalisation unterscheiden sich diese Stützzelltypen auch in ihrer Morphologie und Funktion. Es wird daher vermutet, dass auch das Expressionsmuster auf Molekular- wie auch auf Proteinebene je nach Stützzelltyp unterschiedlich ist (Sinkkonen et al., 2011a). Um distinkte Stützzellpopulationen zu definieren und zu untersuchen, sollten CD (Cluster of differentiation)-Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die zelltyp-spezifisch exprimiert werden. Das Expressionsmuster verschiedener CD-Moleküle im Innenohr wurde bereits mittels serieller Analyse der Genexpression (SAGE) im Hühnchen bestätigt (Sinkkonen et al., 2011b). Es konnte gezeigt werden, dass distinkte Stützzellpopulationen CD-Moleküle exprimieren, die bereits als bekannte Stammzell- und Progenitormarker von neuronalen und glialen Vorläuferzellen im Zentralnervensystem beschrieben wurden. Hier galten die CD-Moleküle p75^{NTR} (White et al., 2006, Sinkkonen et al., 2011a, Yuan et al., 2011) und GLAST (Chen et al., 2010, Dalet et al., 2012, Ahmed et al., 2013) als besonders vielversprechend, um auch Progenitorzellen von Haarsinneszellen des Corti'schen Organs zu detektieren. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster des Glutamat-Aspartat-Rezeptors (GLAST, EAAT1) und des p75-Neurotrophinrezeptors (p75^{NTR}, CD271) in

Stützzellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus untersucht werden. Stützzellen mit mehr Stammzell- bzw. Progenitorcharakter sollten immunhistochemisch von anderen Zellen des Ductus cochlearis abgegrenzt werden.

1.3.2 MACS zur Anreicherung distinkter Stützzellpopulationen

Aus der heterogenen Zellkultur des Corti'schen Organs der Maus sollten distinkte Stützzellsubpopulationen isoliert werden. Dazu eignete sich das Verfahren der Magnet-assoziierten Zellsortierung (Miltenyi et al., 1990). Nachdem das Expressionsmuster der zu isolierenden Zellen bestimmt ist, werden die Zellen mit einem Antikörper-Komplex markiert. Dieser besteht aus dem zelltyp-spezifischen Antikörper gegen das entsprechende CD-Oberflächenmolekül, einem fluoreszierenden Farbstoff zur durchflusszytometrischen Detektion der Zellen sowie aus einem Microbead-gekoppelten Antikörper. Microbeads sind magnetisierbare Mikropartikel aus Dextran und Eisenoxid und bilden die Grundlage der Magnet-assoziierten Zellsortierung. Microbead-gekoppelte Zellen werden unter Anwendung eines Starkmagneten aus einer Zellsuspension detektiert und in der porösen Wand einer Trennsäule zurückgehalten. Nicht markierte Zellen werden währenddessen separat aufgefangen. Durch anschließende Entfernung des Magneten werden die positiv Microbead-gekoppelten Zellen aus der MACS-Trennsäule gelöst, sodass eine isolierte Zellfraktion aus der primär eingesetzten Zellsuspension gewonnen wird. Beispiele zeigten, dass MACS zur Sortierung sensorischer Zellen geeignet war und zur Charakterisierung von Progenitorzellen anderer Zellreihen verwendet werden konnte. Retinale Zellen aus der Maus und des Menschen wurden mit MACS aufgereinigt und auf ihre Stammzeleigenschaften als Progenitorzellen von Photorezeptoren untersucht (Carter et al., 2009, Eberle et al., 2011, Eberle et al., 2014). Die Zellen des sensorischen Riechepithels der adulten Ratte konnten bereits mittels MACS (und FACS) nach Markierung mit anti-GLAST sortiert und zur Generierung von olfaktorischen Sphären verwendet werden (Ohnishi et al., 2013). Ebenso

ermöglichte MACS die Anreicherung von neuronalen Stammzellen aus Gliazellen des embryonalen Rückenmarks der Ratte (Cizkova et al., 2009).

In dieser Arbeit sollten die durch MACS isolierten distinkten Stützzellpopulationen des Corti'schen Organs der Maus *in vitro* kultiviert und in ihrem Proliferations- und Differenzierungspotenzial vergleichend untersucht werden. Ziel war die Identifikation einer Stammzellpopulation aus Stützzellen, die für ein effizientes *in vitro* Modell des Innenohres verwendet werden kann.

1.3.3 FACS zur Anreicherung distinkter Stützzellpopulationen

Die Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung (FACS) wurde 1968 entwickelt und stellt ein weiteres Verfahren zur Separierung von verschiedenen Zellpopulationen dar. Die zu isolierenden Zellen werden dabei spezifisch markiert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzpartikeln gekoppelt. Die vereinzelt und markierten Zellen werden als Primärsuspension in das FACS-Messgerät gegeben und passieren mit definierter Spannung, Geschwindigkeit und Druck den Mikrokanal einer Küvette, die sich im Bestrahlungsfeld eines Laserstrahls befindet. Da der Durchmesser des Mikrokanals etwa dem Durchmesser einer Zelle entspricht, erlaubt das FACS-Verfahren eine Analyse jeder einzelnen Zelle. Je nach Beschaffenheit der Zelle entsteht unterschiedliches Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) dient als Maß für die Beugung des Lichts und korreliert mit der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) gibt als Maß für die Lichtbrechung Aufschluss auf die Granularität und Struktur der Zelle. Mit diesen Parametern können bereits im Vorfeld Zelldebris und Zellaggregate erkannt und von der unmittelbar folgenden Zellsortierung ausgeschlossen werden. Im Sortierungsschritt wird anhand unterschiedlicher Laser und Filter das emittierte Fluoreszenzlicht gemessen, das je nach Markierung mit einem Fluorochrom von den Zellen ausgeht. Ähnlich fluoreszierende Zellen sind demnach mit dem gleichem Fluorochrom positiv markiert, werden mit Hilfe eines Luftstroms in das selbe Sortiergefäß gesammelt und gelten dann als vereinzelt reine Zellfraktion einer spezifischen Markierung. Im Unterschied zu der sequenziellen

Vorgehensweise bei MACS können mit dem FACS-Verfahren auf diese Weise mehrere Zellpopulationen simultan in einem Sortierungsschritt voneinander isoliert werden. In der klinischen Anwendung gehört FACS insbesondere in der Hämatologie, Infektiologie und Immunologie bereits zur Routinediagnostik. Auch in der zellbiologischen Grundlagenforschung gehört FACS zu den standardisierten Verfahren, um Zellen verschiedenster Zellreihen zu analysieren oder zu isolieren. In der Innenohrforschung konnte das FACS-Verfahren mit Verwendung von CD-Markern bereits zur Sortierung von Stützzellen des Corti'schen Organs der Maus (p3) verwendet werden (Sinkkonen et al., 2011a). In einem transgenen Mausmodell wurden Haarsinneszellen mittels FACS isoliert und anschließend auf ihre Genexpression hin untersucht (Scheffer et al., 2015). In anderen transgenen Tiermodellen konnten mit Stützzell-spezifischem Promotor Stützzellen aus dem Corti'schen Organ der neonatalen Maus isoliert und kultiviert werden (White et al., 2006, Chai et al., 2012, Shi et al., 2012).

In dieser Arbeit sollte das FACS-Verfahren neben der Etablierung des MACS-Sortierverfahrens dazu verwendet werden, spezifisch markierte Stützzellpopulationen des Corti'schen Organs der Maus zu identifizieren und von anderen Zellen der heterogenen Zellpopulation zu isolieren. Die Effizienz beider Sortierungsverfahren sollte im Anschluss vergleichend evaluiert und gegebenenfalls in das Protokoll der *in vitro* Kultur des postmortalen Corti'schen Organs der Maus integriert werden.

1.3.4 Otische Progenitorzellen zur Regeneration von Corti'schen Zellen

Es ist bekannt, dass adulte Säugetiere kein regeneratives Potenzial besitzen, um einen Verlust an Haarsinneszellen funktionell zu kompensieren. Bereits aus Tieren, die drei Wochen oder älter sind, ist eine Isolierung von cochleären Zellen mit proliferativen Stammzeleigenschaften bisher nicht möglich (White et al., 2006, Oshima et al., 2007). Im Verlauf der ersten postnatalen Wochen erfolgt eine Ausreifung des Corti'schen Organs, die mit einem Verlust otischer

Stammzellen einhergeht. Im früh postnatalen Altersstadium ist es dagegen gelungen, otische Stammzellen zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren (Diensthuber et al., 2009, Waldhaus et al., 2012). In Kultur teilen sich die Stammzellen und bilden klonale, frei-schwimmende Zellkolonien aus, die sogenannten Sphären (Oshima et al., 2009).

In dieser Arbeit sollten potenzielle Progenitorzellen des Corti'schen Organs der postnatalen Maus anhand spezifischer Expressionsmuster von CD-Oberflächenmolekülen identifiziert und durch geeignete Sortierungsverfahren isoliert werden. Isolierte distinkte Zellpopulationen des postnatalen Corti'schen Organs der Maus sollten gemäß des etablierten *in vitro* Sphärenbildungs-Assays (Waldhaus et al., 2012) kultiviert und mittels EdU-Zellteilungs-Assay auf ihre Sphärenbildungskapazität untersucht werden. Sphären, die aus isolierten distinkten Zellpopulationen des postnatalen Corti'schen Organs der Maus hervorgegangen sind, sollten anschließend nach dem etablierten *in vitro* Differenzierungs-Assays (Waldhaus et al., 2012) kultiviert und anhand geeigneter Markerexpression auf ihr Differenzierungspotenzial in Haarzell- und Stützzell-ähnliche Zellen untersucht werden.

Dies beinhaltet:

- a) Vergleichende Evaluation der Sphärenbildungskapazität. Hier galt es diejenige Stützzellpopulation zu identifizieren, die über ein erhöhtes Stammzellpotenzial verfügt und somit am besten dazu fähig ist, *in vitro* Sphären zu bilden.
- b) Vergleichende Evaluation des Differenzierungspotenzials in Haarzell-ähnliche Zellen. Neben einer Neubildung von Haarzell-ähnlichen Zellen aus Progenitorzellen ist die Quantifizierung der *in vitro* generierten Haarzellen als Ausgangspunkt für zukünftige Screening-Verfahren von Bedeutung. Diese würde die Basis eines *in vitro* Modells des Innenohres schaffen und eine standardisierte Beurteilung otoprotektiver und ototoxischer Effekte ermöglichen.
- c) Vergleichende Evaluation des Differenzierungspotenzials in Stützzell-ähnliche Zellen. Ziel ist hier, die Anzahl der *in vitro* generierten Stützzellen zu

optimieren. Diese stellen wie beschrieben potenzielle Progenitorzellen von Haarzellen da und können durch direkte Konversion oder durch mitotische Zellteilung in Haarzellen otoregenerativ eingesetzt werden.

1.3.5 Inhibition des Notch-Signalwegs als chemisches *in vitro* Stimulanz

Obwohl die klinische Relevanz einer erfolgreichen Haarzellregeneration *in vitro* für Screeningverfahren otoprotektiver und ototoxischer Substanzen und auch *in vivo* zur möglichen kausalen Therapie eines Haarzellverlusts hoch ist, sind die molekularen und genetischen Mechanismen der Stütz- und Haarzellentstehung noch nicht vollständig aufgeklärt. Aus Studien, die durch spezielle Verfahren (lineage tracing) die Herkunft von Zelllinien evaluiert haben, ist bekannt, dass Stütz- und Haarzellen aus jeweils eigenen Vorläuferzellen (Progenitorzellen) hervorgehen. Es stellt sich jedoch die Frage, wie diese Progenitorzellen entstehen und wie eine funktionelle Programmierung Richtung Stammzelle, Stütz- oder Haarsinneszelle induziert werden kann.

Teil aktueller Forschungsergebnisse ist diesbezüglich der sogenannte Notch-Signalweg, der an der Regulation von Zellschicksal, Zellproliferation und Zelltod während der embryonalen Entwicklung beteiligt ist (Bray, 2006, Gridley, 2007, de Celis, 2013). Initial wird der Notch-Signalweg durch eine Zell-Zell-Interaktion direkt benachbarter Zellen aktiviert, bei der zwischen einer Signal-sendenden und einer Signal-empfangenen Zelle unterschieden wird. Letztere trägt den namensgebenden Notch-Rezeptor, eine Familie (in Säugetieren: NOTCH1 bis NOTCH4) aus Transmembranproteinen, die aus einer Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne besteht. Bindet die Signal-sendende Zelle mit Zelloberflächenliganden der Jagged- (JAG1, JAG2) oder Delta-like- (DLL1, DLL3, DLL4) Familien an den Notch-Rezeptor der Signal-empfangenen Zelle, wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert: Das interzelluläre Signal leitet zunächst die zweifache proteolytische Spaltung des heterodimeren Notch-Rezeptors ein, zunächst vermittelt durch eine Metalloprotease der ADAM- oder TACE (TNF- α -converting enzyme, ADAM17) Familie (S2-Spaltung). Der zweite Schritt der Spaltung (S3-Spaltung) wird anschließend durch eine γ -Sekretase

katalysiert und führt zur Abspaltung der Notch-intrazellulären Domäne (NICD). Während der Komplex aus dem restlichen Bestandteil des Notch-Rezeptors zusammen mit dem Liganden extrazellulär verbleibt, liegt die NICD frei im Intrazellularraum vor und wird durch Translokation in den Nukleus der Zelle aufgenommen. Dort interagiert die NICD mit einem DNA-bindenden Protein-Komplex (CSL) und dessen Koaktivatoren MAML1 sowie einer Histon-Acetyltransferase (HAc) und führt schließlich zur Transkription der „Downstream“-gelegenen Notch-Gene. Ohne Aktivierung durch NICD bindet der CSL-Komplex an spezifische regulatorische DNA-Sequenzen, die eine Transkription der Notch-Gene blockiert. Zu den bekanntesten Transkriptionsfaktoren, die von Notch-Genen codiert werden, gehören die basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Folgende bHLH sind wichtige Mediatoren in der Entwicklung des Innenohres: Math1 (Atoh1 in der Maus), Sox2, Hes1, Hes5, Hey. Insgesamt ist der Notch-Signalweg während der Embryogenese bedeutend für die Entwicklung von allen Geweben und Organen. Er ist jedoch auch im adulten Organismus, insbesondere an der Zelldifferenzierung wesentlich beteiligt, unter anderem durch Hemmung des Proliferationsfaktor Math1 bzw. Atoh1 (Ahmed et al., 2012, Kelly et al., 2012, Liu et al., 2012a, Neves et al., 2012). Die Entwicklung der Cochlea wird durch den Notch-Signalweg auf unterschiedliche Weise beeinflusst: Der Mechanismus der lateralen Induktion ist für die Entwicklung prosensorischer Zellen von Bedeutung, während der Mechanismus der lateralen Inhibition bei der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt. Studien ergaben, dass der Notch-Ligand JAG1 vor und während der Entstehung des prosensorischen Organs exprimiert wird und fehlendes JAG1 zu einer Fehlbildung des prosensorischen Organs mit nur wenigen Haar- und Stützzellen führt (Kiernan et al., 2006). Die Inhibition des Notch-Signalwegs in Cochlea-Explantaten von Mäusen resultierte ebenfalls in eine prosensorische Entwicklungsstörung (Munnamalai et al., 2012). Der Mechanismus der lateralen Inhibition ist dagegen im Corti'schen Organ verantwortlich für die Bestimmung des Zellschicksals in Richtung Haarsinneszelle oder Stützzelle. Sich differenzierende Haarsinneszellen exprimieren Notch-Liganden, die den Notch-Signalweg in benachbarten Zellen

aktivieren und hier die Haarzellendifferenzierung verhindern. Beeinflusst von der lateralen Inhibition differenzieren benachbarte Zellen stattdessen zu Stützzellen und bilden dadurch das typische, morphologische Bild des Corti'schen Organs, dem Wechsel aus Haarsinnes- und Stützzellen aus. Entsprechend einer fehlenden lateralen Inhibition wurde in Mäusen ohne Expression der Notch-Liganden JAG1 und DLL1 oder des Notch-Rezeptors NOTCH1 eine erhöhte Anzahl an Haarsinneszellen mit einer reduzierten Anzahl benachbarter nicht-sensorischer Stützzellen beobachtet (Kiernan et al., 2005a). Neben der Entwicklung scheint der Notch-Signalweg auch in der Regeneration der Haarsinneszelle involviert zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von Notch-Genen nach einem Haarzellschaden in der Cochlea und im Utrikulus von Säugetieren ansteigt (Wang et al., 2010, Korrapati et al., 2013, Mizutari et al., 2013). Die Verwendung eines γ -Sekretase-Inhibitors zeigte in unbeschädigten und beschädigten Cochleae der neonatalen Maus, dass Stützzellen durch Inhibition des Notch-Signalwegs sich zu Haarsinneszellen transdifferenzieren können (Doetzlhofer et al., 2009, Korrapati et al., 2013, Mizutari et al., 2013, Bramhall et al., 2014, Li et al., 2015). Ein ähnliches Ansprechen auf die Inhibition des Notch-Signalwegs konnte in der adulten Cochlea der Maus nach Haarzellschädigung nicht beobachtet werden (Mizutari et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, durch geeignete Inhibition des Notch-Signalwegs mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L-685458 der Hemmung von Atoh1 entgegenzuwirken, um so die *in vitro* Haarzellregeneration zu stimulieren. Da die intrinsische Aktivität des Notch-Signalwegs bereits postnatal abnimmt und auch innerhalb des Corti'schen Organs einem baso-apikalen Gradienten folgt, sollte das Protokoll der *in vitro* Kultur dementsprechend angepasst werden (Zine et al., 2000, Mizutari et al., 2013). Dazu wurden *post partem* entnommene Corti'sche Organe der Maus jeweils vor Kultivierung mechanisch in eine apikale, mittlere und basale Windung separiert. Analog zur Kultivierung nach Zellsortierung sollten auch hier zur Ermittlung einer geeigneten Stammzellpopulation das *in vitro* Proliferations- und

Differenzierungspotenzial in Stütz- und Haarsinneszellen vergleichend evaluiert werden.

1.3.6 Ziele dieser Arbeit im Überblick

I) Immunhistochemische Charakterisierung der Markerexpression im Corti'schen Organ der postnatalen Maus

Zellpopulationen mit potenziell erhöhtem Stammzellpotenzial sollten durch spezifische CD-Oberflächenmolekülen (Cluster of differentiation) markiert und immunhistochemisch charakterisiert werden.

II) Etablierung von geeigneten Verfahren zur Zellsortierung

Spezifisch markierte Zellpopulationen sollten aus der heterogenen Primärkultur des postnatalen Corti'schen Organs der Maus mit einer möglichst hohen Effizienz isoliert werden. Hierfür war die Magnet- (MACS) und Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung (FACS) zu etablieren.

III) Bestimmung der Sphärenbildungskapazität der distinkten Zelltypen des Corti'schen Organs und Dokumentation des Stammzellcharakters der Sphären durch immunhistochemische Charakterisierung

MACS- und FACS-isolierte Zellpopulationen des postnatalen Corti'schen Organs der Maus sollten gemäß des etablierten *in vitro* Sphärenbildungs-Assays kultiviert und anschließend mittels EdU-Zellteilungs-Assay auf ihre Sphärenbildungskapazität untersucht werden. Qualitative Unterschiede in der Proteinexpression der aus definierten Zellpopulationen hervorgegangenen Sphären sollten durch immunhistochemische Studien mit geeigneten Stammzellmarkern aufgezeigt und vergleichend analysiert werden.

IV) Bestimmung des Differenzierungspotenzial der aus distinkten Zelltypen des Corti'schen Organs hervorgegangenen Sphären

Sphären, die aus isolierten distinkten Zellpopulationen des postnatalen Corti'schen Organs der Maus hervorgegangen sind, sollten gemäß des etablierten *in vitro* Differenzierungs-Assays kultiviert und immunhistochemisch auf ihr Differenzierungspotenzial in Haarzell- und Stützzell-ähnliche Zellen untersucht werden.

V) Untersuchung von Sphärenbildungskapazität und Differenzierungspotenzial Corti'scher Zellen unter chemischer Stimulation mit γ -Sekretase-Inhibitor L-685458

Die Inhibition des Notch-Signalwegs durch einen γ -Sekretase-Inhibitor sollte die Haarzelldifferenzierung während des *in vitro* Differenzierungs-Assays stimulieren. Das Differenzierungspotenzial in Haarzell- und Stützzell-ähnliche Zellen sollte immunhistochemisch untersucht und mit den vorherigen Kultivierungsansätzen vergleichend evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Für Organentnahme verwendete Tiere

Für die MACS- und FACS-Sortierungen sowie Ansätze mit Applikation des Notch-Signalweg-Inhibitors wurden neonatale (p0) und 3 bis 5 Tage alte (p3-5) hörunreife NMRI-Mäuse verwendet. Die Züchtung und Haltung der Tiere erfolgte in der Tierhaltung der Universität Tübingen gemäß den „Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die zu Versuchszwecken und anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden“ in der Fassung vom 18. Juni 2007, herausgegeben von der Kommission der Europäischen Gemeinschaften. Bei der Tötung der Tiere zur Organentnahme wurde nach § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313) vorgegangen, das zuletzt durch Artikel 20 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist. Für den Versuchszeitraum wurden die „Anzeigen von Eingriffen und Behandlungen an Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ vom 24.05.2012, 14.09.2012, 10.10.2012 und 08.02.2013 durch die Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Tübingen (Frau Dr. med. vet. S. Gerold und Herr Dr. med. vet. R. Scheurlen) geprüft und vom Regierungspräsidium genehmigt.

2.2 Explantation

Tiere in den Altersstadien p3-5 wurden für die immunhistologischen Analysen und die MACS- und FACS-Sortierungen verwendet. Ähnlich erfolgte die Explantation der p0 Tiere für die Versuchsprotokolle mit Applikation des Notch-Signalweg-Inhibitors. Versuchstiere bis zum Altersstadium p5 wurden am Genick gehalten und durch Dekapitation mit einer scharfen Präparationsschere getötet. Anschließend wurde der Schädel von kaudal bis zum Orbitalrand skalpiert. Nachfolgende Präparationsschritte am skalpierten Schädel, die chemische Fixierung zur Vorbereitung der immunhistochemischen Analysen

oder die Feinpräparation zur sterilen Gewebegewinnung für Zellsortierung und in vitro Kultur, werden in den Kapiteln 2.3. und 2.4. separat aufgeführt. Während aller Inkubationsschritte wurden die Explantate auf Eis gekühlt und die Gewebssimmersion der jeweiligen Inkubationsflüssigkeit durch Rotation auf einem Laborschüttler beschleunigt.

2.3 Immunhistochemische Identifizierung von Stützzellen

2.3.1 Feinpräparation und chemische Fixierung der Cochlea von Mäusen

Während aller Präparationsschritte diente Zellstoff als Unterlage, um bei den Präparationsschritten mit der Rasierklinge ein Verrutschen des Schädels zu vermeiden. Nach Skalpierung des Schädels wurde die rostrale Hälfte des Schädels kaudal der Orbitae in der Frontalebene mittels einer scharfen Rasierklinge (Wilkinson) abgetrennt. Der Schädel wurde nun auf die in der Frontalebene entstandene Schnittfläche aufgestellt. Die Schädelkalotte wurde nun von der Laterobasis durch einen Schnitt mittels der Rasierklinge senkrecht zur Standfläche getrennt. Mit der Eröffnung des Schädels konnten die Felsenbeine für die Fixierung freigelegt werden, indem das Gehirn vorsichtig mit Hilfe von zwei Pinzetten herausgelöst wurde. Mit der einen Pinzette wurde das Explantat fern von den Felsenbeinen an den Resten der Cellulae ethmoidales fixiert, mit der anderen Pinzette wurde das Gehirn vorsichtig seitlich vom Schädel gelöst und schließlich aus der Schädelhälfte geklappt. Zur Gewebefixierung wurden die Schädelhälften in einer 24-Well-Kulturplatte für 60 Minuten in 4 %-iger Paraformaldehydlösung (PFA 4 %, etwa 2 mL pro Well) bei +4 °C immersionsfixiert. Anschließend wurden die Explantate für 60 Minuten in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, etwa 2 mL pro Well) ebenfalls bei +4 °C inkubiert.

2.3.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Kryoprotektion wurden alle fixierten und ausgewaschenen Gewebeexplantate in 25 %-iger Saccharose (25 % Saccharose/1x PBS) überführt und bei +4 °C über Nacht inkubiert.

Für die Einbettung der Gewebeexplantate wurden Hohlzylinder aus Aluminiumfolie als Einbettform verwendet. Nachdem die Behältnisse mit Einbettmedium gefüllt wurden, wurden die Präparate entsprechend der gewünschten Schnittebene in dem Medium eingebettet. Unter einem Mikroskop (Zeiss Mikroskop Stemi 2000-C) wurden sie daher so platziert, dass die Längsachse des cochleären Modiolus und die anatomische Augenachse (zwischen vorderem und hinterem Pol des Augenbulbus) möglichst parallel zum Boden der Form ausgerichtet sind. Die eingebetteten Präparate wurden bei -80 °C tiefgefroren und bis zur Anfertigung der Kryoschnitte bei gleicher Temperatur gelagert.

Nach Entfernung der Aluminiumform von dem gefrorenen Gewebeblock wurde dieser mit etwas Einbettmedium auf dem Objekthalter des Kryostats befestigt. Die Basis des Gewebeblocks wurde dabei parallel zum Objekthalter orientiert und als erstes angeschnitten. Die Cochlea wurde so im Gewebeblock platziert, dass ihre Längsachse parallel zur Schnittfläche ausgerichtet und daher radiäre Schnitte vom Ductus cochlearis (Schneckengang) möglich waren. Bei einer Kryostat-Kammertemperatur von -23 °C und einer Objekttemperatur von -28 °C wurden mit einem Schneidekeil serielle Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgenommen. Die aufgenommenen Kryoschnitte wurden bei Raumtemperatur für etwa 60 Minuten getrocknet und entweder umgehend für die immunhistochemische Markierung verwendet oder bis zur Markierung bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Immunhistochemische Markierung der Oberflächenmarker GLAST und p75^{NTR} an Kryoschnitten der murinen Cochlea

Die bei -80 °C gelagerten Objektträger wurden vor Beginn der immunhistochemischen Markierung bei Raumtemperatur etwa 30 Minuten aufgetaut. Mit einem Fettstift wurden die Gefrierschnitte anschließend umrandet, um die pipettierten Lösungen während der Inkubation in einem definierten Bereich zu halten. Die benötigten Volumina an Denaturierungspuffer (DP), Blockadepuffer (BP), Reaktionspuffer (RP) sowie 1x PBS (Protokoll zur Herstellung im Kapitel 8.1) wurden direkt vor Beginn angesetzt und je nach Umfang der Markierung in 1,5 mL-, 2,0 mL- (Eppendorf Cups) oder in 15 mL-Reaktionsgefäße (Polystyrene Conical Tube, Falcon) pipettiert. Primärantikörper, Sekundärantikörper sowie das 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Reagenz (DAPI) wurden mindestens 10 Minuten unter lichtgeschützten Bedingungen aufgetaut und auf die jeweilige Konzentration mit RP oder 1xPBS verdünnt. Die Reaktionsgefäße glichen hierbei denen der Pufferlösungen. Alle zur immunhistochemischen Markierung benötigten Lösungen wurden vor Gebrauch via Vortex-Gerät durchmischt und anschließend für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Je Objektträger wurden 90-100 µL der entsprechenden Lösung auf die Gefrierschnitte pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass der gesamte Kolbenhub der Pipette nicht zu schnell ausgenutzt wurde, um die Schnitte mechanisch nicht zu beschädigen. Um einer Verdunstung vorzubeugen und die Menge der Lösungen auf den Objektträgern möglichst konstant zu halten, wurden alle Inkubationsschritte in einer lichtgeschützten Inkubationskammer durchgeführt. Diese war mit feuchtem Zellstoff ausgelegt, um Luftfeuchtigkeit möglichst gesättigt zu halten. Je nach Antikörper konnten verschiedene Protokolle mit oder ohne Citrat-Puffer-Vorbehandlung beziehungsweise Denaturierungspuffer (DP, 1 % Sodium-Dodecylsulfat (SDS) in 1x PBS) etabliert werden. Die Vorerhitzung des Citrat-Puffers erfolgte für etwa 2 Minuten in einer herkömmlichen Mikrowelle bei etwa 800 Watt bis der Siedepunkt erreicht war. Zur Inkubation im erhitzten Citrat-Puffer wurden die Objektträger in hitzebeständigen Objektträgerhalter platziert und innerhalb eines Dampfgargeräts auf einer Temperatur von 100 °C

gehalten. Die einzelnen Protokolle für die immunhistochemische Markierung von Kryoschnitten sind im Kapitel 8.2.1 aufgeführt.

2.4 MACS zur Gewinnung von distinkten Stützzellpopulationen

2.4.1 Feinpräparation des postnatalen Corti'schen Organs der Maus

Die Explantation der p3-5 alten Mäuse erfolgte zunächst wie im Kapitel 2.2 beschrieben. Alle folgenden Präparationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Beginnend am Foramen magnum wurden die beiden skalpierten Schädelhälften durch zwei mediasagittale Schnitte bis zum Bregma voneinander getrennt. Der erste Schnitt apikal des Foramen magnums erfolgte von okzipital nach rostral orientierend an der Sutura sagittalis, während mit dem zweiten die Schädelbasis kaudal des Foramen magnums durchtrennt wurde. Im Anschluss wurden die beiden Schädelhälften mit den jeweiligen Felsenbeinen durch zwei Frontalschnitte zwischen Orbita und äußeren Gehörgang herausgelöst. Die Gehirnhälften wurden beginnend an der Schädelkalotte entfernt. Die folgende Feinpräparation erfolgte unter einem Stereomikroskop (Zeiss Mikroskop Stemi 2000-C) in einer Petrischale mit auf +4 °C gekühlter HEPES-gepufferten Hank's Salzlösung (HHBSS, HEPES-buffered Hank's balanced salt solution), welches auch zur Zwischenlagerung der Schädelhälften auf Eis diente. Unter Vermeidung einer mechanischen Traumatisierung der Cochlea wurden Gehirnrreste, Tentorium und Sinus sigmoideus entfernt, um die Sicht auf die knöchernen Cochlea zu ermöglichen. Diese wurde längst eröffnet und vorsichtig von dem Ductus cochlearis präpariert, ohne diesen zu beschädigen. Besonders der apikale Abschnitt des Ductus musste vollständig von der knöchernen Hülle gelöst werden, um einen Abriss des Ductus an dieser Stelle zu vermeiden. Der freigelegte Ductus wurde anschließend an der Basis aus der knöchernen Cochlea entnommen. Anliegende Strukturen wie der Modiolus mit dem Spiralganglion (Abb. 1A, MS) mussten entfernt werden. Der äußere Sulcus ist besonders dünn und imponierte entlang des Ductus als Aufhellung zwischen

Corti'schem Organ und Stria vascularis. An dieser Sollbruchstelle war es möglich, die laterale Wand bzw. das Spiralligament (Abb. 1A, SL) inklusive der Stria vascularis vom Corti'schen Organ (Abb. 1A, OC) zu trennen. Die Corti'schen Organe wurden anschließend in einer kleinen Petrischale mit Eisgekühlter HHBSS gesammelt und bis zur chemisch-mechanischen Dissoziation zwischengelagert. Die fotografische Aufnahme von präpariertem Spiralligament, Corti'schem Organ und Modiolus wurde am Präparationsmikroskop mit einer Kamera (Samsung Galaxy Note N7000) aufgenommen (Abb. 1A).

2.4.2 Gewinnung einer Einzelzellsuspension

Um in verschiedenen Sortierungsverfahren distinkte Stützzellen durch CD-Markierung identifizieren und isolieren zu können, mussten die immaturren Corti'schen Organe zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert werden. Zur chemischen Dissoziation wurden jeweils 10 Corti'sche Organe in einer kleinen Petrischale mit 50 μ L 0.125 % Trypsin/PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) gesammelt und bei +37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Enzymaktivität des Trypsins mit Zugabe von 50 μ L Blockadelösung gestoppt. Dieses bestand aus 20 mg/mL Trypsin-Inhibitor (gewonnen aus Sojabohnen, Serva, Heidelberg, Germany) und 2 mg/ml DNase I Lösung (Worthington, Lakewood, NJ, USA), gelöst in DMEM/ F12 Medium. Die mechanische Dissoziation der Corti'schen Organe erfolgte anschließend mittels 100 μ L Pipette, mit der die Zellsuspension unter Vermeidung von Luftbläschen (Pipette eingestellt auf etwa 80-90 μ L) 80 Mal titriert wurde. Nach Zugabe von 1 mL Proliferationsmedium wurden die Basilmembranen mit Hilfe eines feinen Präparationsdrahtes unter dem Stereomikroskop (Zeiss Mikroskop Stemi 2000-C) entfernt. Die Zellsuspensionen aus allen dissoziierten Corti'schen Organen wurden gesammelt und bei +4 °C zwischengelagert. Die Zusammensetzung des Proliferationsmediums ist in Kapitel 8.1 aufgeführt.

Das hier beschriebene Verfahren zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension Corti'scher Organe diente nicht nur den Verfahren der Zellsortierung mit MACS und FACS, sondern auch bei den Versuchsansätzen mit chemischer Notch-Signalweg-Inhibition als zelluläres Ausgangsmaterial. Die lichtmikroskopische Aufnahme der Einzelzellsuspension wurde am inversen Mikroskop (Axiovert 100 M) mit einer verbundenen Kamera aufgenommen (Abb. 1B).

Um die Zellkonzentration zu ermitteln, wurde die Neubauerkammer mit 10 μ L der gut durchmischten Zellsuspension beschickt. Unter dem inversen Mikroskop (Axiovert 25) wurde die Zellzahl in den vier Quadranten der Neubauerkammer durch Auszählung bestimmt (Abb. 1B). Die Zellkonzentration wurde anschließend wie folgt errechnet:

Durchschnittliche Zellzahl eines Quadranten * 10^4 = Zellzahl / mL

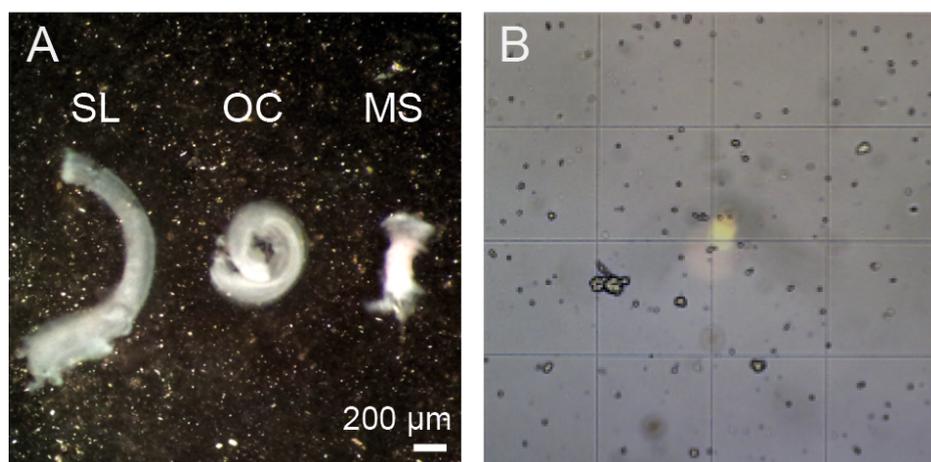


Abbildung 1: Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus dem Corti'schen Organ der Maus als zelluläres Ausgangsmaterial. (A) Photographische Aufnahme des Spiralligaments (SL), Corti'schen Organs (OC) und des Modiolus mit Spiralganglion (MS) nach mikropräparatorischer Dissektion und (B) lichtmikroskopische Aufnahme der Einzelzellsuspension Corti'scher Zellen nach chemisch-mechanischer Dissoziation. ((A) Maßstabsbalken = 200 μ m, (B) Maßstabsbalken = 100 μ m).

2.4.3 Abgrenzung einer geeigneten Einzelzellpopulation

Um die Einzelzellsuspension des immaturren Corti'schen Organs der Maus für durchflusszytometrische Untersuchungen und Sortierungen von Stützzellen nutzen zu können, wurden die dissoziierten Zellen zu Beginn auf ihre Fraktionierbarkeit, Viabilität und auf ihre Eignung zur Auftrennung einzelner Zellen mit durchflusszytometrischen Analysen geprüft. Zudem mussten die bei der Sortierung verwendeten Antikörper auf ihre spezifische Bindung an vereinzelter Zellen sichergestellt werden. Hierzu wurden Cochleae postnataler Mäuse dissoziiert und als Einzelzellsuspension in FACS-Röhrchen mit Kulturmedium zum FACS-Gerät (BD FACSAria III Cell Sorter, BD Bioscience) in die FACS-Facility der Hautklinik der Universitätsklinik Tübingen transportiert und in den Röhrchenhalter der Proben-Injektionskammer des FACS-Geräts platziert. Die Zellzählung erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion. Das Ergebnis der Fluoreszenzmessung wurde jeweils in einem Punktwolken-Diagramm (Dot Plot) dargestellt.

Jeder Fluoreszenzanalyse geht eine Zellanalyse der Gesamtprobe voraus, um Zellfragmente wie auch Zellaggregate aus der digitalen Auswertung auszuschließen. Wenn ein Zählereignis (Abb. 2A, Z) von einem fokussierten Laserstrahl (Abb. 2A, L) erfasst wird, sendet es Streulicht in alle Richtungen aus. Streulicht, das axial zum Laserstrahl entsteht (Lichtbeugung), wird als Vorwärtsstreulicht (Abb. 2A, FSC, Forward Scatter) bezeichnet. Die relative Größe des Vorwärtsstreulichts korreliert positiv mit dem Volumen einer Zelle bzw. eines Zellfragments und ist in Abbildung 2B als FSC-A (Forward Scatter Area) auf der Abszissenachse des Punktwolken-Diagramms aufgetragen. Licht, das durch ein Zählereignis in perpendikulärer Richtung zum Laserstrahl gestreut wird (Lichtbrechung und Reflexion, gemessen in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht), ist in Abbildung 2A als Seitwärtsstreulicht gekennzeichnet (Abb. 2A, SSC, Side Scatter). In der Zellanalyse ist das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Komplexität bzw. Granularität einer Zelle oder Zellpartikel und ist im Punktwolken-Diagramm als SSC-A auf der Ordinatenachse aufgetragen (Abb. 2B, SSC-A, Side Scatter Area, relative

Größe). Mit der kombinierten Betrachtung von FSC und SSC lässt sich jedes Zählereignisses (Abb. 2B, Pfeil) bezüglich seiner Zelleigenschaften charakterisieren. Zählereignisse, die sehr hohe FSC- und SSC-Werte erreichen, gelten als Zellaggregate (Abb. 2B, **), während Zellfragmente im unteren Wertebereich erfasst werden (Abb. 2B, *). Zellaggregate, wie auch Zellfragmente können von den folgenden Fluoreszenzanalysen ausgeschlossen werden, indem die vereinzelt, vitalen Zellen manuell für die Analyse als Gate P1 definiert werden (Abb. 2B, P1). Eine solche Zellanalyse ist in Abbildung 2A beispielhaft dargestellt. Sie zeigt eine typische Zellpopulation nach digitaler Auswertung, mit der Größenordnung von insgesamt etwa 5.000 bis 10.000 Zellen.

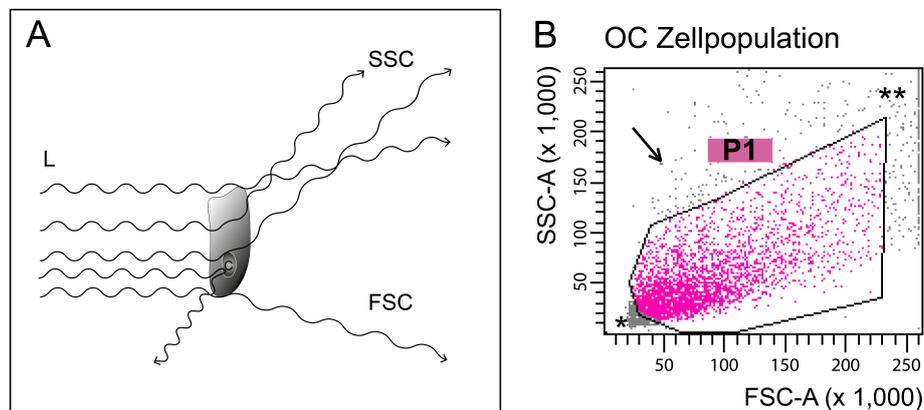


Abbildung 2: Analyse einer heterogenen, primären Einzelzellsuspension zur Abgrenzung einer geeigneten Zellpopulation P1 für FACS-Zellsortierungen und durchflusszytometrische Untersuchungen nach MACS-Zellsortierung. (A) Schematische Darstellung von eintreffendem Laserlicht (L), das an einer Zelle (Z) axial zu Vorwärtsstreulicht (FSC) und perpendicular zu Seitwärtsstreulicht (SSC) gestreut wird. **(B)** Digitale Darstellung aller Zählereignisse (Pfeil) einer durchflusszytometrischen Zellanalyse von Zellen des Corti'schen Organs der Maus, in der anhand von Vorwärtsstreulicht (FSC-A) und Seitwärtsstreulicht (SSC-A) eine geeignete Zellpopulation (P1) in Abgrenzung von Zellaggregaten (**) sowie Zellfragmenten (*) definiert wird.

Durch eine Zellanalyse mittels Seitwärtsstreulicht und Vorwärtsstreulicht kann vor jeder FACS-Zellsortierung bzw. durchflusszytometrischen Untersuchung nach MACS-Zellsortierung eine geeignete, optimal dissoziierte Zellpopulation (Abb. 2B, Gate P1) mit Ausschluss von Zellfragmenten und Zellaggregaten definiert werden.

2.4.4 Untersuchung von Autofluoreszenz und Antikörperbindung

Nach Definition der geeigneten Zellpopulation P1 wurden die Zellen anhand ihrer FITC- und PE-Fluoreszenz (Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE)) analysiert. Die verwendeten Fluorochrome FITC und PE werden dabei mit blauem Licht (488 nm) eines Octagon-Lasers angeregt. Nach Absorption des blauen Laserlichts emittiert das FITC-Fluorochrom grünes Licht im Wellenbereich von 530 nm (Abb. 3A, grün), während emittiertes Licht des PE-Fluorochroms im Wellenbereich von 575 nm (Abb. 3A, rot) detektiert wird. Das Emissionsspektrum beider Fluorochrome ist in Abbildung 3A graphisch dargestellt. Die spektrale Überlappung der beiden Fluorochrome (Abb. 3A, schraffierte Fläche) durch digitale Kompensation ausgeglichen (30 % für PE-FITC, 0,7 % für FITC-PE).

Neben der Überschneidung der Fluoreszenzspektren bestand die Gefahr, dass das Fluoreszenzsignal der Fluorochrome FITC und PE durch eine zu hohe zelluläre Autofluoreszenz in den Wellenlängenbereiche 530 nm und 575 nm überlagert werden könnte. Um dies auszuschließen, wurde eine unsortierte Zellsuspension aus dissoziierten Zellen des Corti'schen Organs der Maus im Altersstadium p3-5 ohne Antikörpermarkierung mittels Durchflusszytometrie auf ihre FITC- und PE-Fluoreszenz hin untersucht. Wie im Punktwolken-Diagramm der Abbildung 3B dargestellt zeigte sich bei Benutzung des Fluoreszenzfilters 530/30 zur Ermittlung der FITC-Fluoreszenz (Abb. 3B, Abszissenachse), dass für $0,2 \pm 0,1$ % ($n=2$) der unmarkierten Zellen des Corti'schen Organs ein positives FITC-Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (Abb. 3B, grün, Q4). Simultan dazu wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfilters 575/26 ein positives PE-Fluoreszenzsignal (Abb. 3B, Ordinatenachse) für $0,6 \pm 0,4$ % ($n=2$) der unmarkierten Zellen ermittelt (Abb. 4B, Q1). Der untere linke Quadrant des Diagramms (Abb. 4B, Q3) zeigt mit $99,2 \pm 0,5$ % ($n=2$) den Anteil FITC- und PE-negativer Zellen an. Der Anteil FITC- und PE-positiver Zellen lag bei $0,1 \pm 0,01$ % ($n=2$). Eine hohe Autofluoreszenz unmarkierter Zellen des Corti'schen Organs konnte so ausgeschlossen werden.

Zellen besitzen freistehende Proteinbrücken, die mit den eingesetzten Antikörpern interagieren und eine spezifische Antikörper-Fluoreszenz suggerieren können. Es musste daher eine unspezifische Antikörperbindung an zelluläre Proteine von einer spezifischen Antikörperbindung unterschieden werden. Dazu wurden dissoziierte Zellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus mit IgG2a-Antikörper (der Maus) inkubiert. Diese IgG-Antikörper entsprachen in ihrem Aufbau (Art der schweren und leichten Ketten) wie auch in ihrem Proteingehalt den Primärantikörpern anti-p75^{NTR} und anti-GLAST, die im Folgenden für die Zellsortierung von murinen Stützzellen verwendet werden sollen. Diese Kontrolluntersuchung wird daher als Isotypkontrolle bezeichnet. Da die IgG2a-Antikörper jeweils mit den Fluorochromen FITC und PE gekoppelt waren, wurde die Antikörper Bindung durchflusszytometrisch anhand der FITC- und PE-Fluoreszenz evaluiert. Aus dem Punktwolkendiagramm in Abbildung 3C geht hervor, dass nach Markierung unsortierter Zellen des Corti'schen Organs mit IgG2a-FITC in $0,3 \pm 0,2$ % ($n=2$) der Zellen ein positives FITC-Fluoreszenzsignal detektiert wurde (Abb. 3C, Q4). Der Anteil PE-positiver Zellen (Abb. 3C, Q1) von $0,4 \pm 0,3$ % ($n=2$) sowie der Anteil FITC- und PE-negativer Zellen von $99,2 \pm 0,5$ % ($n=2$) (Abb. 3C, Q3) unterschied sich nicht von der oben beschriebenen Kontrollmessung zum Ausschluss der Autofluoreszenz. Das Ergebnis der Isotypkontrolle mit IgG2a-PE ist in Abbildung 3D in einem weiteren Punktwolken-Diagramm aufgetragen. Die Messung ergab für $0,4 \pm 0,2$ % ($n=2$) der Zellen ein positives PE-Fluoreszenzsignal (Abb. 3D, Q1). Auch der Anteil FITC-positiver Zellen (Abb. 3D, Q4) bei $0,1 \pm 0,004$ % ($n=2$) und der Anteil FITC- und PE-negativer Zellen (Abb. 3D, Q3) mit $98,9 \pm 0,5$ % ($n=2$) waren mit den Ergebnissen vorheriger Kontrolluntersuchungen vereinbar.

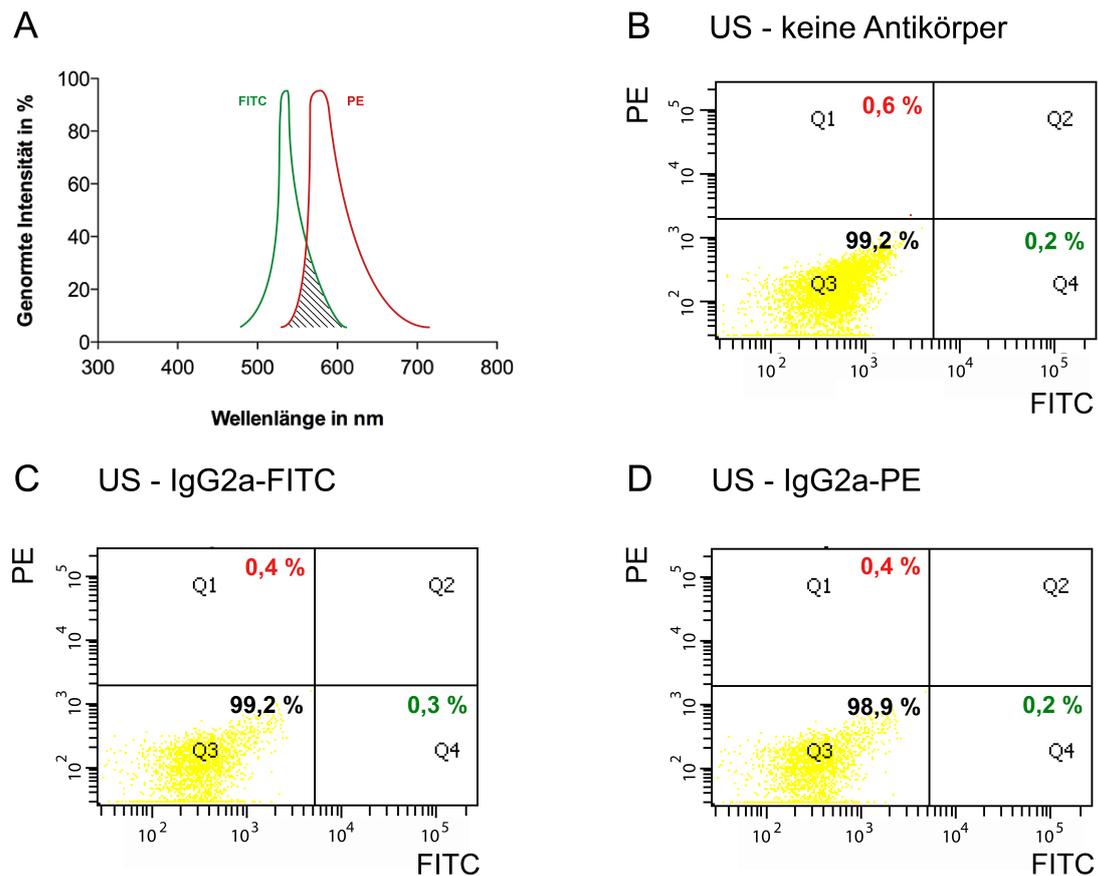


Abbildung 3: Analyse einer heterogenen, primären Einzelzellsuspension zum Ausschluss zellulärer Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörperbindung vor Zellsortierung. (A) Graphische Darstellung des Expressionsspektrums der Fluorochrome FITC (grün) und PE (rot). (B) Durchflusszytometrische Analyse der Negativkontrolle ohne Antikörper, (C) der Isotypkontrolle mit IgG2a-FITC und (D) der Isotypkontrolle mit IgG2a-PE in Abhängigkeit von der FITC- und PE-Fluoreszenzintensität, jeweils dargestellt in einem Punktwolken-Diagramm.

Durchflusszytometrische Kontrollmessungen der unsortierten und unmarkierten Zellprobe sowie Isotypkontrollen mit IgG2a-FITC und IgG2a-PE zeigten, dass eine unspezifische Zellbindung an die Antikörper anti-p75^{NTR} und anti-GLAST vernachlässigbar gering war. Beide Antikörper sind daher geeignet, um in nachfolgenden Zellsortierungen mit den Verfahren MACS und FACS als Marker von distinkten Stützzellpopulationen verwendet zu werden. Die detaillierten Versuchsprotokolle zu den Kontrolluntersuchungen finden sich in Kapitel 8.2.2.

2.4.5 Unsortierte markierte Zellen zur Effizienzkontrolle

Als weiteren Schritt vor Durchführung der Zellsortierungen mussten Richtwerte ermittelt werden, an denen die Effizienz der Zellsortierung gemessen werden konnte. Hierzu wurde die Einzelzellsuspension der immaturren Corti'schen Organe der Maus (p3-5) mit einem FcR-Blockade Reagenz behandelt und als Einzelzellsuspension aus etwa 20.000 Zellen mit dem Antikörpern anti-p75^{NTR} (aus Hase) markiert. Als zweiter Inkubationsschritt wurde der Primärantikörper mit dem Sekundärantikörper anti-IgG des Hasen (aus Esel), der bereits mit dem Fluorochrom FITC gekoppelt war, verbunden. Der daraus resultierende fluoreszierende Antikörper Komplex anti-p75^{NTR}-IgG-FITC konnte nun zur durchflusszytometrischen Detektion von p75^{NTR}-exprimierenden Zellen genutzt werden. Das methodische Vorgehen ist in Abbildung 4A schematisch dargestellt und mit ⊖ gekennzeichnet. An den unsortierten anti-p75^{NTR}-IgG-FITC-markierten Kontrollzellen (Abb. 4B, US_p75^{NTR}-FITC) wurde durchflusszytometrisch mit dem FACS-Gerät der FACS-Facility der Hautklinik der Universitätsklinikum Tübingen eine Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4B als Punktwolkendiagramm in Abhängigkeit von der FITC- (Abb. 4B, Abszissenachse) und PE-Fluoreszenzintensität (Abb. 4B, Ordinatenachse) aufgetragen. Es zeigte sich, dass ein Zellanteil von $4,5 \pm 0,5$ % (n=2) der unsortierten anti-p75^{NTR}-IgG-FITC-markierten Kontrollzellen ein positives FITC-Fluoreszenzsignal aufwies (Abb. 4B, Q4) und damit den Anteil p75^{NTR}-positiver (+) Zellen in der Primärkultur darstellte. Der Anteil PE⁺ Zellen (Abb. 4B, Q1) lag bei $0,7 \pm 0,5$ % (n=2), der Anteil FITC- und PE-negativer (-) Zellen (Abb. 4B, Q3) bei $94,4 \pm 1,1$ % (n=2).

Um den Anteil GLAST-exprimierender Zellen aus unsortierten Zellen Corti'scher Organe der Maus (p3-5, Kontrollzellen) zu ermitteln wurde ähnlich vorgegangen. Eine Suspension aus etwa 20.000 Kontrollzellen wurde mit dem Antikörper anti-GLAST-PE (aus Maus) markiert. Anders als oben aufgeführt, ist hierbei keine zusätzliche Inkubation mit einem IgG-Antikörper notwendig, da der Primärantikörper anti-GLAST bereits mit fluoreszierendem Phycoerythrin (PE) versehen war. Das methodische Vorgehen ist in Abbildung 4A

schematisch dargestellt und mit \oplus gekennzeichnet. Anhand des PE-Fluoreszenzsignals konnte der Anteil GLAST⁺ Zellen (Abb. 4C, Q1) in der Primärkultur mit $19,3 \pm 3,0$ % (n=2) durchflusszytometrisch ermittelt werden. Das Ergebnis der Fluoreszenzanalyse ist in Abbildung 4C in einem separaten Punktwolkendiagramm in Abhängigkeit von der FITC- (Abb. 4C, Abszissenachse) und PE-Fluoreszenzintensität (Abb. 4C, Ordinatenachse) aufgezeichnet. Der Anteil FITC⁺ Zellen (Abb. 4C, Q4) lag bei $0,2 \pm 0,2$ % (n=2), während der Anteil FITC- und PE-negativer Zellen (Abb. 4C, Q3) bei $80,3 \pm 2,9$ % (n=2) detektiert werden konnte. Die Anteile FITC- und PE doppelt-positiver Zellen wurden hierbei vernachlässigt, da MACS keine Sortierung doppelt-positiver Zellen ermöglicht und diese Zellfraktion auch nicht nach FACS in Kultur gebracht wurde.

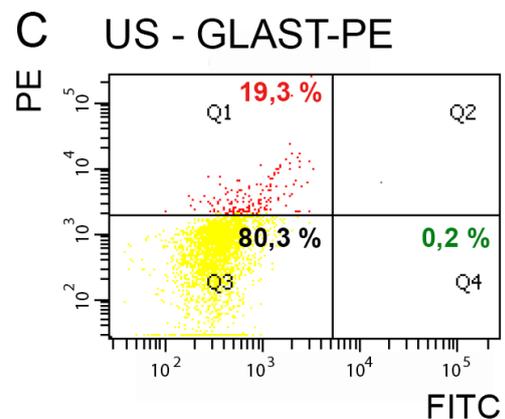
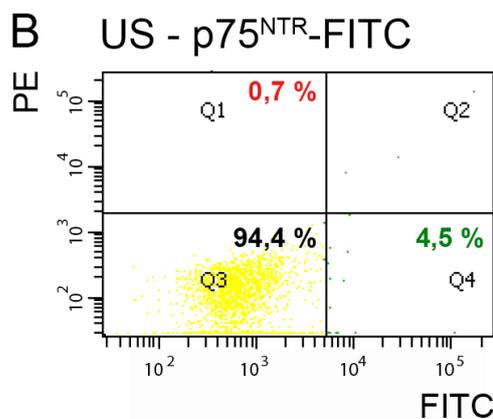
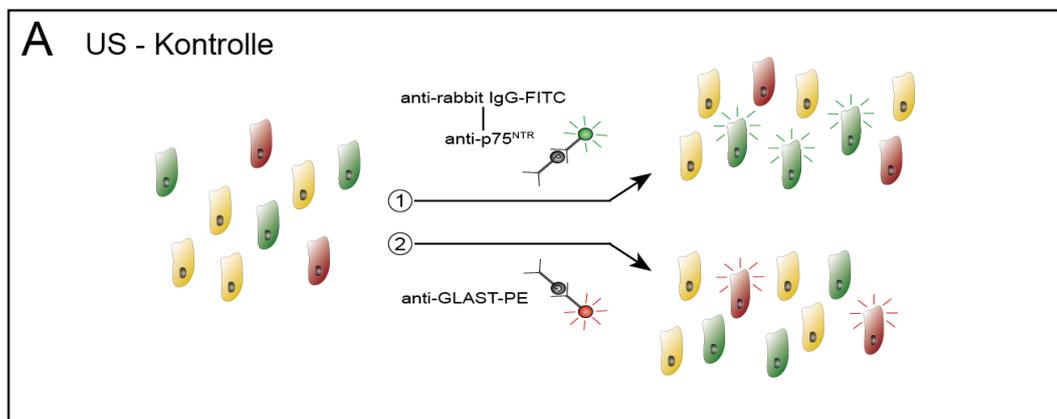


Abbildung 4: Immunhistochemische Analyse einer heterogenen, primären Einzelzellsuspension aus Corti'schen Zellen der Maus als Ausgangspunkt für Effizienzprüfungen der Zellsortierung mittels MACS oder FACS. (A) Schematische dargestellte immunhistochemische Markierung unsortierter Zellen (US, Kontrolle) des Corti'schen Organs der Maus (p3-5) mit anti-p75^{NTR}-IgG-FITC (⊖) oder anti-GLAST-PE (⊕). (B) Durchflusszytometrische Analyse der unsortierten Einzelzellsuspension, markiert mit anti-p75^{NTR}-FITC und (C) anti-GLAST-PE, aufgetragen in einem Punktwolkendiagramm mit Aufteilung in die vier Quadranten Q1-Q4, die unterschiedliche Intensitäten der FITC-Fluoreszenz (Abszissenachse) und PE-Fluoreszenz (Ordinatenachse) eingrenzen. Dabei wurde Q1 als PE-positiv (rot), Q4 als FITC-positiv (grün) und Q3 als FITC/PE-negativ (gelb) definiert. Q2 wurde bei der Analyse nicht beachtet.

Anhand durchflusszytometrischer Analysen von anti-p75^{NTR} und anti-GLAST markierten, unsortierten Zellen des Corti'schen Organs der immaturren Maus wurden die Anteile positiv-markierte Zellen in der Primärkultur bestimmt. Diese wurden als Referenz genommen, um die Effizienz der nachfolgenden Zellsortierungen zu beurteilen. Die detaillierten Versuchsprotokolle zu den Kontrolluntersuchungen finden sich in Kapitel 8.2.2.

2.4.6 Markierung und Durchführung von MACS

Markierung mit anti-p75^{NTR}, Donkey-anti-rabbit-FITC und anti-FITC-Microbeads

Da die Magnet-assoziierte Zellsortierung nur eine Auftrennung in zwei Zellfraktionen pro Zeit erlaubt, musste die Aufreinigung einer gemischten Zellsuspension in drei Zellpopulationen sequenziell erfolgen. Zunächst erfolgte die MACS-Sortierung der Einzelzellsuspension aus Corti'schen Zellen der Maus (p3-5) mit dem Stützzellmarker p75^{NTR}. Die Zellsuspension wurde in einem 15 mL Falcon Zellröhrchen (15 mL Polystyrene Conical Tube, BD Falcon) bei +4 °C und 300 rpm zentrifugiert (Multifuge 3 L-R, Haereus). Nachdem der Mediumüberstand mit Pipetten (Größe 1000 µL und anschließend 100 µL) vorsichtig entfernt wurde, erfolgte die Resuspension des Zellpellets in MACS-Puffer (autoMACSTM Rinsing Solution, Miltenyi Biotec). Um unspezifische Antikörperbindungen an FC-Rezeptoren der Zellen zu vermeiden, wurde die Zellsuspension bei 4 °C zunächst mit einem FcR-Blockadereagenz (FcR blocking reagent, mouse, Miltenyi Biotec) mit einer Verdünnung von 1:10

(verdünnt mit MACS-Puffer) für 10 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss mit Hilfe einer 1000 µL-Pipette im MACS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in MACS-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-p75^{NTR} aus Hase (Anti-Nerve Growth Factor Receptor p75, Millipore) mit einer Verdünnung von 1:10 in MACS-Puffer. Nach Auswaschung der verbliebenen Primärantikörper, Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in MACS-Puffer wurde der Primärantikörper in einem weiteren Inkubationsschritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper versehen. Die Zellsuspension wurde dazu mit anti-Hase-FITC aus Esel (donkey anti-rabbit-FITC, Millipore Biotec) mit einer Verdünnung von 1:100 in MACS-Puffer inkubiert. Es folgten Waschschrift, Zentrifugation und Resuspension sowie die Kopplung mit „Microbead“-Partikeln, die im MACS-Sortierverfahren erfasst und selektiert werden konnten. Die Inkubation mit anti-FITC-Microbeads aus der Maus (Millipore Biotec) wurde in der Verdünnung 1:5 in MACS-Puffer für 10 min vorgenommen. Die Markierung p75⁺ Zellen erfolgte demnach mit dem Antikörperkomplex anti-p75^{NTR}-FITC-Microbead (Abb. 9A, p75-Markierung, PM). Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren war mit der Resuspension des Zellpellets in Proliferationsmedium die Antikörpermarkierung für die erste MACS-Sortierung nach p75^{NTR} beendet. Die MACS-Sortierung konnte vorbereitet werden. Zwischen allen aufgeführten Inkubationsschritten erfolgten Auswaschung, Zentrifugation (300 rpm, 10 min, 4 °C) und das Absaugen des Zentrifugationsüberstandes immer auf die gleiche Weise. Bei allen Versuchsschritten wurde die Zellsuspension gekühlt transportiert (auf Eis), inkubiert und zentrifugiert (+4 °C). Nach Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper war zusätzlich auf eine lichtgeschützte Umgebung zu achten. Das detaillierte Versuchsprotokoll findet sich im Kapitel 8.2.3.

Gewinnung von p75^{NTR+} und p75^{NTR-} Zellen

Nach erfolgter Antikörpermarkierung wurden Magnethalterung (MACS Multi Stand, Miltenyi) mit MACS-Starkmagneten, ein Zellfilter-Aufsatz (Pre-Separation Filter, 70 µm, Miltenyi), zwei MACS-Trennsäulen inklusive Druckkolben (MACS® Separation Columns, Miltenyi), vier Auffangröhrchen

sowie die MACS Pufferlösung (MACS® Buffer, autoMACS™ Rinsing Solution) steril zur Magnet-assoziierten Zellsortierung unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Eine Trennsäule mit aufgesetztem Zellfilter wurde in den MACS-Magneten eingespannt und mit 500 µL MACS-Puffer vorgespült. Das Eluat des ersten Auffangröhrchens wurde dementsprechend verworfen. Anschließend wurde die markierte Zellsuspension durch die vorgespülten Zellfilter und Zelltrennsäule gegeben und drei Mal mit 500 µL MACS-Puffer gewaschen. Da p75^{NTR} markierte bzw. Microbead-markierte Zellen vom Magneten angezogen und in der porösen Wand der Trennsäule zurückgehalten wurden, enthielt das Eluat von insgesamt 2000 µL Zellen der p75^{NTR}-negativ (p75^{NTR-}) markierten Fraktion. Die Trennsäule wurde daraufhin von dem MACS-Magneten entfernt und mit 1000 µL MACS-Puffer gefüllt. Mit einem Druckkolben (MACS® Separation Columns, Miltenyi) wurde die Pufferlösung durch die Trennsäule gedrückt. Durch den Flüssigkeitssog wurden die p75^{NTR}-positiv markierten Zellen (p75^{NTR+}) aus den Poren der Trennsäule gelöst und im Eluat der p75^{NTR+}-Zellfraktion aufgefangen (Abb. 9A, p75^{NTR}-Sortierung, PS). Die p75^{NTR+}-Zellfraktion sowie p75^{NTR-}-Zellfraktion wurden zentrifugiert (300 rpm, +4 °C). Nach Absaugen des Puffer-Überstands wurde die p75^{NTR+}-Zellfraktion in 500 µL Proliferationsmedium resuspendiert und bei +4 °C zwischengelagert. Die Zellfraktion der p75^{NTR-} Zellen wurde in 90 µL MACS-Puffer resuspendiert und zur weiteren Zellmarkierung und MACS-Zellsortierung zur Gewinnung GLAST⁺ und GLAST⁻ markierter Zellen bereitgestellt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl beider Zellfraktionen erfolgte mittels Neubauerkammer-Zählkammer. Das entsprechende Versuchsprotokoll zur MACS-Zellsortierung findet sich im Kapitel 8.2.3.

Markierung der p75^{NTR-} Zellen mit anti-GLAST-PE und anti-PE-Microbeads

Im zweiten Schritt sollte aus der MACS-vorsortierten Zellfraktion p75^{NTR-} Zellen eine weitere Zellseparation in GLAST-positiv (GLAST⁺) und GLAST-negativ (GLAST⁻) markierte Zellen mit dem bereits angewendeten Verfahren der MACS-Zellsortierung erfolgen. Dazu mussten die Zellen zunächst mit den geeigneten Antikörpern inkubiert werden. Analog zur Zellmarkierung mit anti-

p75^{NTR} wurde die Zellsuspension p75⁻ Zellen mit einem anti-GLAST-Antikörper aus der Maus (anti-GLAST-PE, Miltenyi), der bereits mit fluoreszierendem Phycoerythrin (PE) gekoppelt war, in einer Verdünnung von 1:10 (verdünnt mit MACS-Puffer) für 10 min inkubiert. Eine Inkubation mit einem FcR-Blockadereagenz war hier nicht nötig, da dies bereits im vorangegangenen Protokoll zur Markierung p75^{NTR+} Zellen erfolgte. Nach Auswaschung der ungebundenen Antikörper, Zentrifugation und Absaugung des Überstandes erfolgte eine Inkubation mit anti-PE Microbeads aus der Maus (Millipore Biotec) in der Verdünnung 1:5 in MACS-Puffer für 10 min. Die Markierung GLAST⁺ Zellen erfolgte entsprechend mit dem Antikörperkomplex anti-GLAST-PE-Microbead (Abb. 9A, GLAST-Markierung, GM). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Zellpellet in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und für die anschließende MACS-Zellsortierung in die Zellfraktionen GLAST⁺ sowie p75^{NTR}-negativ/GLAST-negativ (p75^{NTR-}/GLAST⁻) bereitgestellt. Das detaillierte Protokoll zur Zellmarkierung findet sich im Kapitel 8.2.3.

MACS zur Gewinnung von GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellen

Analog zur MACS-Zellsortierung nach p75^{NTR}-Markierung begann die Anreicherung GLAST⁺ Zellen mit der Spülung einer MACS-Trennsäule mittels 500 µL MACS-Puffer. Die GLAST-markierte Zellsuspension wurde in die Trennsäule gegeben, die im MACS-Magneten eingespannt war. Zellen, die nicht in den Poren der Trennsäule magnetisiert und zurückgehalten wurden, konnten nach dreimaliger Spülung mit 500 µL MACS-Puffer als Zellen der p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellfraktion unterhalb der Trennsäule aufgefangen werden. GLAST⁺ markierte und demnach Microbead-gekoppelte Zellen verblieben in den Poren und wurden nach Entfernung des MACS-Magneten mit dem Flüssigkeitssog von 1000 µL MACS-Pufferlösung unter Anwendung eines Druckkolbens aus der Trennsäule gelöst und als Zellen der GLAST⁺ Zellfraktion in einem separaten Auffangröhrchen gesammelt (Abb. 9A, GLAST-Sortierung, GS). GLAST⁺-Zellfraktion sowie p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellfraktion wurden zentrifugiert (300 rpm, +4 °C). Nach Absaugen des Puffer-Überstandes wurden beide Zellpellets jeweils in 500 µL Proliferationsmedium resuspendiert. Die

Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauerkammer-Zählkammer. Die Zellfraktionen wurden anschließend bei +4 °C zwischengelagert. Das entsprechende Versuchsprotokoll zur MACS-Zellsortierung findet sich im Kapitel 8.2.3. In Abbildung 9A wird die sequenzielle MACS-Auftrennung in die Zellfraktionen p75⁺, GLAST⁺ und p75⁻/GLAST⁻ schematisch dargestellt.

2.4.7 Effizienzkontrolle von MACS

Da bei der Antikörpermarkierung mit den Antikörperkomplexen anti-p75^{NTR-}-FITC-Microbead (Abb. 9A, PM) bzw. anti-GLAST-PE-Microbead (Abb. 9A, GM) alle p75^{NTR+} sowie GLAST⁺ Zellen zusätzlich zum Microbead jeweils mit einem detektierbaren Fluorochrom (FITC oder PE) versehen waren, ließ sich der Anteil positiv markierter Zellen mit dem FACS-Gerät der FACS-Facility (Hautklinik der Universitätsklinik Tübingen) durchflusszytometrisch bestimmen. Eine Probe aus etwa 5.000 bis 10.000 dissoziierten Zellen der sortierten Zellfraktionen GLAST⁺, p75^{NTR-}/GLAST⁻ und p75^{NTR+} wurde jeweils in einem FACS-Röhrchen (5 mL-Polystyrene Round-Bottom Tube, BD) mit 1 mL Kulturmedium auf Eis in die FACS Core Facility (Standort Kliniken Tal) der Hautklinik der Universitätsklinik Tübingen transportiert. Unsere Ansprechpartnerin Cornelia Grimmel unterstützte uns dabei im Auftrag von Herrn Professor Dr. Thilo Biedermann mit der Durchführung und Analyse der durchflusszytometrischen Messungen am FACS-Gerät (BD FACSAria III Cell Sorter, BD Bioscience). Nach Platzierung der FACS-Röhrchen in den Röhrchenhalter der Proben-Injektionskammer des FACS-Geräts wurde die automatisierte, durchflusszytometrische Messung der Zellprobe mit der Software BD FACSDiVa manuell gestartet. Zur Abgrenzung vitaler zur Messung geeigneter Zellen von Zellaggregaten oder Zellfragmenten standen verschiedene Einstellungen zur Verfügung, die im Voraus erprobt und festgelegt werden mussten. Im Strahlenfeld des Laserstrahls im FACS-Gerät senden alle festen Bestandteile der Probe abhängig von ihren Eigenschaften Streulicht in unterschiedliche Richtungen aus. Axial zum Laserstrahl entstandenes Streulicht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter)

bezeichnet und gibt Rückschlüsse auf das Volumen des Zählereignisses. Licht, das in perpendikulärer Richtung zum Laserstrahl ermittelt wird, ist als sogenanntes Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) ein Maß für die Granularität und Struktur der Zählereignisse. Mit diesen Parametern sollten alle Zählereignisse so von Zellaggregaten und Zellfragmenten abgegrenzt und charakterisiert werden, dass eine geeignete Zellfraktion von Einzelzellen für die Fluoreszenzanalyse definiert werden kann (Abb. 2). Die Fluoreszenzintensität der Zellen für die Fluorochrome FITC und PE wurde mit einem blauen 488 nm Octagon-Laser sowie verschiedenen Spiegeln und Filter automatisiert gemessen. Nach Anregung durch das blaue Laserlicht emittiert des FITC-Fluorochrom grünes Licht im Wellenbereich 530 nm, das durch den LP (Long Pass) Spiegel 502 und BP (Band Pass) Filter 530/30 detektiert wurde. Die Kombination aus Spiegel und Filter war dabei im PMT (Photomultiplier Tube) E lokalisiert. PMT D enthielt den LP Spiegel 556 und den BP Filter 575/26 und konnte das rote Emissionslicht des PE-Fluorochroms im Wellenbereich 575 nm registrieren. Da die Emissionsspektren der Fluorochrome sich teilweise überlappten, musste eine geeignete digitale Kompensation gefunden werden, um die Fluoreszenzsignale eindeutig zuordnen zu können (Abb. 3A).

Bei der Etablierung der FACS-Sortierung stellte sich heraus, dass sich die Viabilität der Zellen mit der mechanischen Belastung während der Fluoreszenzanalyse reduzierte. Zur Schonung der Zellen sollte der Sog innerhalb der FACS-Kapillare daher durch die Wahl einer besonders weiten Ansaugdüse (Nozzle) mit einer Öffnung von 100 μm und Einstellung des Kapillardruckes auf 2 β Psi minimiert werden. Die Optimierungen bei der Vorauswahl wurden bei den durchflusszytometrischen Messungen nach MACS-Sortierung beibehalten. Mit einer Flussgeschwindigkeit von durchschnittlich 2500 registrierten Ereignissen pro Sekunde konnte eine adäquate Zellzahl nach innerhalb von 15-30 Minuten (Sort elapsed time, abhängig von Suspensionsvolumen und Zellzahl) erfasst werden. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Analysen (für eine Zellfraktionsprobe von jeweils etwa 5.000-10.000 Zellen) wurden in Abhängigkeit von der FITC- (Abb. 9B-D, Abszissenachse) und PE-Fluoreszenzintensität (Abb. 9B-D, Ordinatenachse)

für die MACS-sortierten Zellfraktionen $p75^+$ (Abb. 9B), $GLAST^+$ (Abb. 9C) und $p75^-/GLAST^-$ (Abb. 9D) separat in jeweils einem Punktwolkendiagramm (Box Plot) digital dargestellt (beispielhafte Diagramme aus 7 unabhängigen Versuchsansätzen). Jeder Punkt entsprach einem Zählereignis. Die Diagramme wurden entsprechend der FITC- und PE-Fluoreszenzintensität in vier Quadranten gegliedert und begrenzten damit die Schwellenwerte für $FITC^+$ bzw. $p75^{NTR+}$ (Abb. 9B-D, grün, Q4), PE^+ bzw. $GLAST^+$ (Abb. 9B-D, rot, Q1) und $FITC^-/PE^-$ bzw. $p75^{NTR^-}/GLAST^-$ (Abb. 9B-D, gelb, Q3) Zellen. Die Effizienz der MACS-Sortierung konnte so bestimmt und mit den Ergebnissen der FACS-Sortierung sowie mit der Primärkultur verglichen werden. Da sich der durchflusszytometrischen Effizienzkontrolle MACS-sortierter Zellen keine weitere Verwendung der Zellen anschließt, konnten neben vitalen auch in PFA 2 % fixierte Zellen mit dem oben beschriebenen Verfahren entsprechend ihrer Fluoreszenz beurteilt werden. Wichtig war dabei eine lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C bis zum Zeitpunkt der FACS-Analyse für maximal 2 Tage.

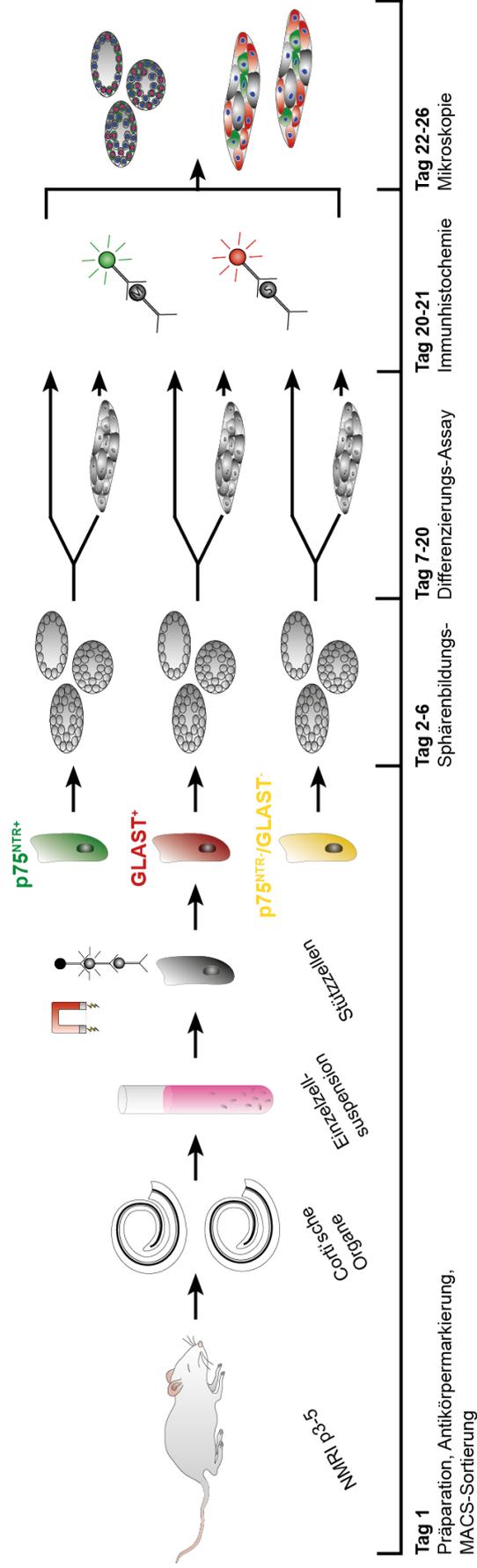


Abbildung 5: Identifizierung von $p75^{NTR+}$ und $GLAST^+$ Stammzellen des Corti'schen Organs der Maus mittels MACS-Zellsortierung und *in vitro* Kultivierung. Schematische Darstellung der methodischen Vorgehensweise zur Anreicherung, Kultivierung und Analyse von Zellen, Sphären und differenzierten Sphären nach MACS-Sortierung mit chronologischer Einordnung in Tagen (Zeitachse unten). **Tag 1:** Präparation der immaturren Maus (NMR) im Altersstadium p3-5, Dissoziation der Corti'schen Organe zu einer Einzelzellsuspension, Antikörper-Markierung mit anti- $p75^{NTR+}$ -FITC-Microbead und anti- $GLAST$ -PE-Microbead, sequenzielle MACS-Sortierung in die MACS-Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$, $p75^{NTR+}/GLAST^-$, Beginn der *in vitro* Kultivierung. **Tag 2-6:** Sphärenbildungs-Assay. **Tag 7-20:** Differenzierungs-Assay unter Entfernung der Wachstumsfaktoren oder immunhistochemische Markierung und Analyse der Sphärenbildungskapazität. **Tag 20-21:** Immunhistochemische Markierung der differenzierten Sphären. **Tag 22-26:** Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Markierung von Sphären und differenzierten Sphären.

2.5 FACS zur Gewinnung von distinkten Stützzellpopulationen

2.5.1 Durchflusszytometrische Kontrollmessungen

Im Rahmen der MACS-Sortierung wurden geeignete Antikörper gegen die CD-Marker p75^{NTR} und GLAST gefunden, die mit Isotypkontrollen (mit anti-IgG-FITC und anti-IgG-PE) sowie Analysen der zellulären Autofluoreszenz und unspezifischen Antikörperbindung auf ihre Eignung für eine Zellsortierung geprüft wurden. Bei der FACS-Sortierung konnten die selben Primärantikörper anti-p75^{NTR} (aus Hase) und anti-GLAST (aus Maus) verwendet werden, sodass zusätzliche durchflusszytometrische Kontrollmessungen entfielen (Kapitel 2.4.4 und 2.4.5).

2.5.2 Markierung und Durchführung von FACS

Markierung mit anti-p75^{NTR}, Donkey-anti-rabbit-FITC und anti-GLAST-PE

Im Gegensatz zur sequenziellen MACS-Sortierung erfolgte die Auftrennung der markierten Primärkultur in die einzelnen Zellfraktionen bei der FACS-Sortierung simultan. Die Markierung der vereinzelt Zellsuspension Corti'scher Zellen der Maus (p3-5) mit Antikörpern gegen GLAST und p75^{NTR} wurde daher nacheinander in einem Protokoll durchgeführt. Wie bei MACS wurden Corti'sche Organe der postmortalen Maus (p3-5) zu einer möglichst homogenen Einzelzellsuspension isoliert, präpariert und dissoziiert (Kapitel 2.4.1 bis 2.4.3). Analog zur Antikörpermarkierung für die MACS-Sortierung wurde die Einzelzellsuspension zunächst in einem 15 mL Falcon Zellröhrchen (15 mL Polystyrene Conical Tube, BD Falcon) bei +4 °C und 300 rpm zentrifugiert (Multifuge 3 L-R, Haereus). Nachdem der Mediumüberstand mit Pipetten (Größe 1000 und anschließend 100) vorsichtig entfernt wurde, erfolgte die Resuspension des Zellpellets in MACS-Puffer (autoMACSTM Rinsing Solution, Miltenyi Biotec). Die Verwendung des MACS-Puffers wurde zur besseren Vergleichbarkeit beider Sortierverfahren im Protokoll der FACS-Sortierung beibehalten. Um unspezifische Antikörperbindungen an FC-Rezeptoren der

Zellen zu vermeiden, wurde die Zellsuspension wie auch bei der MACS-Sortierung bei 4 °C zunächst mit einem FcR-Blockadereagenz (FcR blocking reagent, mouse, Miltenyi Biotec) mit einer Verdünnung von 1:10 (verdünnt mit MACS-Puffer) für 10 min inkubiert und im Anschluss mit Hilfe einer 1000 mL-Pipette im MACS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in MACS-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-75^{NTR} aus Hase (Anti-Nerve Growth Factor Receptor p75, Millipore) mit einer Verdünnung von 1:10 in MACS-Puffer. Nach Auswaschung der verbliebenen Primärantikörper, Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in MACS-Puffer wurde der Primärantikörper in einem weiteren Inkubationsschritt mit dem selben Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper versehen, der bereits bei der MACS-Sortierung zur Anwendung kam. Die Zellsuspension wurde dazu mit anti-Hase-FITC aus Esel (donkey anti-rabbit-FITC, Millipore Biotec) mit einer Verdünnung von 1:100 in MACS-Puffer inkubiert. Es folgten Waschschrift, Zentrifugation und Resuspension. Die Markierung mit dem anti-GLAST (aus Maus) Antikörper, der bereits mit fluoreszierendem Phycoerythrin (PE) gekoppelt war, schloss sich nun direkt in einer Verdünnung von 1:10 für 10 min bei +4 °C an. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in 500 µL MACS-Puffer wurde das Protokoll zur Antikörpermarkierung mit der Anwendung eines 70 µm Zellfilter-Aufsatzes (Pre-Separation Filter, 70 µm, Miltenyi) abgeschlossen. Dieser Schritt diente bei MACS und FACS zur Eliminierung größerer Zellaggregate vor Sortierung, sodass insbesondere bei FACS die Kapillare nicht verstopft. Zwischen allen aufgeführten Inkubationsschritten erfolgten Auswaschung, Zentrifugation (300 rpm, 10 min, 4 °C) und das Absaugen des Zentrifugationsüberstandes stets auf die gleiche Weise. Bei allen Versuchsschritten wurde die Zellsuspension gekühlt transportiert (auf Eis), inkubiert und zentrifugiert (+4 °C). Nach Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper war zusätzlich auf eine lichtgeschützte Umgebung zu achten. Das detaillierte Versuchsprotokoll findet sich im Kapitel 8.2.4.

Gewinnung von p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellen

Nach simultaner Markierung der Einzelzellsuspension Corti'scher Zellen der Maus (p3-5) mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenepitope GLAST und p75^{NTR} erfolgte die Zellsortierung der Zellen mittels FACS extern in Kooperation mit der FACS-Core Facility der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen. Der Transport zur Hautklinik musste dabei lichtgeschützt und unter stetiger Kühlung erfolgen. In einer mit Eis gefüllten Styroporbox wurde neben der Antikörper-markierten Zellsuspension pro zu sortierende Zellfraktion ein leeres FACS-Röhrchen (5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube, BD) mit je 1 mL Proliferationsmedium bereitgestellt. Dies entsprach bei den Zellfraktionen p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ drei zusätzliche FACS-Röhrchen. Dicht verschlossen wurde die Styroporbox in horizontaler Lagerung vorsichtig und unmittelbar nach Markierung zur Hautklinik transportiert. In der FACS-Core Facility wurden alle weiteren Schritte der FACS-Zellseparierung von der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Cornelia Grimm vorgenommen. Sowohl die markierte Zellsuspension als auch die mit Proliferationsmedium gefüllten FACS-Röhrchen für die einzelnen Zellfraktionen wurden mittels Vortex-Gerät durchmischt und in die entsprechenden Vorrichtungen des FACS-Geräts (BD FACSAria III Cell Sorter, BD Biosciences) platziert. Der automatisierte Sortiervorgang wurde am Computer im FACS-Sortierprogramm FACSDiVa gestartet, überwacht und gegebenenfalls nachjustiert. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnten die Einstellungen während der FACS-Sortierung bereits für Corti'sche Zellen der Maus optimiert werden. Ziel war einerseits die Zellviabilität durch eine geringe mechanische Belastung bei der Sortierung zu erhalten, andererseits eine möglichst hohe Reinheit der FACS-sortierten Zellfraktionen zu ermöglichen. Um den Sog innerhalb der FACS-Kapillare zu minimieren wurde bei der Sortiereinstellung (Sort Setup) eine Ansaugdüse (Nozzle) mit einer weiten Öffnung von 100 µm und dem niedrigsten Kapillardruck von 20 Psi gewählt. Bei der Definierung der Präzision (Precision) wurde das höchste Maß an Reinheit (Purity 32) auf Kosten einer niedrigen Ausbeute (Yield 0) eingestellt. Die Einstellungen von Grundspannung, Schwellenwert sowie Kompensation der

spektralen Überlappung von FITC und PE wurden von den durchflusszytometrischen Effizienzkontrollen MACS-sortierter Zellen übernommen. Nach Beginn des Sortierprogramms wurden die anti-p75^{NTR}-IgG-FITC- und anti-GLAST-PE markierten Zellen in eine FACS-Kapillare eingesogen und analog zu den Kontrolluntersuchungen und MACS-Effizienzanalysen mittels Vorwärtsstreulicht (Abb. 15B, FSC, Abszissenachse) und Seitwärtsstreulicht (Abb. 15B, SSC, Ordinatenachse) nach Zellvolumen und Granularität der Zellen sowie entsprechend der Größe und Struktur ihrer Zellkerne als optimierte Zellpopulation P1 definiert (Abb. 15B, P1). Zellen innerhalb des Gates P1 wurden im Anschluss selektiert den FACS-Zellfraktionen zugeteilt. Registrierte Ereignisse außerhalb des Gates wurden bei der Sortierung nicht berücksichtigt, da sie entweder Zellaggregate (Abb. 15B, **) oder Zelldebris (Abb. 15B, *) darstellten. Simultan dazu wurden die markierten Zellen der Einzelzellsuspension Corti'scher Zellen einzeln mit dem blauen Fluoreszenzlasers 488 (Exzitation bei 488 nm) auf ihre FITC- und PE-Fluoreszenz (Abb. 3A) analysiert. Je nach Lichtemission des Fluorochroms (Abb. 3A, FITC bei 530 nm, PE bei 575 nm) wurden die Zellen vom FACS-Gerät als p75^{NTR+} (FITC⁺) oder GLAST⁺ (PE⁺) identifiziert. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 1000-2500 registrierten Ereignissen pro Sekunde wurde die heterogene Primärkultur Corti'scher Zellen der Maus innerhalb von 15-30 Minuten (Sort elapsed time, abhängig von Suspensionsvolumen und Zellzahl) in die FACS-Sortierrohre (5 mL-Polystyrene Round-Bottom Tubes, BD, jeweils mit 1 mL Kulturmedium) als p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ FACS-Zellfraktionen sortiert (Abb. 6, Tag 1, rot, grün, gelb). Im Vergleich zur Zellsortierung mittels MACS erfolgte die Auftrennung in alle drei FACS-Zellfraktionen simultan (Abb. 15A). Unmittelbar nach Beendigung des Sortierprogramms wurden die einzelnen Zellfraktionen in den FACS-Röhren zum Rücktransport in die lichtgeschützte Styroporbox auf Eis platziert. Bevor die Zellen in die geeigneten Proliferationsbedingungen gebracht wurden, erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration neben der elektronisch gemessenen Zellzahl manuell mittels Neubauerkammer.

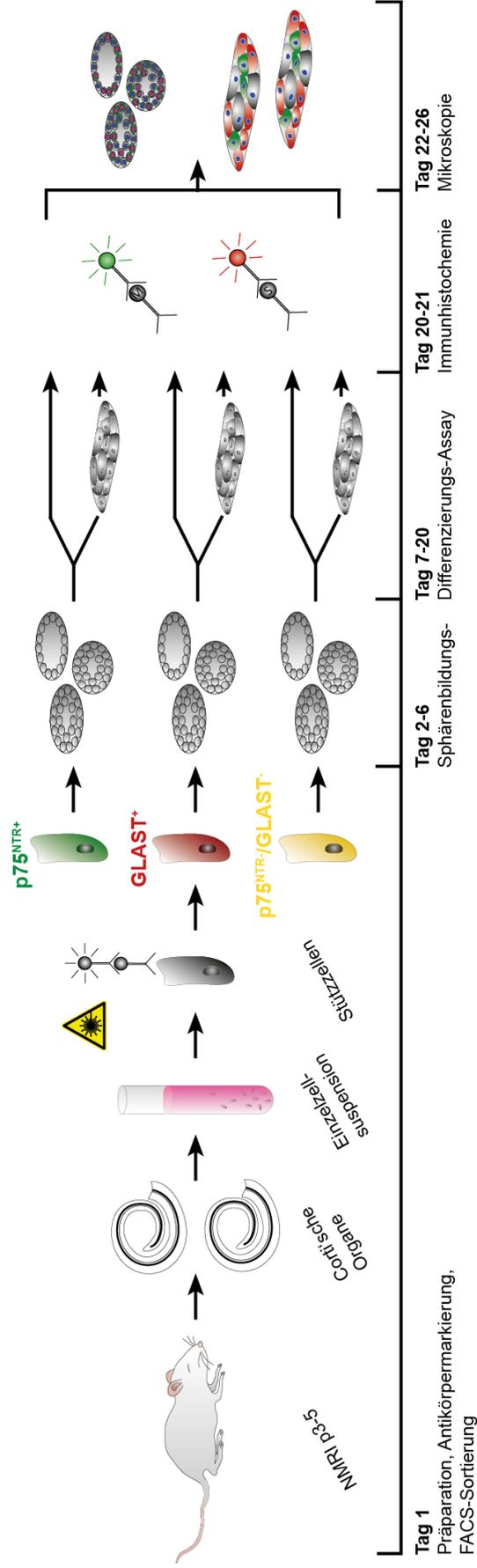


Abbildung 6: Identifizierung von $p75^{NTR+}$ und $GLAST^+$ Stammzellen des Corti'schen Organs der Maus mittels FACS-Zellsortierung und *in vitro* Kultivierung. Schematische Darstellung der methodischen Vorgehensweise zur Anreicherung, Kultivierung und Analyse von Zellen, Sphären und differenzierten Sphären nach FACS-Sortierung mit chronologischer Einordnung in Tagen (Zeitachse unten). **Tag 1:** Präparation der immaturren Maus (NMR) im Altersstadium p3-5, Dissoziation der Corti'schen Organe zu einer Einzelzellsuspension, Antikörper-Markierung mit anti- $p75^{NTR}$ -FITC und anti- $GLAST$ -PE, automatisierte, simultane FACS-Sortierung in die FACS-Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$, $p75^{NTR-}/GLAST^-$; Beginn der *in vitro* Kultivierung. **Tag 2-6:** Sphärenbildungs-Assay unter Entfernung der Wachstumsfaktoren oder immunhistochemische Markierung und Analyse der Sphärenbildungskapazität. **Tag 20-21:** Immunhistochemische Markierung der differenzierten Sphären. **Tag 22-26:** Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Markierung von Sphären und differenzierten Sphären.

2.6 Zellkultur unter Proliferationsbedingungen

2.6.1 Proliferations-Assay

Das Proliferations-Assay zur Sphärenbildung Corti'scher Zellen der Maus bestand aus Kultivierung der Zellen sowie Sphärenentnahme mit morphologischer Sphärenzählung nach einer Kultivierungsperiode von insgesamt 5 Tagen *in vitro* (DIV). Die Kultivierung erfolgte für die Kontrollfraktion unsortierter Zellen, für MACS- und FACS-sortierte Zellen sowie für nach verschiedenen Windungen sortierte Zellen des Corti'schen Organs der immaturren Maus (p3-5 oder p0) nach demselben Protokoll. Zunächst wurde das Proliferationsmedium nach festgelegter Zusammensetzung in einem 50 mL Falcon Tube (BD Falcon 50mL Polystyrene Conical Tube) angesetzt. Dieses bestand aus Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose und F12 Medium (Verhältnis 1:1) mit N2 and B27 Supplement, Invitrogen), das mit bFGF (10 ng/mL, rhFGF-basic, 233-FB, R&D Systems), IGF-1 (50 ng/mL, rhIGF-1, 291-G1, R&D Systems), Ampicillin (0,1 mg/mL, Ampicillin Sodium Salt – Irradiated, 11593-027, Gibco®) und Heparinsulfat (2 µg/mL) versetzt wurde. Nach Ermittlung der Zellkonzentration mittels Neubauerkammer wurden die Corti'schen Zellen der immaturren Maus als Einzelzellsuspension ggf. unmittelbar nach MACS- oder FACS-Sortierung in einer Konzentration von 900 Zellen pro 300 µL Proliferationsmedium in einem Well einer 96-Well Kulturplatte kultiviert. In diesem proliferationsförderndem Kulturmedium wurden die Zellen für 5 DIV bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator (Heraeus HeraCell®) und unter nicht-adhäsiven Bedingungen kultiviert. Während dieser Kultivierungsphase war ein Mediumwechsel nicht nötig. Das Sphärenbildungs-Assay ist nach MACS- und FACS-Sortierung sowie mit anschließender chemischer *in vitro* Stimulation in den Abbildungen 5, 6 und 7 schematisch dargestellt.

2.6.2 Quantifizierung von morphologisch unterschiedlichen Sphären

Nach 5 DIV Sphärenbildungs-Assay wurden die Sphären in den 96-Well Kulturplatten aus dem Inkubator entnommen und unter einem inversen Mikroskop (Axiovert 25) quantifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, verbliebene Einzelzellen, Zellaggregate (Abb. 10A-D, leere Pfeilspitzen), sowie Zellfragmente (Abb. 10D, *) von Otosphären zu differenzieren. Die Sphären wurden nach morphologischen Kriterien unterschieden und in drei Gruppen eingeteilt: solide (s), transitionale (t) und hohle (h) Sphären (Abb. 10E-G). Als solide Sphären wurden die kleinen, dichten Sphären mit scharfer Umrandung und einem Durchmesser von durchschnittlich 60 μm bezeichnet (Abb. 10E, (s)). Mit einem Durchmesser von durchschnittlich 150 μm zeichneten sich hohle Sphären (Abb. 10G, (h)) durch ihre große Oberfläche aus und beinhalteten typisch polygonal-geformte Zellen, die wie Epithelzellen einen Hohlraum der Sphäre auskleideten. Liegen Charakteristika solider und hohler Sphären gleichzeitig vor, wurden diese Sphären als transitionale Sphären (Abb. 10F, (t)) bezeichnet. Sie stellten sowohl morphologisch als auch mit einem Durchmesser von ca. 85 μm die Übergangsform der beiden Sphärentypen dar. Da solide Sphären mikroskopisch nicht zuverlässig von transitionalen Sphären unterscheidbar waren, wurden (s)- und (t)-Sphären in der Auswertung als Gruppe kleiner Sphären zusammengefasst (Abb. 10I-J, (s+t)). Je MACS-Zellfraktion wurde die Gesamtzahl (Abb. 10I-J, alle) der Sphären sowie deren Zusammensetzung aus den 3 Sphärentypen in 5 beliebigen Wells der 96-Well Kulturplatte ermittelt. Aufgrund der begrenzten Sphärenanzahl nach FACS-Sortierung wurde hier auf eine morphologische Aufteilung der Sphären verzichtet. Zur Beurteilung der Sphärenbildungskapazität wurde die Sphärenanzahl pro Kultivierungseinheit (1 Well) sowie pro präpariertes Corti'sches Organ der immaturen Maus bestimmt. Nach manueller Quantifizierung der Sphärenbildungskapazität wurden die Sphären aus den Wells abgesaugt und je Fraktion in einem Falcon Tube zusammengefasst. Dabei war darauf zu achten, die Wells gründlich und vorsichtig mit Medium nachzuspülen, um auch am Boden haftende Sphären zu erfassen.

2.6.3 EdU-Assay zur Bestimmung des Proliferationspotenzials

Die MACS- oder FACS-sortierten Zellfraktionen wurden separat im etablierten *in vitro* Sphärenbildungs-Assay kultiviert und durch Zellproliferationsstimulierende Substanzen innerhalb von 5 *in vitro* Tagen (DIV) zur Sphärenbildung angeregt. Grundlage für die Entstehung der Sphären während der Kultivierung ist die Zellproliferation im Sinne einer mitotischen Zellteilung. Diese schließt sich der DNA-Synthese an und führt als Zellkernteilung, der sogenannten Zytokinese, zur Entstehung von zwei Tochterzellen. Ob die in dieser Arbeit generierten Sphären aus einer mitotischen Zellteilung hervorgegangen sind, ließ sich mit Hilfe des 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)-Assay untersuchen. Im EdU-Assay (Click-iT® EdU Imaging Kits, Invitrogen) wurde EdU in einer Konzentration von 1 µL/mL dem Proliferationsmedium für den gesamten Zeitraum des Sphärenbildungs-Assays von 5 DIV unmittelbar nach MACS- oder FACS-Sortierung beigegeben. Das Proliferationsmedium blieb in der Zusammensetzung mit den Wachstumsfaktoren unverändert (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose und F12 Medium (Verhältnis 1:1) mit N2 and B27 Supplement, bFGF (10 ng/mL), IGF-1 (50 ng/mL), Ampicillin (0,1mg/mL), Heparinsulfat (2 µg/mL)). Während der DNA-Synthese (S-Phase) konkurrierte EdU als Nukleosidanalogen mit Thymidin und wurde von sich mitotisch teilenden Zellen in die DNA eingebaut, weshalb es sich daher als Proliferationsmarker eignete. Als Folge einer Kupfer-katalysierten kovalenten Reaktion zwischen einer Säure, die in dem speziellen Alexa Fluor® Farbstoff des EdU-Click-iT Kits enthalten ist, und einem Alkin als Bestandteil von EdU, konnten EdU-inkorporierte Zellen nach dem Sphärenbildungs-Assay am DIV 5 mit dem Alexa Fluor® Farbstoff markiert und über das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Vorbereitend für den EdU-Assay nach FACS-Sortierung mussten die FACS-Röhrchen vor dem Transport zur FACS-Core Facility der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen entsprechend vorbereitet werden, sodass die einzelnen sortierten FACS-Zellfraktionen bereits in EdU-versetztes Proliferationsmedium aufgefangen werden konnten. Nach MACS-Sortierung mussten keine speziellen Vorkehrungen getroffen werden, das

Proliferationsmedium wurde lediglich mit EdU versetzt. Die Zusammensetzung des Proliferationsmediums blieb außer dem Zusatz von EdU wie im etablierten Protokoll bestehen. Die MACS- oder FACS-sortierten Zellfraktionen wurden in einer Konzentration von 900 Zellen pro 300 μ L Proliferationsmedium auf 96-Well Kulturplatten verteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator (Heraeus HeraCell®) für 5 DIV ohne Mediumwechsel kultiviert. Am 5 DIV wurden die Sphären entnommen und entsprechend des EdU-Kits immunhistochemisch markiert (Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 Imaging Kit, Molecular Probes®). Die Kombination mit geeigneten Stammzellmarkern (Nestin, Bmi1, Jag1) sollte dabei eine Kolo-kalisation mit EdU und damit die Stammzellartigkeit proliferierender Zellen im Sphärenbildungs-Assay aufzeigen. Das detaillierte Protokoll zum immunhistochemischen Nachweis EdU-exprimierender Zellen findet sich im Kapitel 8.2.5. Die immunzytologische Markierung von Stammzell- und Differenzierungsmarkern an Sphären ist in Kapitel 2.9 beschrieben.

2.7 Zellkultur unter Differenzierungsbedingungen

2.7.1 Zellkammerbeschichtung

Nach abgeschlossenem Sphärenbildungs-Assays wurden die entnommenen Sphären am DIV 5 in das Differenzierungs-Assay eingebracht. Um geeignete Adhäsionsbedingungen zu schaffen mussten Objektträger, die in jeweils acht Kulturkammern separiert waren (8 Chamber Polystyrene Vessel, BD Falcon Culture Slides, Ref. 354108, 354118), im Voraus mit geeigneten Proteinen beschichtet werden. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe wurden Poly-L-Ornithin und Fibronectin als diejenige Beschichtung ermittelt, die am zuverlässigsten eine Anheftung und *in vitro* Differenzierung von Sphären unterstützt. Die Kulturplatten wurden zunächst mit Poly-L-Ornithin in einer Verdünnung von 15 μ g/mL PBS über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ (Inkubator Heraeus HeraCell®) inkubiert. Nach dreimaliger Spülung mit HEPES-Hanks-Lösung (285 mosml/L, Universitäts-Apotheke Tübingen) konnten die Kulturplatten mit Parafilm versiegelt und bei +4 °C für mehrere Wochen gelagert

werden. Bei sofortiger Verwendung wurden die Kulturplatten direkt mit Fibronectin beschichtet. Dieses wurde in einer Konzentration von 1 µg/mL PBS für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ (Inkubator Heraeus HeraCell®) in die Kulturkammern gegeben und anschließend mit Hepes-Hanks-Lösung nachgespült. Da die Kulturplatten nach Absaugen der Hepes-Hanks-Lösung nicht mehr trocken gelegt werden durften, folgte das Differenzierungs-Assay im unmittelbaren Anschluss. Das Protokoll zur Beschichtung von Kulturplatten findet sich in Kapitel 8.2.6.

2.7.2 Differenzierungs-Assay

Am DIV 5 des Sphärenbildungs-Assay wurden die Sphären nach Anzahl und morphologischen Zusammensetzung quantifiziert. Die ausgezählten Sphären wurden anschließend in das etablierte Differenzierungsmedium resuspendiert. Dieses war zusammengesetzt aus Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose und F12 Medium (Verhältnis 1:1) mit N2 and B27 Supplement, Invitrogen), das Ampicillin (0,1 mg/mL, Ampicillin Sodium Salt – Irradiated, 11593-027, Gibco®) angereichert wurde. Im Vergleich zum Proliferationsmedium fehlten hier lediglich die Wachstumsfaktoren. In einer Konzentration von 60-70 Sphären pro 300 µL Differenzierungsmedium und Chamber wurden die proliferierten Sphären am DIV 5 in die doppelt beschichteten Kulturkammern (8 Chamber Polystyrene Vessel, BD Falcon Culture Slides) pipettiert und für weitere 14 DIV in das Differenzierungs-Assays eingebracht. Ein Mediumwechsel, bei dem etwa 150 µL durch frisches Medium ersetzt wurde, erfolgte jeweils am DIV 7 und DIV 10. Am DIV 14 wurden die adhärenierten und differenzierten Sphären, die sogenannten Patches, in den Kulturkammern fixiert und zur qualitativen und quantitativen immunhistochemischen Analyse markiert. Die Zwischenlagerung erfolgte lichtgeschützt und bei + 4 °C.

2.7.3 Kultivierung unter *in vitro* Zugabe eines Notch-Inhibitors

Die chemische Stimulation von differenzierten Sphären mit einem Notch-Inhibitor erfolgte nach etabliertem Sphärenbildungs-Assay und anschließend modifiziertem Differenzierungs-Assay. Dazu wurden präparierte und dissoziierte Zellen des *post partem* entnommenen gesamten Corti'schen Organs der Maus (p0) sowie Zellen aus dem mikropräparatorisch getrennten apikalen, mittleren und basalen Segments des Corti'schen Organs der Maus (p0) quantifiziert und in einer Zellkonzentration von 900 Zellen pro 300 μ L im etablierten *in vitro* Sphärenbildungs-Assay kultiviert. Unter proliferationsfördernden und nicht-adhäsiven Bedingungen konnten über insgesamt 5 DIV Sphären generiert werden. Nach Quantifizierung der Sphären wurden die Kultivierungsbedingungen entsprechend des etablierten *in vitro* Differenzierungs-Assay modifiziert. In Wachstumsfaktor-freiem Kulturmedium wurden die Sphären in einer Konzentration von durchschnittlich 60-70 Sphären pro 300 μ L auf Poly-L-Ornithin / Fibronectin-beschichteten Glasobjektträgern verteilt (8 Chamber Polystyrene Vessel, BD Falcon Culture Slides). Vorbereitend für die *in vitro* Stimulation mit Notch-Signalweg Inhibitor wurden zuvor 1000 μ g L685458 Notch-Inhibitor (γ -Sekretase-Inhibitors L685458, Sigma) in 1000 μ L Dimethylsulfoxid (DMSO, organisches Lösungsmittel) angesetzt (entspricht 1,48 mM). 1 μ L dieser Stammlösung wurde vor Anwendung mit 500 μ L Differenzierungsmedium versetzt. Diese Lösung konnte mit der Zielkonzentration von 1,5 μ M Notch-Inhibitor in die *in vitro* Kultur gegeben werden. 24 Stunden nach Beginn des Differenzierungs-Assays erfolgte die Applikation des Notch-Inhibitors (1,5 μ M) durch Austausch des Differenzierungsmediums. Nach weiteren 24 Stunden in Kultur wurde der Notch-Inhibitor durch Zugabe von Differenzierungsmedium (ohne Zusatz) wieder aus der Kultur entfernt. Eine Beeinflussung der *in vitro* Kultur durch das Lösungsmittel DMSO musste zur Beurteilung der Notch-Signalweg Inhibition ausgeschlossen werden. Für den Kontrollansatz nur mit DMSO wurde das Medium nach 24 Stunden und für 24 Stunden entsprechend mit DMSO-versetztem Differenzierungsmedium ausgetauscht (1 μ L DMSO in 500 μ L Medium). Anschließend wurden die Sphären regulär im etablierten

Differenzierungs-Assay kultiviert. Am DIV 14 des Differenzierungs-Assays wurden die differenzierten Sphären entnommen, immunhistochemisch markiert und systematisch mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zwischenlagerung erfolgte lichtgeschützt bei + 4 °C. Die Präparation nach apikaler, mittlerer und basaler Windung wird in Kapitel 2.8 erläutert. Das detaillierte Protokoll zur immunhistochemischen Markierung differenzierter Sphären findet sich im Kapitel 8.2.7.

2.8 Kultivierung von segmental getrennten Corti'schen Zellen

Die Präparation der immaturen Corti'schen Organe der Maus (p0) zur Gewinnung des zellulären Ausgangsmaterials erfolgte analog zur Vorbereitung der MACS- und FACS-Sortierung (Kapitel 2.4.1). Das murine Corti'sche Organ wurde unmittelbar post partem (p0) entnommen und mikropräparatorisch (Zeiss Mikroskop Stemi 2000-C) in die 3 Segmente der apikalen, mittleren und basalen Windung aufgeteilt. Die Aufteilung erfolgte dabei mit Hilfe eines mikropräparatorischen Messers. Da es keine sichtbaren Grenzen zur Orientierung gab, wurde darauf geachtet, dass das Corti'sche Organ in 3 möglichst gleich große Abschnitte geteilt wird. Dabei entsprach das obere Drittel dem apikalen, das mittlere Drittel dem mittleren und das untere Drittel dem basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus. Die verschiedenen Abschnitte wurden anschließend nach apikaler, mittlerer und basaler Windung getrennt gesammelt, trypsinisiert und zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert (entsprechend Kapitel 2.4.2). Nach Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauerkammer wurden die Corti'schen Zellen in einer Konzentration von 900 Zellen pro 300 µL Medium unter nicht-adhäsiven Bedingungen in das etablierte *in vitro* Sphärenbildungs-Assay eingebracht. Das dabei verwendete proliferationsfördernde Medium blieb unverändert (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose und F12 Medium (Verhältnis 1:1) versetzt mit N2 and B27 Supplement, bFGF (10 ng/mL), IGF-1 (50 ng/mL), Ampicillin (0,1 mg/mL) und Heparinsulfat (2 µg/mL)). Die Quantifizierung am DIV 5 erfolgte wie bereits beschrieben durch mikroskopische Quantifizierung und unter

Berücksichtigung der unterschiedlichen Morphologie von soliden (s), transitionalen (t) und hohlen (h) Sphären. Die Sphären wurden wie beschrieben in das Differenzierungs-Assay überführt und nach weiteren 14 DIV zur immunhistochemischen Markierung und fluoreszenzmikroskopischen Analyse entnommen. Die methodische Vorgehensweise ist in Abbildung 7 schematisch und in chronologischer Abfolge dargestellt.

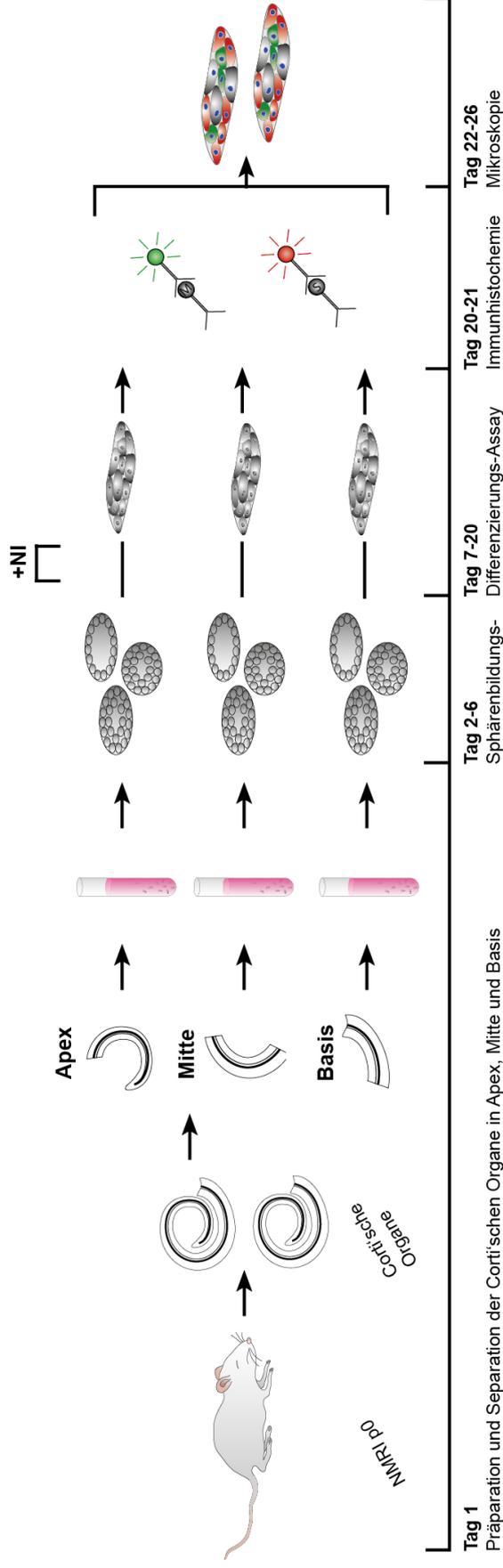


Abbildung 7: Identifizierung von Stammzellen aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus mittels *in vitro* Kultivierung und Notch-Signalweg-Inhibition. Schematische Darstellung der methodischen Vorgehensweise bei der Präparation des Corti'schen Organs in verschiedene Segmente, Kultivierung und Analyse von Sphären und differenzierten Sphären mit chronologischer Einordnung in Tagen (Zeitachse unten). **Tag 1:** Präparation des immaturren Corti'schen Organs der neonatalen Maus (NMR1, p0) in ein apikales, mittleres und basales Segment, Dissoziation zu einer Einzelzellsuspension je Segment, Beginn der *in vitro* Kultivierung. **Tag 2-6:** Sphärenbildungs-Assay. **Tag 7-20:** Differenzierungs-Assay unter Entfernung der Wachstumsfaktoren und Applikation des Notch-Signalweg-Inhibitors (γ -Sekretase Inhibitor L685458) am Tag 8 für 24 Stunden. **Tag 20-21:** Immunhistochemische Markierung der differenzierten Sphären. **Tag 22-26:** Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Markierung von differenzierten Sphären.

2.9 Immunhistochemische Markierung von Sphären

Durch MACS-Sortierverfahren angereicherte p75^{NTR}- und GLAST-exprimierende Stützzellpopulationen des immaturren Corti'schen Organs des Maus (p3-5) konnten in einem etablierten *in vitro* Proliferations-Assay zur Sphärenbildung gebracht werden. Sphären aller drei MACS-Zellfraktionen sollten mittels EdU-Assay auf ihre zellproliferativen Eigenschaften untersucht werden. Neben der Zellproliferation sollte die Stammzellartigkeit der potenziellen Progenitorzellen innerhalb der Sphären, die innerhalb von 5 DIV aus MACS-sortierten Zellfraktionen generiert wurden, qualitativ auf Proteinebene untersucht werden. Dazu sollten die Stammzellmarker Nestin, Bmi1 und Jag1 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Nach Zellsortierung und abgeschlossenem Sphärenbildungs-Assay wurden die Sphären am DIV 5 entnommen und zusammen mit dem Proliferationsmedium in einen Filtereinsatz mit Membran (Porengröße 8,0 µm) pipettiert. Die Filtereinsätze werden daraufhin in eine 24-Well Kulturplatte eingehängt. Die Sphären verblieben während der gesamten immunhistochemischen Markierung in diesem Filtereinsatz und wurden in der 24-Well Kulturplatte ständig feucht gehalten. Die poröse Membran mit einer Porengröße von 8,0 µm verhindert, dass die nicht-adhärenen Sphären davon gespült werden, und erleichtert das Entfernen überschüssiger Flüssigkeiten zwischen den verschiedenen Inkubationsschritten. Dabei werden die Filtereinsätze aus der jeweiligen Suspension in der 24-Well Kulturplatte entnommen und auf Zellstoff aufgesetzt, sodass die Flüssigkeit im Filtereinsatz durch die Membran abgesogen wurde. Dabei sollte zügig gearbeitet werden, damit die Sphären zwischen den Inkubationszeiten nicht trocken gelegt werden. Zu Beginn erfolgte die Fixierung der Sphären mit 4 % PFA. Zur Reduktion unspezifischer Bindungsstellen folgte die Inkubation mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine) und Spülung mit 0,2 % Triton X-100 (in PBS). Für eine Kolo-kalisation der Stammzellmarker mit EdU wurde nun die Click-iT Reaktion gemäß Anleitung mit entsprechender Reaktionslösung durchgeführt. Auf eine lichtgeschützte Umgebung musste geachtet werden. Es folgte die Inkubation mit dem

Primärantikörper über Nacht bei + 4 °C, je nach immunhistochemischem Protokoll mit anti-Nestin-Antikörper (aus Maus), anti-Bmi1-Antikörper (aus Maus) oder anti-Jag1-Antikörper (aus Hase). Überschüssige Inkubationslösungen wurden mit 1x PBS abgespült. Die Inkubation mit Sekundärantikörper folgte für 60 Minuten, entsprechend der Primärantikörper mit anti-Maus Alexa 488 (aus Esel, für Bmi1 und Nestin) oder mit anti-Hase Alexa 488 (aus Esel, für Jag1). Im Anschluss an die Zellkernmarkierung mit DAPI mussten die Sphären auf Glasobjektträgern zur Auswertung fixiert werden. Dazu wurde die Membran mit aufliegenden, immunhistochemisch markierten Sphären mittels Biopsiestanze von oben aus dem Filtereinsatz gelöst. Die herausgestanzte Membran wurde anschließend so auf einen Glasobjektträger positioniert, dass die Sphären oben aufliegen und gut mit dem Eindeckmedium Fluor Safe und einem Deckgläschen bedeckt werden konnten. Die Objektträger wurden im Anschluss lichtgeschützt bei + 4 °C bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse gelagert. Das detaillierte Protokoll zur immunhistochemischen Markierung von Sphären findet sich im Kapitel 8.2.5.

2.10 Immunhistochemische Markierung von differenzierten Sphären

Die MACS-Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ wurden nach 5 DIV Sphärenbildungs-Assay immunhistochemisch auf ihren Stammzellcharakter analysiert. Neben der MACS-Sortierung distinkter Stützzellpopulationen unterschiedlicher Markerexpression ($p75^{NTR}$, $GLAST$) sollten nach Sphärenbildungs-Assay verschiedene Stammzellpopulationen angereichert werden, die über unterschiedliches Potenzial zur Haar- und Stützzellregeneration *in vitro* verfügten. Um das *in vitro* Differenzierungsverhalten von Sphären untersuchen zu können, wurden die Sphären im Differenzierungs-Assay auf Poly-(L)-Ornithin / Fibronectin-beschichteten Glasobjektträger (8-Kammer-Objektträger) verteilt und im Wachstumsfaktor-freien Kulturmedium für 14 DIV bei 37°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen adhärten die Sphären auf dem beschichteten Glasobjektträger und bildeten differenzierte, epitheliale Zellverbände (Patches,

differenzierte Sphären) aus, die am DIV 14 immunhistochemisch mit geeigneten Differenzierungsmarkern markiert wurden, um das Differenzierungspotenzial der jeweiligen Sphärenfraktion in Haar- und Stützzell-ähnliche Zellen des Corti'schen Organs qualitativ untersuchen zu können. Differenzierte Sphären, die aus $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ MACS-sortierten Zellen hervorgegangen sind, wurden dazu am DIV 14 aus dem Inkubationsschrank entnommen und innerhalb der 8-Kammer Objektträger (8-Chamber Slides) mit PFA 4 % fixiert. Um dabei besonders vorsichtig vorzugehen, wurde das Kulturmedium in zwei Schritten mit jeweils 200 mL PFA 4 % ausgetauscht. Für die immunhistochemische Markierung wurden analog zur immunhistochemischen Markierung von Kryoschnitten der murinen Cochlea benötigte Pufferlösungen in entsprechender Menge vorbereitet. Bei allen nachfolgenden Schritten der Markierung verblieben die differenzierten, adhärenen Sphären (Patches) in den Kulturkammern auf dem Objektträger. Inkubationslösungen wurden ausgetauscht, indem Objektträger und Kammern leicht gekippt und die Flüssigkeit vorsichtig von einer Ecke der Kammer abgesaugt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Patches zu keiner Zeit trocken gelegt werden. Nach Fixierung erfolgen Spülschritte mit 1x PBS sowie die Inkubation mit einem Blockierungspuffer (Zusammensetzung gemäß Kapitel 8.1). Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgt für 60 Minuten, entsprechend des Protokolls mit anti-S100 aus dem Hasen, anti-E-Cadherin aus der Ratte, anti-MyosinVIIa aus dem Hasen oder anti-Sox2 aus dem Esel. Nach einem Spülungsschritt mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mit entsprechendem Sekundärantikörper für weitere 60 Minuten, entsprechend des Protokolls mit anti-Hasen Alexa 546 aus dem Esel, anti-Ratte Alexa 594 aus dem Esel, anti-Hasen Alexa 488 aus dem Esel sowie anti-Ziege Alexa 594 aus dem Esel. Die Markierung mit dem funktionellen Haarzellmarker FM1-43 erfolgte auf Eis vor Fixierung mit PFA 4 %. Die FM1-43FX-Lösung wurde dabei mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ angesetzt. Nach einer Inkubation von exakt 1 Minute folgte die Fixierung mit PFA 4 % für 10 Minuten auf Eis. Die nachfolgenden Schritte zur Kolokalisation von FM1-43 mit MyosinVIIa wurden wie üblich bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach weiteren Spülschritten und

der Zellkernmarkierung mit DAPI wurden die Kammerbegrenzungen jeweils vom Objektträger entfernt. Nach ausreichender Bedeckung mit dem Eindeckmedium Fluor Safe wurden die Objektträger mit einem Eindeckgläschen belegt und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse lichtgeschützt bei + 4 °C gelagert. Die detaillierten Protokolle zur immunhistochemischen Markierung von differenzierten Sphären finden sich in Kapitel 8.2.7.

Neben dem qualitativen Nachweis einer *in vitro* Zelldifferenzierung im Sinne einer Stütz- und Haarzellregeneration im Sphärenbildungs- und Differenzierungs-Assay mussten die *in vitro* differenzierten Haar- und Stützzellen quantitativ analysiert werden, um Aussagen über die Effizienz von MACS-Sortierung und anschließender Kultivierung machen zu können. Dazu wurden differenzierte Sphären (Patches), die nach insgesamt 19 DIV aus unsortierten Zellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5) und aus p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ MACS-sortierten Zellen hervorgegangen sind, mit den Primärantikörpern anti-MyosinVIIa und anti-Sox2 sowie den Sekundärantikörpern anti-IgG Hase Alexa 488 bzw. mit anti-IgG Esel Alexa 594 und DAPI markiert. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte durch systematische Auszählung aller Patches eines Versuchsansatzes (n=3) mit Quantifizierung der MyosinVIIa⁺ (Haarzell-ähnlichen) und Sox2⁺ (Stützzell-ähnlichen) Zellen innerhalb der Patches.

2.11 Mikroskopische Analyse

Immunhistochemische Markierungen von Sphären und differenzierten Sphären (Abb. 12, 13, 18) wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 aufgenommen und im Programm Zeiss Axiovision bearbeitet. Zur Quantifizierung der Sphären und positiv markierten Zellen erfolgte zusätzlich eine systematische Zählung mittels Handzähler unter Ausschluss von Zellaggregaten und Einzelzellen. Das zu analysierende Feld, das bei markierten Sphären der ausgestanzten Membran des Filterkörperchens und bei differenzierten Sphären einem Well einer 8-Well Kulturplatte entspricht, wurde

in der festgelegten Laufrichtung von links oben nach rechts unten mäandrisch abgesucht. Bei dieser schematischen Analyse musste darauf geachtet werden, dass sich die Zählspuren jeweils überlappen, sodass kein Zählereignis vergessen, gleichzeitig aber eine zweifache Zählung desselben Zählereignisses vermieden wird. Die Zellzahl von besonders großen Patches mit mehreren 100 Zellen wurde nach Auszählung eines kleinen Bereichs des Patches abgeschätzt. Die konfokalen Aufnahmen von Kryoschnitten des Corti'schen Organs der Maus (Abb. 8) sowie von differenzierten Sphären (Abb. 21A) wurden mit dem LSM-Axioplan 2 (Zeiss cLSM 519 Meta, Zeiss – LSM Pascal 5) aufgenommen und im Programm ZEN 2011 bearbeitet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Einzelzellen und Sphären wurden am inversen Mikroskop (Axiovert 100 M) mit einer verbundenen Kamera aufgenommen (Abb. 1B, 10A-H).

2.12 Programme

Die Erfassung, Speicherung und Bearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit den Programmen Axiovision und ZEN 2011. Das Programm BD FACSDiVa wurde von Frau Grimmel zur Auswertung der Analysen und Sortierungen mittels FACS verwendet. Die Voreinstellungen wurden wie in beschrieben mit Frau Grimmel besprochen und vor Messbeginn eingestellt. Die Messergebnisse wurden im Anschluss vom FACS-Gerät automatisiert als Gesamtübersicht gespeichert und von Frau Grimmel als PDF-Datei versendet. Microsoft Excel wurde zum Sammeln der Rohdaten verwendet. Dabei war die Funktion des Pivottable hilfreich, um die verschiedenen Versuchsansätze zu sortieren und bei Bedarf gezielt auszuwählen. Die Berechnungen des prozentualen Anteils an MyosinVIIa⁺ oder Sox2⁺ Zellen in einer Zellfraktion sowie die absolute Zellausbeute erfolgten ebenfalls in Microsoft Excel (Microsoft® Excel für Mac 2011, Version 14.5.9). Die statistische Analyse der gesammelten Rohdaten aller Versuchsansätze erfolgte mit Graphpad Prism 6 (Prism 6, Version 6.0c). Schematische Abbildungen wurden in Adobe Illustrator (Adobe® Illustrator® CC, Version 17.0.0) erstellt. Abbildung 8C wurde dabei

nach einer Vorlage von Andreas Eckhard modifiziert. Schematische Abbildungen, Diagramme und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden anschließend in Adobe Indesign (Adobe® InDesign® CC, Version 9.0) zu komplexeren Abbildungskompositionen zusammengestellt. Die Ausarbeitung des Manuskriptes erfolgte mit Microsoft Word (Microsoft® Word für Mac 2011, Version 14.5.9). Dabei wurde Endnote X7.2 zur Erstellung des Literaturverzeichnisses verwendet.

2.13 Statistische Datenauswertung

Da der Bartle's Test bei den MACS Zellfraktionen (Abb. 9E) sowie bei der Auswertung der Sphärenbildungskapazität nach MACS-Sortierung (Abb. 10I, 10J) vermutlich auch wegen der teils zu geringen Versuchswiederholungen signifikant ausgefallen war, konnte zunächst von keiner Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden. Daher wurde zur statistischen Auswertung der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test gewählt. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Bei der Analyse $p75^{NTR+}$ Zellen nach MACS-Sortierung war $p = 0,0009$, bei der Analyse $GLAST^+$ Zellen war $p = 0,0004$ (Abb. 9E). Die Auswertung der MACS-sortierten Sphären (Abb. 10I) pro Kultivierungseinheit ergaben p -Werte von $p < 0,0001$ (Gesamtanzahl der Sphären, (s+t)-Sphären) und $p = 0,0008$ ((h)-Sphären), die Auswertung der MACS-sortierten Sphären pro Corti'sches Organ (Abb. 10J) ergaben p -Werte von $p < 0,0001$ (Gesamtanzahl der Sphären, (s+t)-Sphären) und $p = 0,0001$ ((h)-Sphären). Der Mann-Whitney Test (two-tailed) wurde zur statistischen Analyse von differenzierten Sphären ohne und nach Inhibition des Notch-Signalwegs angewendet und ergab signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ (Abb. 20 und 21B). Mit Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden die dazugehörigen Diagramme ebenfalls in Graphpad Prism 6 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierte Stützzellpopulationen zur Stammzellanreicherung

3.1.1 Immunhistochemische Darstellung der Stützzellpopulationen

Unterschiedliche Expressionsmuster wurden hier mit den Antikörpern anti-p75^{NTR} (aus Hase) und anti-GLAST (aus Maus) immunhistochemisch an Kryoschnitten des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p4) untersucht. Mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie ließ sich die Markerexpression in Kolokalisation mit dem Haarzellmarker Calretinin (Abb. 8A-B, weiß) darstellen. Der Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} (Abb. 8B, grün) konnte dabei immunhistochemisch in der äußeren Pillarzelle (Abb. 8C, ÄPZ), den Deiterszellen (Abb. 8C, DZ) und den Hensenzellen (Abb. 8C, HZ) nahe der äußeren Haarsinneszellen (Abb. 8C, ÄHZ) nachgewiesen werden. In Abbildung 8A wird die Expression von GLAST (Abb. 8A, rot) in der inneren Phalangenzelle (Abb. 8C, IPhZ), die die innere Haarzelle umschließt (Abb. 8C, IHZ), ebenso in den Fibroblasten des großen epithelialen Wulstes (Abb. 8C, GER, greater epithelial ridge) dargestellt. Dargestellt sind ebenfalls der kleine epitheliale Wulst (Abb. 8C, LER, lower epithelial ridge), die submembrane Zone (Abb. 8C, SMZ), die Basalmembran (Abb. 8C, BM) sowie die Tektorialmembran (Abb. 8C, TM). Das Expressionsmuster der beiden Marker ist schematisch in Abbildung 8C zusammengefasst.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass spezifische, nicht überlappende Expressionsmuster der CD-Marker GLAST und p75^{NTR} in distinkten Stützzellsubpopulationen des Corti'schen Organs der Maus identifiziert werden konnten. Beide CD-Moleküle sollten anschließend dazu genutzt werden, GLAST- und p75^{NTR}-exprimierende Stützzellen mit Stammzeleigenschaften aus dissoziierten Zellen des Corti'schen Organs der Maus zu selektieren.

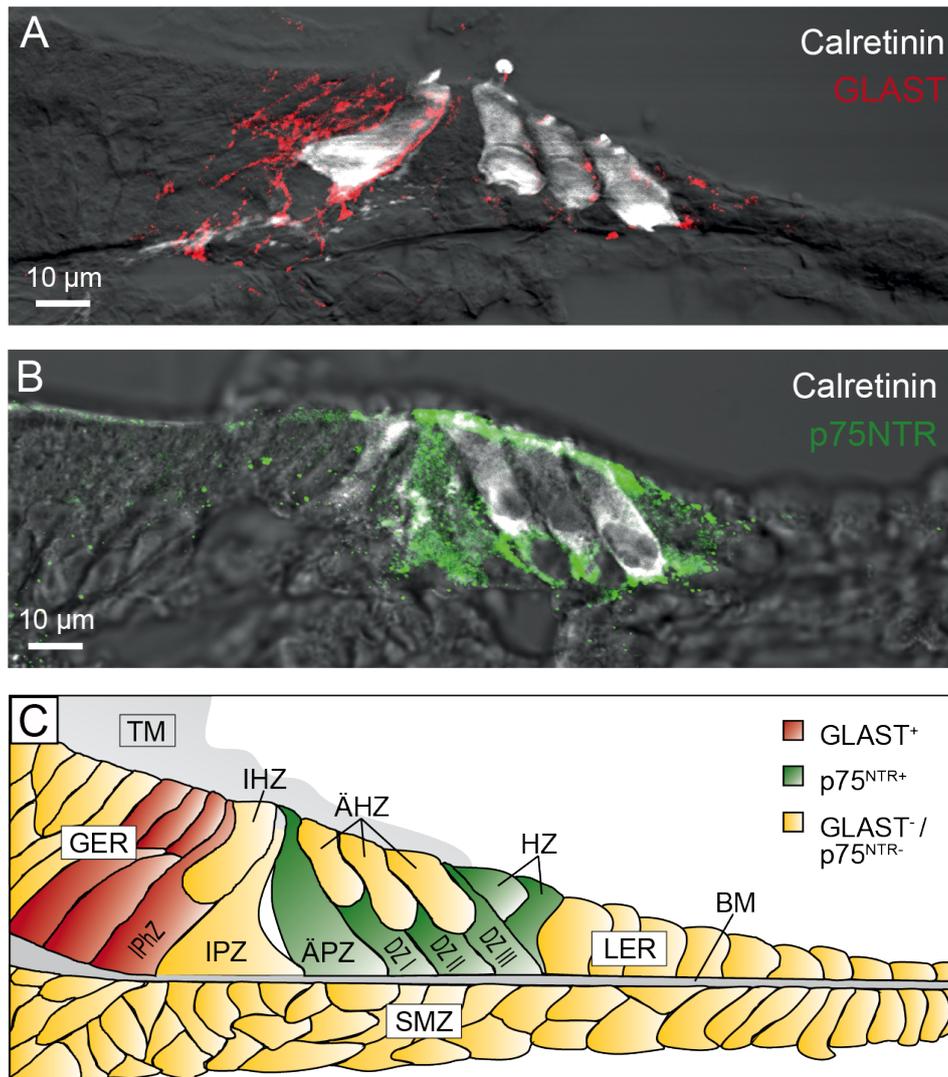


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis der membranständigen CD-Oberflächenmarker GLAST und p75^{NTR} im immaturren Corti'schen Organ der Maus. (A) Konfokale (cLSM) Aufnahmen der immunhistochemischen Kolokalisation von p75^{NTR} und Calretinin sowie (B) GLAST und Calretinin in Kryoschnitten des Corti'schen Organs der Maus im postnatalen Altersstadium p4. Erkennbar ist die differenzielle Expression von p75^{NTR} in den äußeren Pillarzelle (ÄPZ), Deiterszellen (DZ I-III) und Hensenzellen (HZ) sowie die Expression von GLAST in der inneren Phalangenzelle (IPH) und in Fibroblasten des großen epithelialen Wulstes (GER). (C) Schematische Darstellung des Expressionsprofils von p75^{NTR} (grün) und GLAST (rot) sowie negativ markierter Zellen (gelb) mit Benennung der inneren Pillarzelle (IPZ), der inneren Haarsinneszelle (IHZ), der äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ), des kleinen epithelialen Wulstes (LER), der submembranen Zone (SMZ), der Basalmembran (BM) und der Tektorialmembran (TM). ((A-B) Maßstabsbalken=10 µm).

3.1.2 Einzelzellsuspension als zelluläres Ausgangsmaterial

Pro Corti'sches Organ der Maus (p3-5) konnten in der dissoziierten Einzelzellsuspension (Abb. 1B) durchschnittlich $51047,6 \pm 8528$ ($n=20$ Versuchsansätze mit insgesamt 1952 Corti'schen Organen) Zellen gewonnen werden (Zellausbeute vor Sortierung als Kontrollfraktion)

3.2 Identifizierung einer Stammzellpopulation mittels MACS

3.2.1 Isolierung von $p75^{NTR}$ und GLAST markierten Zellen mittels MACS

Die Anteile positiv- und negativ-markierter Zellen der MACS-Stützzellfraktionen $p75^{NTR+}$ (Abb. 9B), $GLAST^+$ (Abb. 9C) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (Abb. 9D) sind in entsprechender Farbe in den Quadranten des jeweiligen Punktwolkendiagramms eingetragen. In Abbildung 9E sind die relativen Anteile $p75^{NTR+}$ und $GLAST^+$ Zellen (in % von Gate P1) aller drei MACS-Zellfraktionen durchschnittlich aus 7 unabhängigen Versuchsansätzen als Balkendiagramm zusammengefasst und im Vergleich mit unsortierten anti- $p75^{NTR}$ und anti-GLAST-markierten Zellen des Corti'schen Organs der Maus (Kontrollzellen, p3-5) aufgetragen. Nach MACS-Sortierung betrug der Anteil $p75^{NTR+}$ Zellen in der $p75^{NTR+}$ Fraktion (Abb. 9B, Q4) $2,6 \pm 1,3$ % ($n=7$), welcher sich signifikant von der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion (Abb. 9D, Q4) mit $0,3 \pm 0,2$ % ($n=7$) unterschied (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = 0,009$). Der Anteil $p75^{NTR+}$ Zellen in Kontrollzellen ohne Sortierung (Abb. 4B, Q4) lag bei $4,5 \pm 0,5$ % ($n=2$) und unterschied sich signifikant von dem Anteil $p75^{NTR+}$ Zellen der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = 0,009$). Im ähnlichen Bereich lag der Anteil $p75^{NTR+}$ Zellen in der $GLAST^+$ Zellfraktion (Abb. 9C, Q4) mit $0,5 \pm 0,4$ % ($n=7$). Der Anteil $GLAST^+$ Zellen lag nach MACS-Sortierung in der $GLAST^+$ Zellfraktion (Abb. 9C, Q1) bei $18,4 \pm 8,3$ % ($n=7$). Während der Anteil $GLAST^+$ Zellen in Kontrollzellen ohne Sortierung (Abb. 4C, Q1) mit $19,3 \pm 3,0$ % ($n=2$) im ähnlichen Bereich lag, war der Anteil $GLAST^+$ Zellen in der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion (Abb. 9D, Q1) auf $1,3 \pm 0,7$ % ($n=7$) reduziert.

Hochsignifikant unterschied sich der Anteil $GLAST^+$ Zellen der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion (Abb. 9B, Q1) mit $0,2 \pm 0,4$ ($n=7$) von der $GLAST^+$ Zellfraktion (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = 0,0004$).

Zusätzlich wurde berechnet, wie viele MACS-sortierte Zellen (durchschnittlich aus 7 unabhängigen MACS-Versuchsansätzen) aus einem Corti'schen Organ der immaturen Maus gewonnen werden konnte. Das Balkendiagramm in Abbildung 9F stellt die absolute Zellausbeute nach MACS-Sortierung vergleichend zu unsortierten Kontrollzellen des Corti'schen Organs dar. Während vor MACS-Sortierung aus einem immaturen Corti'schen Organ der Maus (p3-5) durchschnittlich $51047,6 \pm 8528$ ($n=20$, Abb. 9F, grau) Zellen gewonnen werden konnte, reduzierte sich die absolut gewonnene Zellzahl pro Corti'sches Organ der postnatalen Maus nach MACS-Sortierung auf $1233,8 \pm 649,1$ ($n=7$, Abb. 9F, grün) in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, auf $8248,6 \pm 4001,0$ ($n=7$, Abb. 9F, rot) in der $GLAST^+$ Zellfraktion und auf $45822,8 \pm 10374,8$ ($n=7$, Abb. 9F, gelb) in der $p75^{NTR-} / GLAST^-$ Zellfraktion. Dies entsprach einem prozentualen Zellverlust von 97,6 % in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, von 83,8 % in der $GLAST^+$ Zellfraktion und von 10,2 % in der $p75^{NTR-} / GLAST^-$ Zellfraktion gegenüber unsortierten Zellen des Corti'schen Organs der immaturen Maus (Abb. 9F). Die Summe aus der gemittelten Zellausbeute pro Corti'sches Organ der drei MACS-Zellfraktionen unterschied sich nicht von der unsortierten Kontrolle.

Zusammenfassend konnten mit der MACS-Zellsortierung Stützzellpopulationen gewonnen werden, in denen eine Depletion des jeweils anderen Marker erreicht wurde. Es war möglich, positiv-markierte Zellen innerhalb der MACS-Zellfraktionen anzureichern. Eine Erhöhung des prozentualen Anteils positiv-markierter Zellen im Vergleich zur unsortierten Primärkultur konnte nicht erreicht werden. Die errechnete Zellausbeute pro Corti'sches Organ ergab, dass eine vergleichbare Zellzahl ohne und mit MACS-Verfahren gewonnen werden konnte.

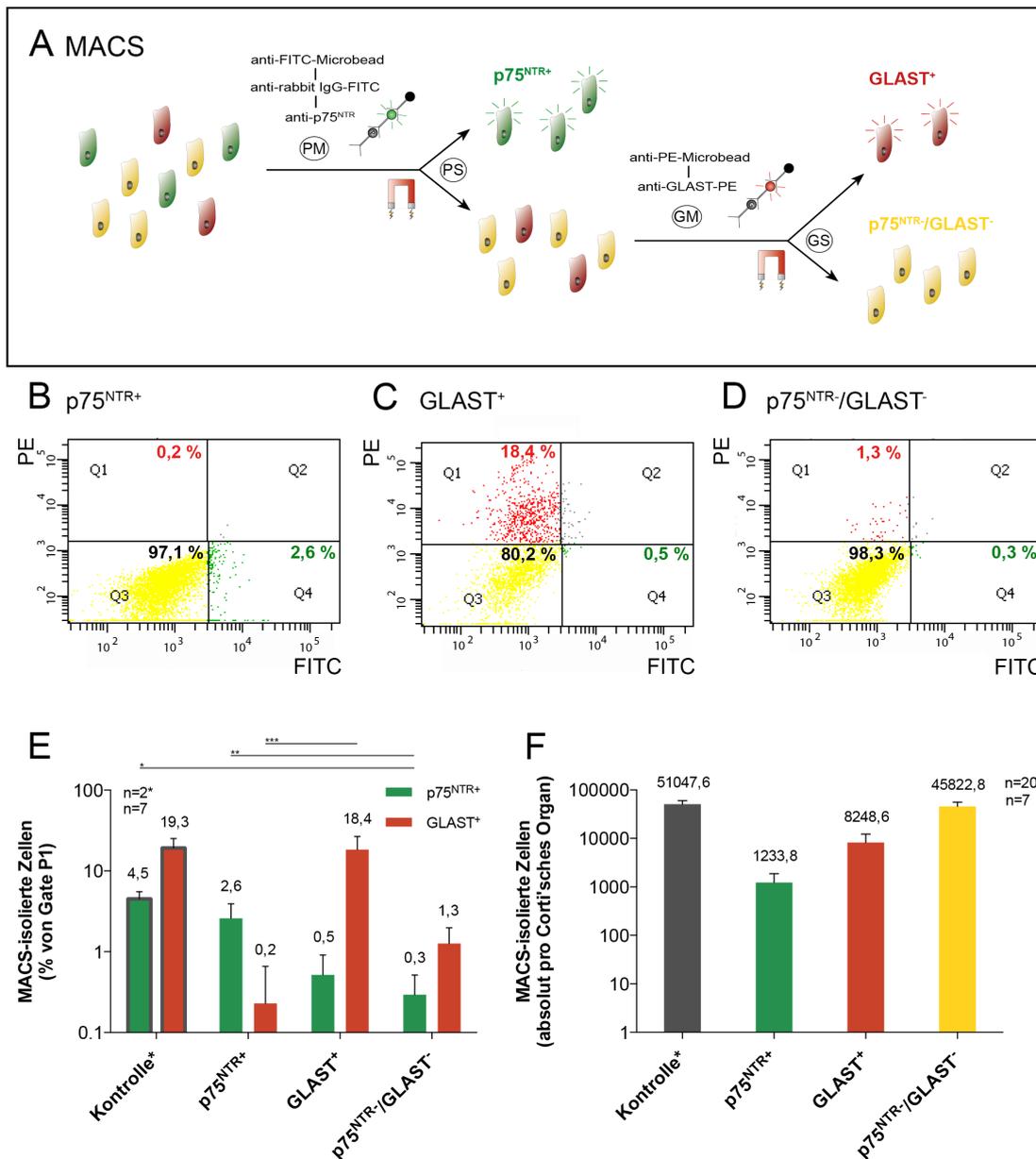


Abbildung 9: Anreicherung von p75^{NTR+} und GLAST⁺ markierten Zellen des postmortalen Corti'schen Organs der Maus mittels MACS. (A) Schematische Darstellung der Zellmarkierung mit anti-p75^{NTR}-IgG-FITC-Microbead (PM), der MACS-Zellsortierung nach p75^{NTR} (PS), der Zellmarkierung mit anti-GLAST-PE-Microbead (GM) und der MACS-Zellsortierung nach GLAST (GS) in chronologischer Abfolge zur Gewinnung der MACS-Zellfraktionen p75^{NTR+} (grün), GLAST⁺ (rot) und p75^{NTR-}/GLAST⁻ (gelb). (B-D) Durchflusszytometrische Analyse der MACS-sortierten (B) p75^{NTR+}, (C) GLAST⁺ und (D) p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellfraktionen mit (E) Darstellung des prozentualen Anteils p75^{NTR+} (grün) und GLAST⁺ (rot) Zellen sowie (F) Errechnung der absoluten Zellausbeute pro Corti'sches Organ für die MACS-Zellfraktionen p75^{NTR+} (grün), GLAST⁺ (rot) und p75^{NTR-}/GLAST⁻ (gelb) pro Corti'sches Organ, jeweils verglichen mit einer unsortierten Kontrollpopulation (grau).

3.2.2 Sphärenbildungskapazität von MACS-sortierten Zellen

Im Sphärenbildungs-Assay konnte aus otischen Progenitorzellen der drei MACS-sortierten Zellfraktionen $p75^{NTR+}$ (Abb. 10A, 10I, 10J, grün), $GLAST^+$ (Abb. 10B, 10I, 10J, rot) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellen (Abb. 10C, 10I, 10J, gelb) wie auch aus Kontrollzellen (Abb. 10I, grau) des immaturren Corti'schen Organs der Maus Sphären (Abb. 10A-C, gefüllte Pfeilspitzen) generiert werden. Die mikroskopische Quantifizierung ist unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien der (s+t)-Sphären (Abb. 10I, (s+t), mittlere Farbintensität, mittig) und (h)-Sphären (Abb. 10I, (h)-Sphären, geringe Farbintensität, rechts) mit der Gesamtanzahl der Sphären (Abb. 10I, (alle), hohe Farbintensität, links) in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 10I). Die Auswertung der Gesamt-Sphärenanzahl (Abb. 10I, alle) pro 900 kultivierte Einzelzellen zeigte, dass die Sphärenbildungskapazität von $18,9 \pm 7,9$ ($n=11$) Sphären unsortierter Zellen in den MACS-Zellfraktionen auf $131,7 \pm 71,6$ ($n=7$) Sphären in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, auf $159,4 \pm 41,1$ ($n=7$) Sphären in der $GLAST^+$ Zellfraktion und auf $97,2 \pm 45,9$ ($n=7$) Sphären in der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion angestiegen ist. Die Erhöhung der Sphärenbildungskapazität (s+t+h) war dabei in allen MACS-Gruppen signifikant und in der $GLAST^+$ Zellfraktion hochsignifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = < 0,0001$). Die Anzahl an (s+t)-Sphären (Abb. 10I, (s+t)) erhöhte sich von $16,6 \pm 7,5$ Sphären (unsortiert, $n=11$) auf $98,0 \pm 45,5$ ($n=7$) in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, auf $121,6 \pm 39,9$ ($n=7$) in der $GLAST^+$ Zellfraktion und auf $70,1 \pm 26,5$ ($n=7$) Sphären in der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion. In allen MACS-sortierten Fraktionen war der Anstieg von (s+t)-Sphären signifikant, in der $GLAST^+$ Zellfraktion hochsignifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = < 0,0001$). Auch die Generierung von (h)-Sphären (Abb. 10I, (h)) stieg von $2,1 \pm 1,2$ (unsortiert, $n=11$) Sphären in der Kontrollgruppe auf $33,8 \pm 37,0$ ($n=7$) in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, auf $37,8 \pm 15,3$ ($n=7$) in der $GLAST^+$ Zellfraktion und auf $27,2 \pm 23,3$ ($n=7$) Sphären in der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion. Der Anstieg von (h)-Sphären war signifikant in allen MACS-Zellfraktionen, in der $GLAST^+$ Zellfraktion dabei hochsignifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = 0,0008$). Insgesamt konnte die Gesamtanzahl der Sphären im Vergleich zu unsortierten Kontrollzellen pro

Kultivierungseinheit auf das 7-Fache ($p75^{NTR+}$ Zellfraktion), auf das 8,4-Fache ($GLAST^+$ Zellfraktion) und auf das 5,1-Fache ($p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion) erhöht werden. Die Anzahl der (s+t)-Sphären stieg pro Kultivierungseinheit um das 5,9-Fache ($p75^{NTR+}$ Zellfraktion), um das 7,3-Fache ($GLAST^+$ Zellfraktion) und um das 4,2-Fache ($p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion). Die Anzahl der (h)-Sphären stieg pro Kultivierungseinheit um das 16,1-Fache ($p75^{NTR+}$ Zellfraktion), um das 18,0-Fache ($GLAST^+$ Zellfraktion) und um das 13,0-Fache ($p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion).

Um die relative Sphärenbildungskapazität MACS-sortierter Zellen beurteilen zu können, wurde die *in vitro* generierte Sphärenanzahl pro Corti'sches Organ berechnet und in Abbildung 10J mit Sphären unsortierter Kontrollzellen verglichen. Aus einem Corti'schen Organ der immaturen Maus gingen ohne Sortierung $51047,6 \pm 8749,5$ ($n=20$) Zellen hervor, aus denen insgesamt $1036,8 \pm 519,2$ ($n=11$) Sphären, davon $904,4 \pm 468,4$ ($n=11$) (s+t)-Sphären und $120,2 \pm 74,6$ ($n=11$) (h)-Sphären, hervorgingen. Im Vergleich dazu konnte die Sphärenbildungskapazität in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion nicht erhöht werden. Pro Corti'sches Organ konnten in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion insgesamt $180,6 \pm 98,1$ ($n=7$) Sphären, davon $134,3 \pm 62,4$ ($n=7$) (s+t)-Sphären und $46,3 \pm 50,7$ ($n=7$) (h)-Sphären gewonnen werden. In den beiden anderen MACS-sortierten Zellfraktionen konnte dagegen auch die relative Sphärenbildungskapazität pro eingesetztes Corti'sches Organ erhöht werden. In der $GLAST^+$ Zellfraktion konnte die Sphärenanzahl auf insgesamt $1460,9 \pm 376,9$ ($n=7$) Sphären, davon $1114,9 \pm 366,0$ ($n=7$) (s+t)-Sphären und $346,0 \pm 140,6$ ($n=7$) (h)-Sphären, signifikant angehoben werden (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = < 0,0001$ bei Sphären insgesamt und (s+t)-Sphären, $p = 0,0001$ bei (h)-Sphären). In der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion stieg die Sphärenanzahl hochsignifikant auf insgesamt $4950,8 \pm 2335,3$ ($n=7$) Sphären an, davon waren $3567,9 \pm 1348,1$ ($n=7$) (s+t)-Sphären und $1382, \pm 1188,1$ ($n=7$) (h)-Sphären (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test, $p = < 0,0001$ bei Sphären insgesamt und (s+t), $p = 0,0001$ bei (h)-Sphären).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus MACS-sortierten Zellen im Sphärenbildungs-Assay Sphären gewonnen und unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien quantifiziert werden konnten. Innerhalb einer Kultivierungseinheit von 900 Zellen (entspricht einem Well einer 96-Well Platte) konnte die Sphärenbildungskapazität signifikant bis hochsignifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test) in allen drei MACS-sortierten Zellfraktionen gegenüber Kontrollzellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus gesteigert werden. Pro Corti'sches Organ konnte die Sphärenanzahl in der GLAST⁺ Zellfraktion signifikant und in der p75^{NTR}/GLAST⁻ hochsignifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test) erhöht werden.

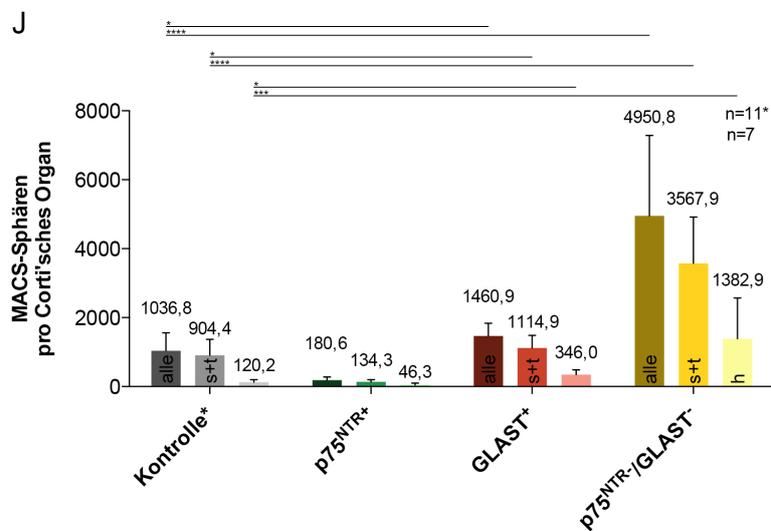
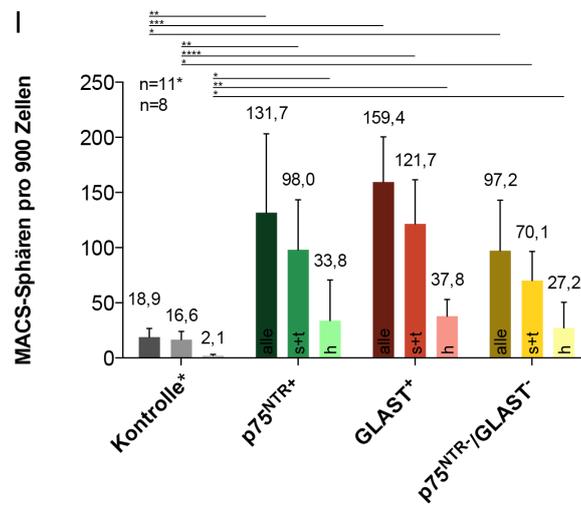
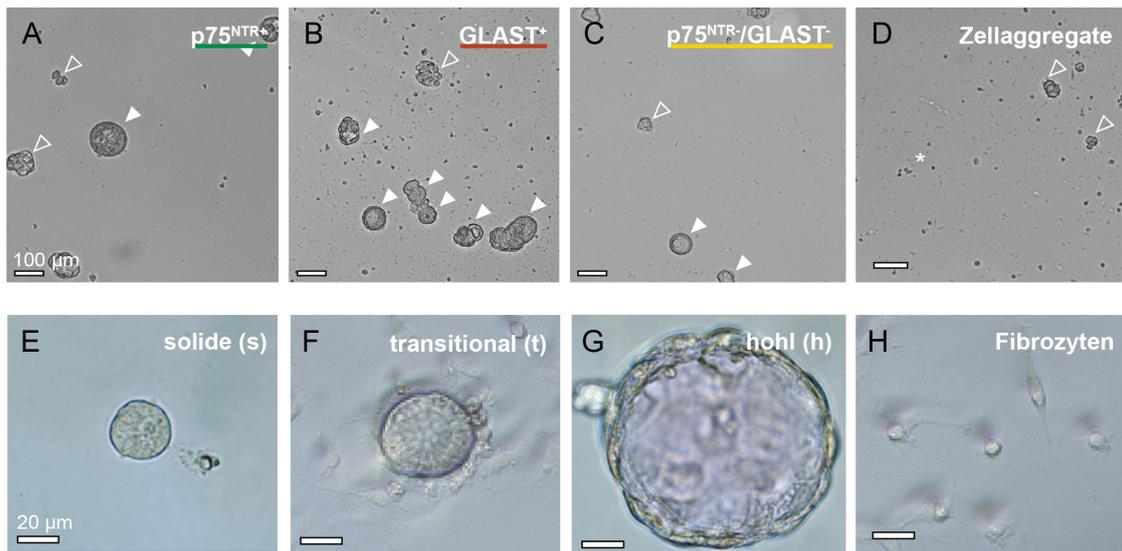


Abbildung 10: Morphologische und quantitative Analyse der Sphärenbildungskapazität von MACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus. (A-C) Lichtmikroskopische Kontrastaufnahmen von Sphären (gefüllte Pfeilspitzen), die im *in vitro* Sphärenbildungs-Assay aus (A) MACS-sortierten $p75^{NTR+}$ (grün), (B) $GLAST^+$ (rot) und (C) $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (gelb) Zellen hervorgegangen sind. (E-G) Morphologische Einteilung der Sphären in (E) solide (s), (F) transitionale (t) und (G) hohle (h) Sphären in Abgrenzung zu (D) Zellaggregaten (weiß umrandete Pfeilspitzen). (I-J) vergleichende Quantifizierung der Sphärenanzahl (I) pro 900 kultivierte Zellen und (J) pro Corti'sches Organ der MACS-sortierten Zellfraktionen $p75^{NTR+}$ (grün), $GLAST^+$ (rot) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (gelb), jeweils im Vergleich mit unsortierten Kontrollsphären (grau). ((A-D) Maßstabsbalken = 100 μ m, (E-H) Maßstabsbalken = 20 μ m).

3.2.3 Proliferationspotenzial von Sphären aus MACS-sortierten Zellen

Nach Sphärenbildungs-Assay wurden in Sphären aller MACS-sortierten Zellfraktionen EdU-inkorporierte (EdU^+) Zellen nachgewiesen. Für die MACS-sortierten Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ sind in Abbildung 12 exemplarisch Sphären als Epifluoreszenzaufnahmen dargestellt, in denen der Zellkernmarker DAPI (Abb. 12, blau, 4',6-Diamidino-2-phenylindol) mit EdU (Abb. 12, rot) kolokalisiert werden konnte (Abb. 12, Merge). Eine Quantifizierung der EdU^+ Zellen innerhalb einer Sphäre erfolgte am DIV 5 nach immunhistochemischer Markierung. Der relative Anteil EdU^+ von $DAPI^+$ Zellen in Sphären ist in einem Balkendiagramm (Abb. 11) für die MACS-Zellfraktionen $p75^{NTR+}$ (Abb. 11, grün), $GLAST^+$ (Abb. 11, rot) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (Abb. 11, gelb) im Vergleich zu Sphären aus Kontrollzellen (Abb. 11, grau) dargestellt. Sphären, die aus unsortierten Zellen des Corti'schen Organs (Kontrollsphären) hervorgegangen sind, enthielten zu einem Anteil von 76,3 % EdU -inkorporierte Zellen. Für Sphären aus MACS-sortierten Zellen konnten EdU^+ Zellanteile von 73,9 % für die $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, 77,8 % für die $GLAST^+$ Zellfraktion und 74,4 % für die $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Fraktion identifiziert werden.

Zusammenfassend konnte im EdU-Assay eine EdU-Inkorporation von durchschnittlich 75,4 % in Sphären von MACS-sortierten $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellen nach dem Sphärenbildungs-Assay nachgewiesen werden. Diese war im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht erhöht.

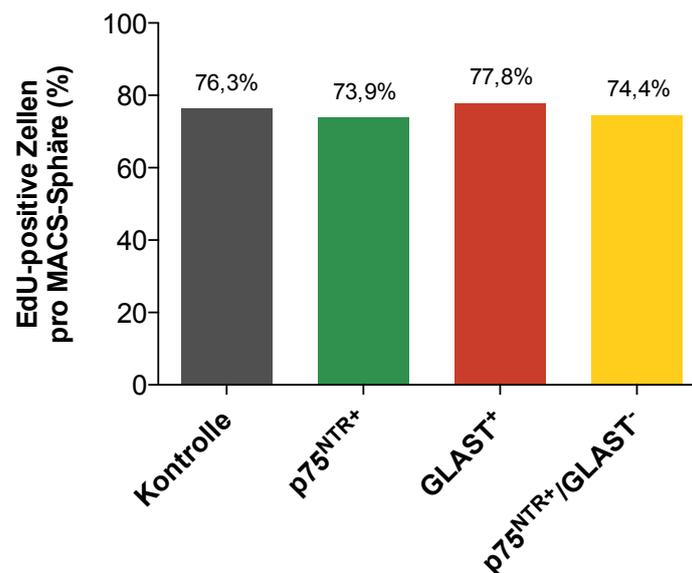


Abbildung 11: Analyse der Sphärenbildung infolge mitotischer Zellteilung von MACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus mittels EdU-Assay. Quantitativer Vergleich des prozentualen Anteils EdU⁺ Zellen von DAPI⁺ Zellen innerhalb von Sphären, die aus unsortierten Zellen (grau) des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5) und aus FACS-sortierten p75^{NTR+} (grün), GLAST⁺ (rot) und p75^{NTR+}/GLAST⁻ (gelb) Zellen nach Sphärenbildungs-Assay *in vitro* generiert wurden (n=1).

3.2.4 Stammzellartigkeit von Sphären aus MACS-sortierten Zellen

In Abbildung 12 findet sich exemplarisch für jeden Stammzellmarker eine Epifluoreszenzaufnahme von Sphären, die während des *in vitro* Sphärenbildungs-Assays aus unsortierten Zellen (Abb. 12, erste Spalte) des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5, Kontrollzellen) und aus den MACS-sortierten Zellfraktionen p75^{NTR+} (Abb. 12, zweite Spalte), GLAST⁺ (Abb. 12, dritte Spalte) und p75^{NTR+}/GLAST⁻ (Abb. 12, vierte Spalte) generiert wurden. Die Aufnahmen werden in Kolokalisation mit dem Zellkernmarker DAPI (Abb. 12, blau, mit Durchlicht gezeigt) und dem Proliferationsmarker EdU (Abb. 12, rot) im einzelnen Fluoreszenzkanal und als kumuliertes Fluoreszenzbild von DAPI, EdU und Stammzellmarker (Abb. 12, Merge) dargestellt. Sowohl in Sphären unsortierter Zellen des Corti'schen Organs der Maus als auch in Sphären der MACS-sortierten Zellfraktionen konnten die Stammzellmarker Nestin (Abb. 12A, grün), Bmi1 (Abb. 12B, grün) und Jag1 (Abb. 12C, grün) identifiziert werden. Die zusätzliche Markierung mit EdU ergab einen positiven

Nachweis in Sphären aller drei MACS-sortierten Zellfraktionen sowie eine Kolokalisation, die sich teilweise mit dem positiven Nachweis der Stammzellmarker Nestin, Bmi1 und Jag1 deckte.

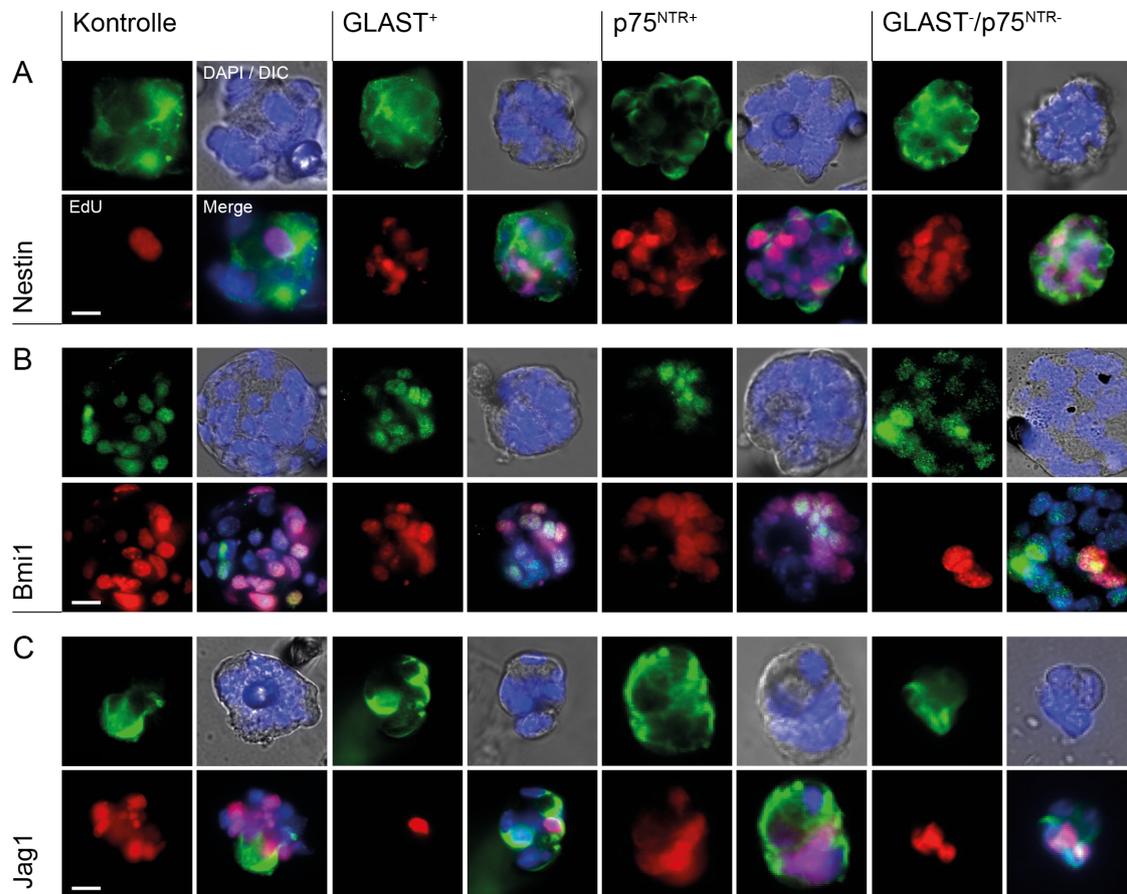


Abbildung 12: Qualitative Dokumentation der Stammzellartigkeit von *in vitro* generierten Sphären des postmortalen Corti'schen Organs der Maus nach MACS-Sortierung. (A-C) Epifluoreszenzaufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung von (A) Nestin (grün), (B) Bmi1 (grün) und (C) Jag1 (grün) in Sphären, die aus unsortierten Zellen des murinen Corti'schen Organs der Maus (p3-5, Kontrolle, erste Spalte) und MACS-sortierten Zellfraktionen p75^{NTR+} (zweite Spalte), GLAST⁺ (dritte Spalte) und p75^{NTR-}/GLAST⁻ (vierte Spalte) Zellen generiert wurden, jeweils in simultaner Markierung mit DAPI (blau und mit Durchlicht, DIC) und EdU (rot). ((A-C) Maßstabsbalken = 10 μ m).

Zusammenfassend wurde, neben der Proliferationsfähigkeit (EdU⁺) von Zellen innerhalb der Sphären, die Stammzellartigkeit der Sphären qualitativ untersucht. Dabei wurden die Stammzellmarker Bmi1, Jag1 und Nestin in den MACS-Zellfraktionen p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75⁻/GLAST⁻ sowie in einer

Kontrollzellfraktion durch immunhistochemische Markierung nachgewiesen. Teilweise wurde dabei eine Kolokalisation mit EdU festgestellt.

3.2.5 Differenzierungspotenzial von Sphären aus MACS-sortierten Zellen

Differenzierte Sphären, die aus $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ MACS-sortierten Zellen hervorgegangen sind, wurden am DIV 14 mit dem Haarzellmarker MyosinVIIa, den Stützzellmarkern Sox2 und S100 sowie dem Marker epithelialer Zellverbände E-Cadherin markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf positive Zellen innerhalb der differenzierten Sphären (Patches) untersucht. In Abbildung 13 ist für die MACS-Zellfraktionen $p75^{NTR+}$ (Abb. 13, linke Spalte), $GLAST^+$ (Abb. 13, mittlere Spalte) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (Abb. 13, rechte Spalte) jeweils exemplarisch ein differenzierter Patch dargestellt, der MyosinVIIa (Abb. 13A-B, grün), Sox2 (Abb. 13C, rot), S100 (Abb. 13D, rot) oder E-Cadherin (Abb. 13E, weiß) simultan zum Zellkernmarker DAPI (Abb. 13, blau) exprimiert. Zusätzlich zum immunhistochemischen Nachweis der genannten Differenzierungsmarker, wurden Patches aus $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellen mit dem funktionellen Haarzellmarker FM1-43 inkubiert, der durch mechano-elektrische Transduktionskanäle (MET-Kanäle) an der Stereozilien-besetzten Membran von Haarzellen aufgenommen wurde und kumuliert im Zytoplasma fluoreszenzmikroskopisch detektierbar war. In Patches aller MACS-Zellfraktionen konnten $MyosinVIIa^+$ Zellen nachgewiesen werden, die den Farbstoff FM1-43 als funktionellen Marker MET-exprimierender Haarzellen aufgenommen haben (Abb. 13B, rot).

Zusammenfassend konnte mit geeigneten Differenzierungsmarkern immunhistochemisch dokumentiert werden, dass in otischen Sphären der MACS-Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ der epitheliale Marker E-Cadherin, die Haarzellmarker MyosinVIIa, FM1-43 und die Stützzellmarker Sox2, S100 nachweisbar waren.

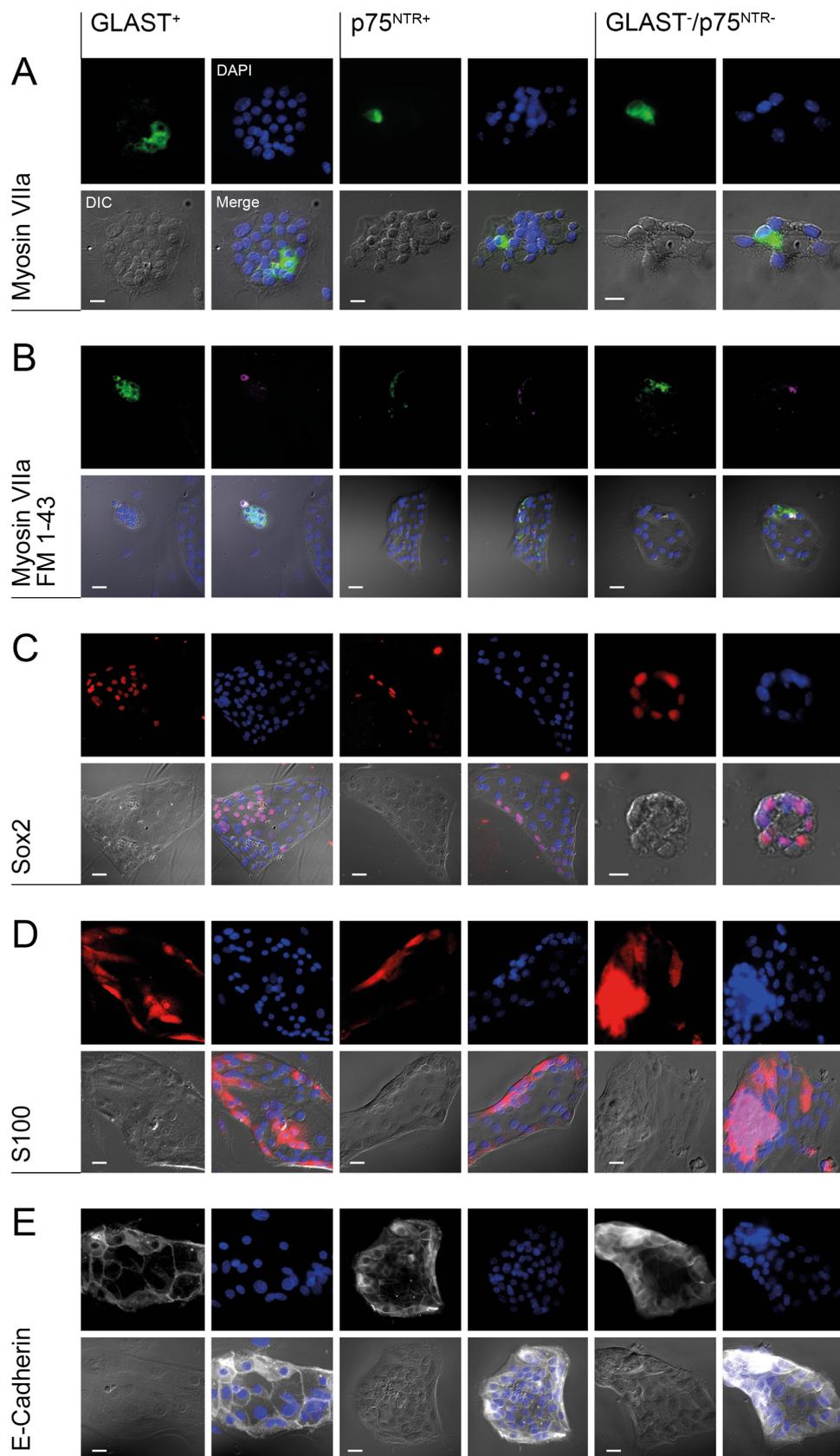


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von Differenzierungsmarkern in differenzierten Sphären des Corti'schen Organs der Maus nach MACS-Sortierung. (A-E) Epifluoreszenzaufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung von (A-B) MyosinVIIa (grün), (C) Sox2 (rot), (D) S100, (rot) und (E) E-Cadherin (weiß) sowie (B) fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Farbstoffs FM1-43 (rot) in differenzierten Sphären aus $p75^{NTR+}$ (erste Spalte), $GLAST^+$ (zweite Spalte) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (dritte Spalte) MACS-sortierter Zellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5), jeweils in simultaner Zellkernmarkierung mit DAPI (blau). ((A-E) Maßstabsbalken = 10 μ m).

Nach qualitativen Nachweis (Abb. 13) einer *in vitro* Zelldifferenzierung folgte ein quantitativer Nachweis durch systematische, fluoreszenzmikroskopische Auszählung aller Patches eines Versuchsansatzes (n=3) sowie der $MyosinVIIa^+$ (Haarzell-ähnlichen) und $Sox2^+$ (Stützzell-ähnlichen) Zellen innerhalb der Patches. In der Abbildung 14A sind $MyosinVIIa^+$ Zellen (grün), $Sox2^+$ Zellen (rot) sowie die Kolokalisation (Merge) exemplarisch an einem Patch und in simultaner Zellkernmarkierung mit DAPI (blau) dargestellt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind für differenzierte Sphären aus unsortierten Kontrollzellen des postmortalen Corti'schen Organs der Maus (p3-5) sowie aus Zellen der MACS-sortierten Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ als durchschnittlicher prozentualer Anteil $MyosinVIIa^+$ (Abb. 14B, schwarz) und $Sox2^+$ (Abb. 14B, grau) von $DAPI^+$ Zellen pro Patch als vergleichendes Balkendiagramm dargestellt. Insgesamt wurden pro Zellfraktion $147,3 \pm 85,8$ (n=3 je Zellfraktion) differenzierte Sphären mit insgesamt $7717,8 \pm 4964,0$ (n=3 je Zellfraktion) Zellen aus drei unabhängigen experimentellen Ansätzen in die quantitative Analyse aufgenommen. Der durchschnittliche Anteil $MyosinVIIa^+$ und $Sox2^+$ Zellen von allen gezählten $DAPI^+$ Zellkernen einer Zellfraktion wurde ermittelt und vergleichend mit differenzierten Sphären von Kontrollzellen (p3-5) dargestellt. Verglichen mit dem Anteil $MyosinVIIa^+$ Zellen von $2,1 \pm 1,0$ % (n=3, 258 Patches) in differenzierten Sphären aus Kontrollzellen konnte einzig ein tendenzieller Anstieg $MyosinVIIa^+$ Zellen in der für $GLAST^+$ MACS-Zellfraktion gezeigt werden, in der ein Anteil von $3,0 \pm 2,6$ % (n=3, 76 Patches) $MyosinVIIa^+$ Zellen quantifiziert werden konnte. In der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion wie auch in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion reduzierte sich die Anzahl $MyosinVIIa^+$ Zellen von $2,1 \pm 1,0$ % (Kontrollfraktion) auf $0,4 \pm 0,2$ % (n=3, 172 Patches) in der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion und auf $0,5 \pm 0,5$ % (n=3,

83 Patches) in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion. Verglichen mit der $p75^{NTR-}$ und $p75^{NTR+}/GLAST^-$ Zellfraktion war der Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen in der GLAST⁺ Zellfraktion auf das 6-fache erhöht. Aufgrund der streuenden Messwerte konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. In differenzierten Sphären aller MACS-Zellfraktionen konnte insgesamt ein tendenzieller Anstieg Sox2⁺ Zellen beobachtet werden. Der Anteil Sox2⁺ Zellen in differenzierten Sphären unsortierter Kontrollzellen des postmortalen Corti'schen Organs der Maus lag bei $16,0 \pm 17,7$ % (n=3, 258 Patches) und konnte in den MACS-Zellfraktionen auf $16,4 \pm 14,2$ % (n=3, 83 Patches) in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion, auf $20,8 \pm 17,5$ % (n=3, 76 Patches) in der GLAST⁺ Zellfraktion und auf $25,3 \pm 28,2$ % (n=3, 172 Patches) in der $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellfraktion gesteigert werden.

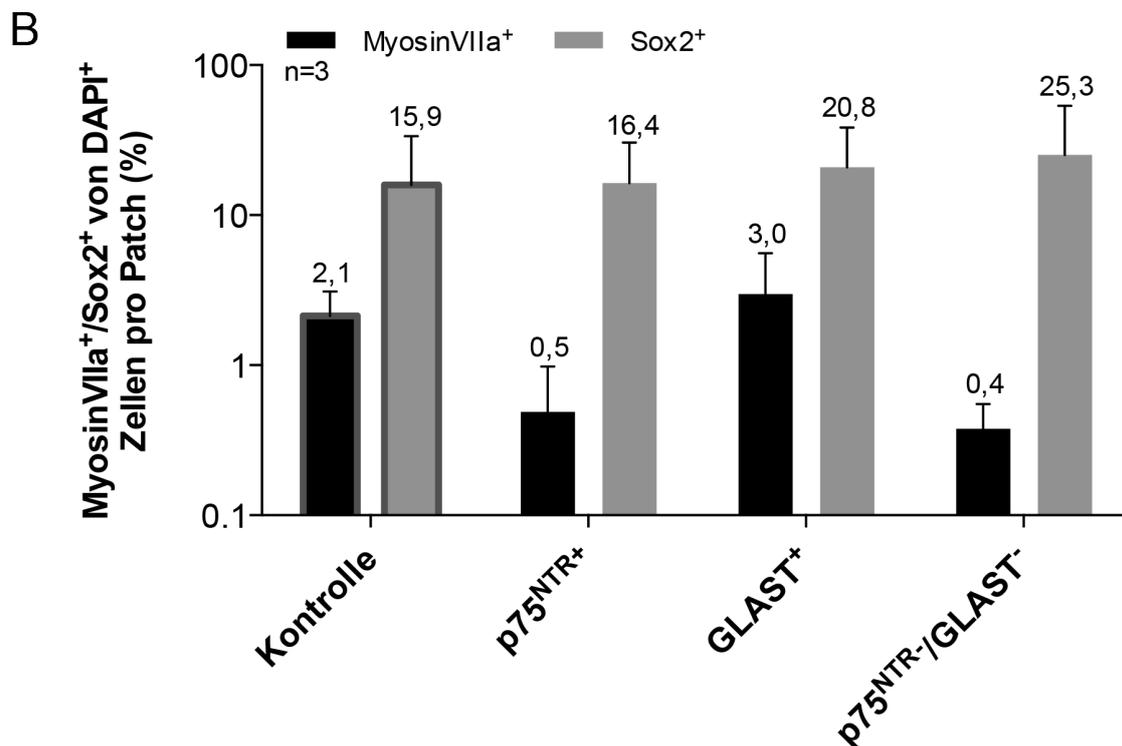
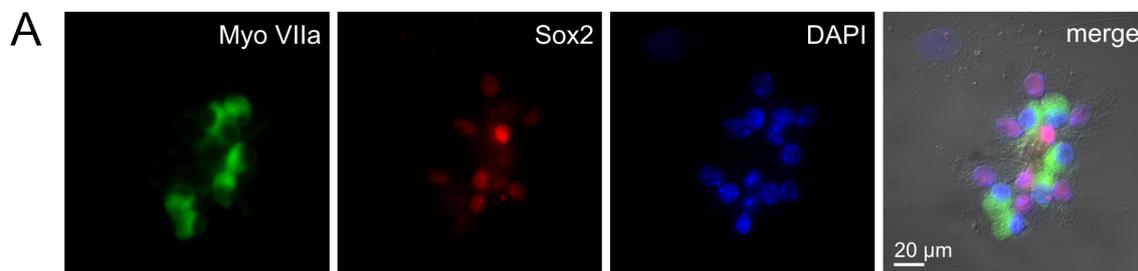


Abbildung 14: Quantitative Analyse der immunhistochemischen Markierung mit Haar- und Stützzellmarkern in differenzierten Sphären des Corti'schen Organs der Maus nach MACS-Sortierung. (A) Epifluoreszenzaufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung von MyosinVIIa (grün), Sox2 (rot) und DAPI (blau) sowie kolokalisiert (merge) exemplarisch in einer differenzierten Sphäre. (B) Prozentualer Anteil MyosinVIIa⁺ (schwarz) und Sox2⁺ (grau) Zellen von DAPI⁺ Zellen in differenzierten Sphären, die aus den MACS-sortierten Zellfraktionen p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellen sowie aus unsortierten Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p3-5) nach insgesamt 19 DIV *in vitro* generiert wurden. (Maßstabsbalken = 20 µm).

Zusammenfassend konnte nach MACS-Sortierung, Sphärenbildungs- und Differenzierungs-Assay ein teils tendenzieller, aber kein signifikanter Anstieg MyosinVIIa⁺ und Sox2⁺ Zellen in *in vitro* differenzierten Sphären p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ MACS-sortierter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen des Corti'schen Organs der postmortalen Maus (p3-5, unsortiert) festgestellt werden. Im Vergleich zu den anderen MACS-Zellfraktionen konnte der Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen in Sphären von GLAST⁺ Zellen auf das 6-fache erhöht werden.

3.3 Identifizierung einer Stammzellpopulation mittels FACS

3.3.1 Isolierung von p75^{NTR} und GLAST markierten Zellen mittels FACS

Der relative Anteil der jeweiligen FACS-Zellfraktion an der definierten analysierten Zellpopulation P1 (Abb. 15B, P1) ist in Abhängigkeit von der FITC- (Abb. 15C, Abszissenachse) sowie der PE-Fluoreszenz (Abb. 15C, Ordinatenachse) in einem Punktwolkendiagramm aufgetragen und im Vergleich mit der unsortierten Kontrollfraktion (p3-5) als Diagramm in Abbildung 15D zusammengefasst. Durch FACS-Sortierung konnten aus 8 unabhängigen Versuchsansätzen durchschnittlich $4,6 \pm 5,7$ % (n=8) der Zellen aus der sortierten Zellpopulation (Gate P1) als p75^{NTR+} (Abb. 15C, Q4; Abb. 15D, grün) und $9,1 \pm 1,7$ % der Zellen als GLAST⁺ (Abb. 15C, Q1; Abb. 15D, rot) identifiziert und separiert werden. Die restlichen $85,3 \pm 4,9$ % (n=8) der Zellen wurden aufgrund der niedrigen Fluoreszenzintensität der p75^{NTR-}/GLAST⁻ FACS-sortierten Zellfraktion (Abb. 15C, Q3; Abb. 15D, gelb) zugeordnet. Für

unsortierte Zellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus (markiert mit anti-p75^{NTR}-IgG-FITC und anti-GLAST-PE) konnte durchflusszytometrisch ein prozentualer Anteil p75^{NTR+} Zellen (Abb. 15D, grün, grau umrandet) von $4,0 \pm 0,5$ % (n=2) und ein prozentualer Anteil GLAST⁺ Zellen (Abb. 15D, rot, grau umrandet) von $19,3 \pm 3,0$ % (n=2) ermittelt werden. Zusätzlich zu den relativen Anteilen wurde analog zur MACS-Sortierung die absolute Zellausbeute pro Corti'sches Organ der Maus nach FACS-Sortierung berechnet und mit der Zellzahl pro Corti'sches Organ ohne Sortierung (Kontrollzellen) verglichen (Abb. 15E). Die Zellzahl von 51047,6 Zellen pro Corti'sches Organ reduzierte sich auf $46,4 \pm 42,2$ (n=8) Zellen in der p75^{NTR+} Zellfraktion und auf $130,9 \pm 83,1$ (n=8) Zellen in der GLAST⁺ Zellfraktion. Die Gewinnung von p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellen war mit $1236,6 \pm 752,1$ (n=8) Zellen pro Corti'sches Organ höher. Insgesamt lag der Zellverlust nach FACS-Sortierung bei 99,9 % in der p75^{NTR+} -Zellfraktion, 99,7 % in der GLAST⁺ -Zellfraktion sowie 97,6 % in der p75^{NTR-}/GLAST⁻ -Zellfraktion. Dies war in den positiv markierten Zellfraktionen vergleichbar mit dem Zellverlust nach MACS-Sortierung (97,6 % und 83,8 %). Der Zellverlust in der p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellfraktion fiel nach FACS-Sortierung deutlich größer aus als nach MACS-Sortierung (10,2 %).

Zusammenfassend ließen sich Zellen des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5) mittels FACS-Verfahren anhand ihrer FITC- und PE-Fluoreszenzintensität in die Zellfraktionen p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ mit einer Reinheit von 80-100 % (Voreinstellung am FACS-Gerät) selektieren. Die prozentualen Anteile positiv-markierter Zellen an der Ausgangszellpopulation waren dabei sowohl für die p75^{NTR+} als auch für die GLAST⁺ Zellfraktion vergleichbar mit den Anteilen positiv-markierter Zellen in der unsortierten Kontrollfraktion. Der Zellverlust lag nach FACS-Sortierung zwischen 97,6 und 99,9 % und war mit dem Zellverlust in den positiv markierten MACS-Zellfraktionen vergleichbar. Der Zellverlust in der negativ markierten Zellfraktion war nach FACS-Sortierung 87,4 % höher als nach MACS-Sortierung.

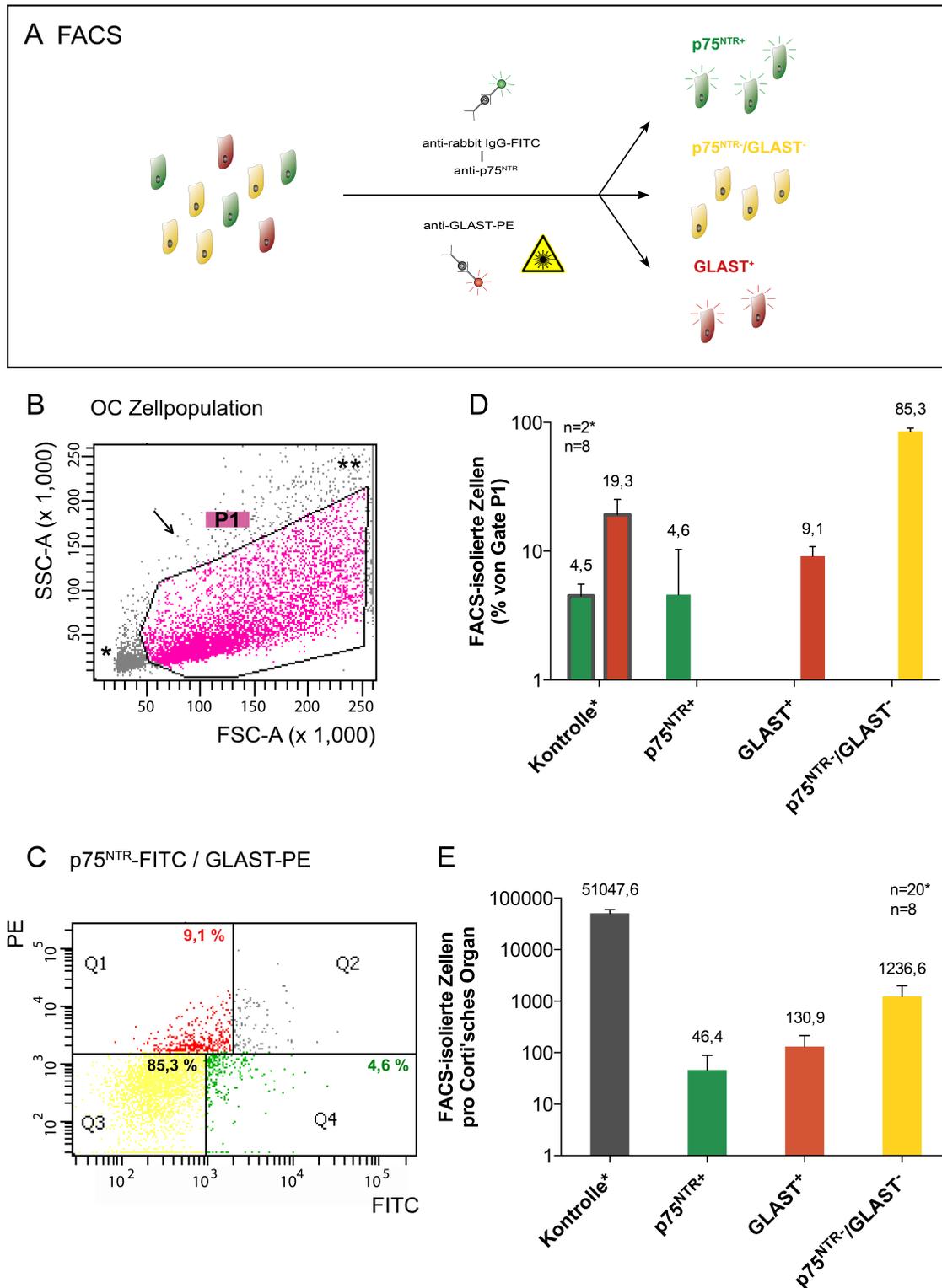


Abbildung 15: Isolierung von p75^{NTR}⁺ und GLAST⁺ markierten Zellen des postmortalen Corti'schen Organs der Maus mittels FACS. (A) Schematische Darstellung der simultanen FACS-Sortierung einer heterogenen Zellpopulation Corti'scher Zellen der Maus in die Zellfraktionen p75^{NTR}⁺ (grün, positiv markiert), GLAST⁺ (rot, positiv markiert) und p75^{NTR}⁻/GLAST⁻ (gelb, negativ markiert) nach Antikörpermarkierung mit anti-p75^{NTR}/anti-rabbit IgG-FITC und anti-GLAST-PE. **(B)** Darstellung der mittels Vorwärtsstreuung (FSC) und

Seitwärtsstreulicht (SSC) zu sortierende Zellpopulation P1 mit Ausschluss von Zellfragmenten (*) und Zellaggregaten (**) in einem Punktwolkendiagramm (Dot Plot). (C-E) Darstellung der FACS-sortierten Zellfraktionen $p75^{NTR+}$ (Q4, grün), $GLAST^+$ (Q1, rot) und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ (Q3, gelb) (C) als prozentualer Anteil vom Gate P1 in einem Punktwolkendiagramm, (D) in einem Balkendiagramm und (E) nach Errechnung der absoluten Zellausbeute pro Corti'sches Organ, jeweils im Vergleich mit unsortierten Kontrollzellen (grau umrandet) des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5).

3.3.2 Sphärenbildungskapazität von FACS-sortierten Zellen

Nach FACS-Zellsortierung der mit anti- $p75^{NTR}$ und anti-GLAST markierten Einzelzellsuspension des Corti'schen Organs der immaturren Maus (p3-5) wurden die Zellfraktionen $p75^{NTR+}$, $GLAST^+$ und $p75^{NTR-}/GLAST^-$ in das *in vitro* Sphärenbildungs-Assay eingebracht. Nach 5 DIV wurden die Sphären, die aus den Progenitorzellen der jeweiligen Zellpopulationen hervorgegangen sind, entnommen und unter Berücksichtigung der drei Sphärenmorphologien solide, transitional und hohl quantifiziert. Da die Sphärenausbeute nach FACS-Sortierung im Vergleich zu Sphären nach MACS-Sortierung mit durchschnittlich 5 Sphären (n=4) pro 900 Zellen deutlich geringer ausfiel, wurden die Sphären in der Quantifizierung (Abb. 16A) trotz unterschiedlicher Morphologie zu einer Sphärenfraktion (s+t+h) zusammengefasst. Gegenüber unsortierten Zellen des Corti'schen Organs, die über ein Sphärenbildungspotenzial von $18,9 \pm 7,9$ (n=11) Sphären (Abb. 16A, grau) pro 900 kultivierte Zellen verfügten, konnten pro Kultivierungseinheit FACS-sortierter Zellen nur $4,6 \pm 3,7$ (n=4) Sphären aus $p75^{NTR+}$ Zellen (Abb. 16A, grün), $5,9 \pm 3,5$ (n=4) aus $GLAST^+$ Zellen (Abb. 16A, rot) und $4,7 \pm 2,3$ (n=4) aus $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellen (Abb. 16A, gelb) generiert werden. Dieses Ergebnis wirkte sich deutlich auf die statistische Auswertung der Sphärenausbeute pro murines Corti'sches Organ aus (Abb. 16B). Im Vergleich zu unsortierten Zellen, die im Sphärenbildungs-Assay durchschnittlich $1036,8 \pm 519,2$ (n=11) Sphären pro Corti'sches Organ generierten (Abb. 16B, grau), lag die Sphärenzahl pro Corti'sches Organ durch die Kombination aus Zellverlust von 97,6 - 99,9% und der reduzierten Sphärenbildungskapazität bei $0,2 \pm 0,2$ (n=4) in der $p75^{NTR+}$ FACS-Fraktion (Abb. 16B, grün), bei $0,9 \pm 0,5$ (n=4) in der $GLAST^+$ (Abb. 16B, rot) und bei $6,4 \pm 3,1$ (n=4) $p75^{NTR-}/GLAST^-$ FACS-Zellfraktion.

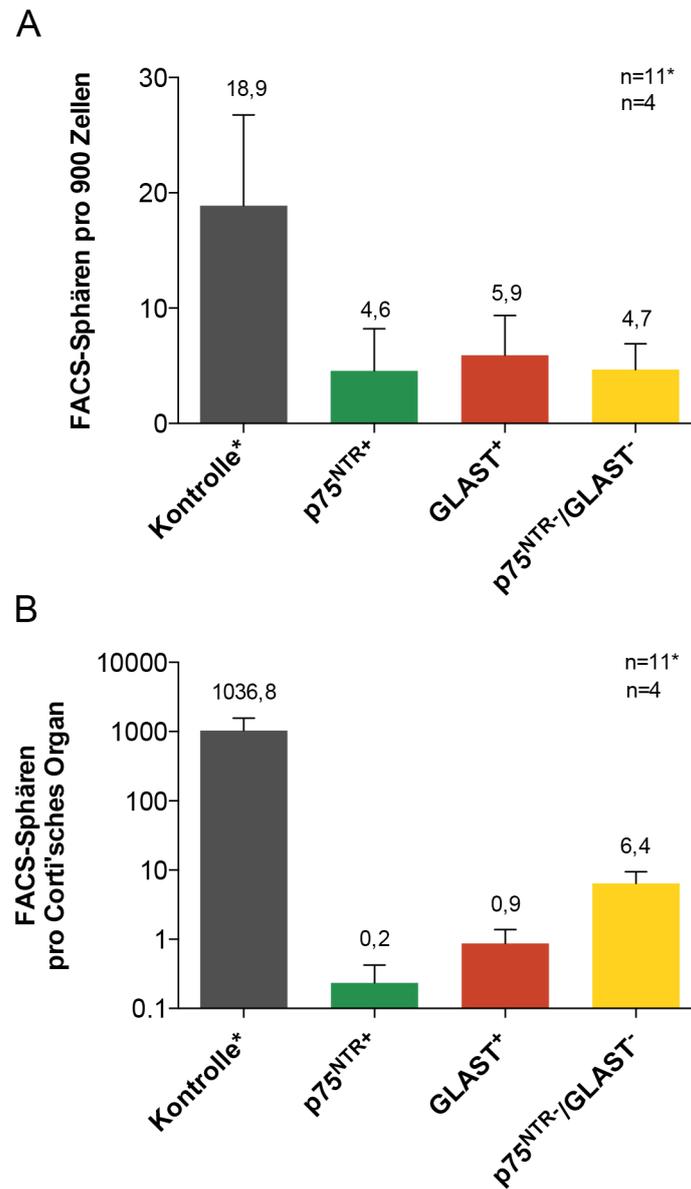


Abbildung 16: Quantitative Analyse der Sphärenbildungskapazität von FACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus. Vergleichende Analyse der Gesamtzahl an Sphären, die im *in vitro* Sphärenbildungs-Assay aus unsortierten Zellen (n=11) und aus den FACS-sortierten Zellfraktionen (n=4) p75^{NTR+} (grün), GLAST⁺ (rot) und p75^{NTR-}/GLAST⁻ (gelb) hervorgegangen sind, (A) als quantitative Gegenüberstellung der Sphärenanzahl pro 900 kultivierte Zellen und (B) pro präpariertes Corti'sches Organ der immaturren Maus (p3-5).

Zusammenfassend reduzierte sich die Sphärenbildungskapazität FACS-sortierter Zellen verglichen mit unsortierten Zellen des Corti'schen Organs der Maus um durchschnittlich 74 %. Die Sphärenausbeute fiel zusätzlich so gering aus, dass sich effektiv keine Sphären, die aus FACS-sortierten Zellen generiert wurden, in ein anschließendes Differenzierungs-Assay einbringen ließen.

3.3.3 Proliferationspotenzial von Sphären aus FACS-sortierten Zellen

Nach Sphärenbildungs-Assay mit kombiniertem EdU-Assay wurden in Sphären aller FACS-sortierten Zellfraktionen EdU-inkorporierte (EdU^+) Zellen nachgewiesen. Für die FACS-sortierten Zellfraktionen $\text{p75}^{\text{NTR}^+}$, GLAST^+ und $\text{p75}^{\text{NTR}^-}/\text{GLAST}^-$ sind in Abbildung 18 exemplarisch Sphären als Epifluoreszenzaufnahmen dargestellt, in denen der Zellkernmarker DAPI (Abb. 18, blau, 4',6-Diamidino-2-phenylindol) mit EdU (Abb. 18, rot) kolokalisiert werden konnte (Abb. 18, Merge). Eine Quantifizierung der EdU^+ Zellen von DAPI^+ innerhalb einer Sphäre erfolgte am DIV 5 nach immunhistochemischer Markierung und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung. Der relative Anteil an EdU^+ Zellen ist in Abbildung 17 für die FACS-Zellfraktionen $\text{p75}^{\text{NTR}^+}$ (Abb. 17, grün), GLAST^+ (Abb. 17, rot) und $\text{p75}^{\text{NTR}^-}/\text{GLAST}^-$ (Abb. 17, gelb) im Vergleich zu Sphären aus Kontrollzellen (Abb. 17, grau) aufgetragen. Sphären, die aus unsortierten Zellen des Corti'schen Organs (Kontrollsphären) hervorgegangen sind, enthielten zu einem Anteil von 80,8 % EdU-inkorporierte Zellen. Für Sphären aus FACS-sortierten Zellen konnten EdU^+ Zellanteile von 72,2 % für die $\text{p75}^{\text{NTR}^+}$ Zellfraktion, 78,3 % für die GLAST^+ Zellfraktion und 77,5 % für die $\text{p75}^{\text{NTR}^-}/\text{GLAST}^-$ Fraktion identifiziert werden ($n=1$).

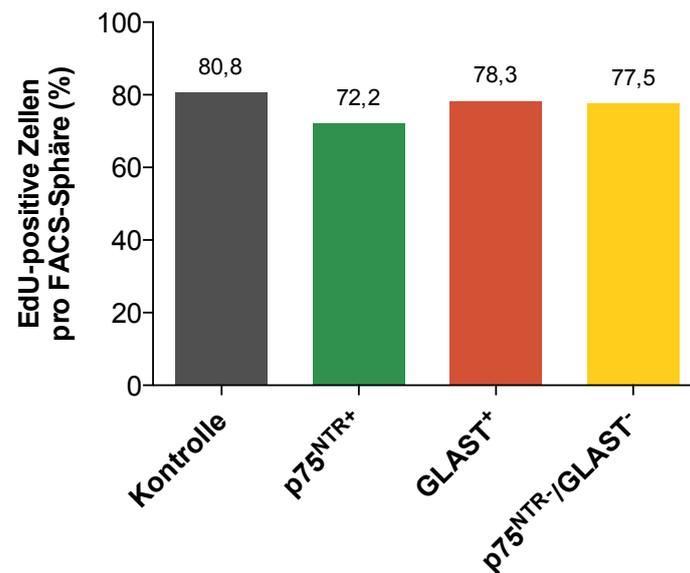


Abbildung 17: Analyse der Sphärenbildung infolge mitotischer Zellteilung von FACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus mittels EdU-Assay. Quantitativer Vergleich des prozentualen Anteils EdU⁺ Zellen von DAPI⁺ Zellen innerhalb von Sphären, die aus unsortierten Zellen (grau) des immaturren Corti'schen Organs der Maus (p3-5) und aus FACS-sortierten p75^{NTR+} (grün), GLAST⁺ (rot) und p75^{NTR-}/GLAST⁻ (gelb) Zellen nach Sphärenbildungs-Assay *in vitro* generiert wurden (n=1).

Zusammenfassend konnte im EdU-Assay eine EdU-Inkorporation von durchschnittlich 76 % in Sphären von FACS-sortierten p75^{NTR+}, GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellen während des Sphärenbildungs-Assays nachgewiesen werden. Diese war im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht erhöht.

3.3.4 Stammzellartigkeit von Sphären aus FACS-sortierten Zellen

Neben dem Nachweis proliferativer Aktivität potenzieller otischer Stammzellen in den Zellkulturen, wurde die Stammzellartigkeit innerhalb der Sphären, die aus den FACS-Zellfraktionen hervorgegangen sind, mit dem Stammzellmarker Nestin evaluiert. In Epifluoreszenzaufnahmen konnte die Immunfluoreszenzmarkierung mit Nestin (Abb. 18, grün) in Sphären der FACS-Zellfraktionen p75^{NTR+} (zweite Spalte), GLAST⁺ (dritte Spalte) und p75^{NTR-}

/GLAST⁻ (vierte Spalte) und in Sphären unsortierter Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p3-5, Kontrollzellen, erste Spalte) dargestellt werden.

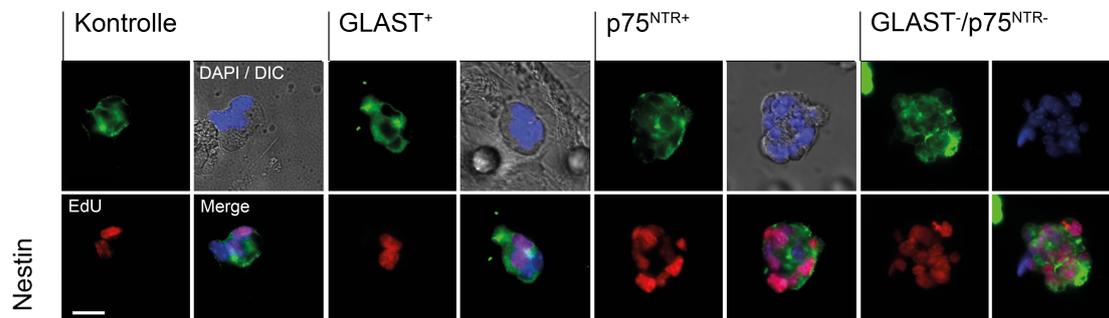


Abbildung 18: Qualitative Dokumentation der Stammzellartigkeit von *in vitro* generierten Sphären des postmortalen Corti'schen Organs der Maus nach FACS-Sortierung. Epifluoreszenzaufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung mit Nestin (grün) von Sphären, die aus unsortierten Zellen des murinen Corti'schen Organs der Maus (p3-5, Kontrolle, erste Spalte) und den FACS-sortierten Zellfraktionen p75^{NTR+} (zweite Spalte), GLAST⁺ (dritte Spalte) und p75^{NTR+}/GLAST⁻ (vierte Spalte) Zellen generiert wurden, jeweils kolokalisiert (Merge) in simultaner Markierung mit DAPI (blau und mit Durchlicht, DIC) und EdU (rot). (Maßstabsbalken = 10 µm).

Zusammenfassend konnte der Stammzellmarker Nestin in Sphären aller FACS-sortierten Zellfraktionen sowie in einer Kontrollzellfraktion immunhistochemisch nachgewiesen werden. Teilweise wurde dabei eine Kolokalisation mit EdU festgestellt.

3.4 Identifizierung einer Stammzellpopulation aus Corti'schen Zellen nach *in vitro* Inhibition des Notch-Signalwegs

3.4.1 Sphärenbildungskapazität von Zellen aus verschiedenen Segmenten des Corti'schen Organs

Im Sphärenbildungs-Assay wurden die Corti'schen Zellen der Maus (p0) getrennt nach apikaler, mittlerer und basaler Windung kultiviert und am DIV 5 quantifiziert. Die Sphärenbildungskapazität ist vergleichend als Sphärenanzahl

pro 900 kultivierte Zellen aufgetragen (Abb. 19A). Aus 900 unsortierten Kontrollzellen des Corti'schen Organs der Maus im Altersstadium p3-5 gehen wie bereits beschrieben durchschnittlich $18,9 \pm 7,9$ (n=11) Sphären insgesamt, davon $16,6 \pm 7,5$ (n=11) solide und transitionale Sphären (s+t) sowie $2,1 \pm 1,1$ (n=11) hohle Sphären (h), hervor. Aus Kontrollzellen des Corti'schen Organs der Maus im Altersstadium p0 wurden $9,4 \pm 3,9$ (n=6) Sphären, davon $7,6 \pm 4,3$ (n=6) (s+t) Sphären und $2,0 \pm 0,9$ (n=6) (h) Sphären, generiert. Nach segmentaler Trennung gingen aus apikalen Zellen des Corti'schen Organs (p0) insgesamt $14,4 \pm 6,6$ (n=11) Sphären, davon waren $11,5 \pm 5,0$ (n=11) (s+t)-Sphären und $2,9 \pm 3,4$ (n=11) (h)-Sphären, hervor. Zellen aus dem mittleren Anteil des Corti'schen Organs (p0) generierten insgesamt $11,3 \pm 6,1$ (n=7) Sphären, davon $10,2 \pm 5,4$ (n=7) (s+t)-Sphären und $1,2 \pm 0,9$ (n=7) (h)-Sphären. Aus basalen Zellen des Corti'schen Organs (p0) wurden insgesamt $11,7 \pm 6,3$ (n=7) Sphären, davon $10,1 \pm 5,2$ (n=7) (s+t)-Sphären und $1,6 \pm 1,2$ (n=7) (h)-Sphären, gebildet. Durchschnittlich (Abb. 19A, Gruppen 2-5) konnten aus *post partem* (p0) entnommenen Zellen des Corti'schen Organs der Maus (insgesamt oder getrennt nach Windung) insgesamt $11,7 \pm 5,7$ Sphären, davon $9,8 \pm 5,0$ (s+t)-Sphären und $1,9 \pm 1,6$ (h)-Sphären, gewonnen werden.

Zusammenfassend führte die segmentale Trennung im Altersstadium p0 zu einem tendenziellen Anstieg der Sphärenbildungskapazität in apikalen, mittleren oder basalen Zellen gegenüber p0-Kontrollzellen. Im Vergleich zu Kontrollzellen aus dem Altersstadium p3-5 konnte die Sphärenbildungskapazität für *post partem* entnommene Corti'sche Zellen nicht gesteigert werden.

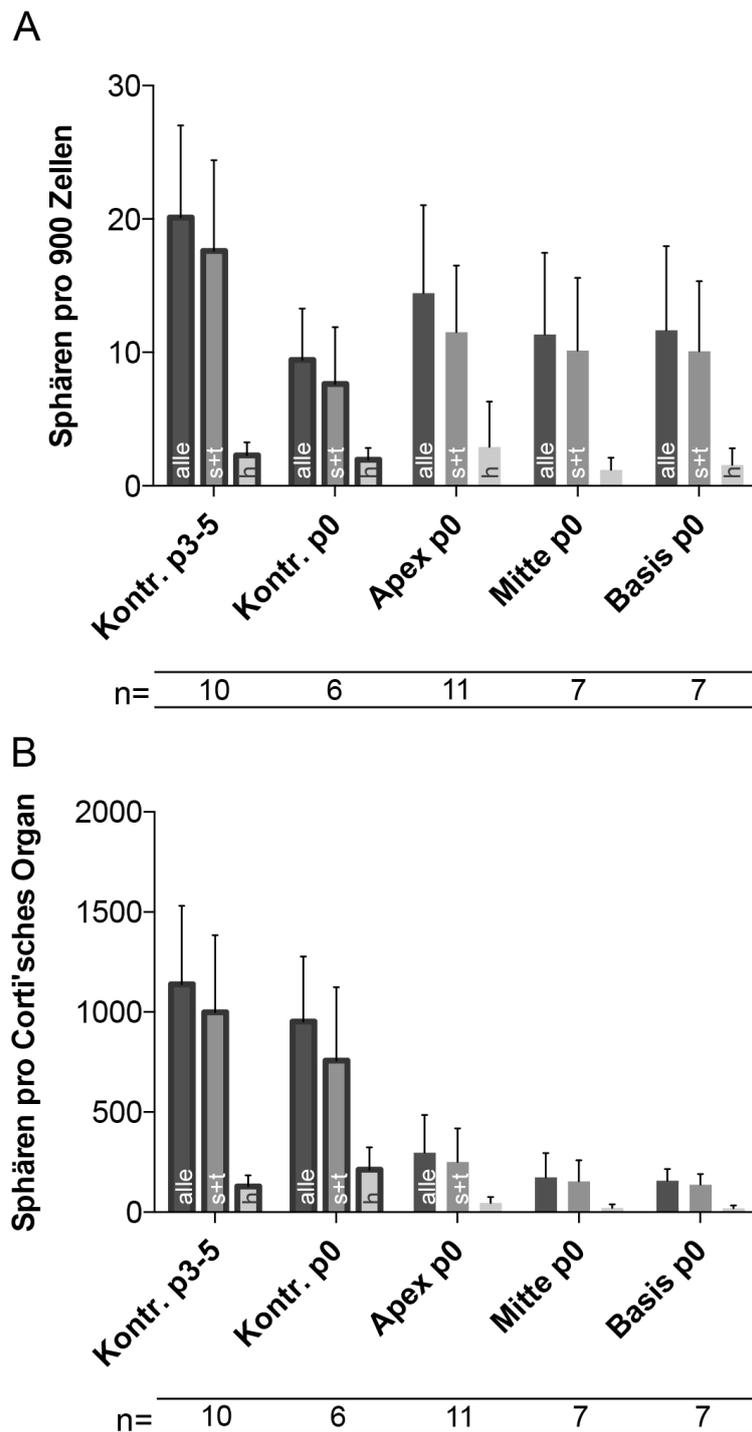


Abbildung 19: Sphärenbildungskapazität von *in vitro* kultivierten Zellen aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus. (A-B) Quantitative Analyse der Sphärenbildungskapazität von Zellen aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus in dem Altersstadium p0, verglichen mit Kontrollsphären aus dem gesamten Corti'schen Organ der Maus (p-3-5 und p0) unter Berücksichtigung der Sphärenmorphologie solider (s), transitionaler (t) und hohler (h) Sphären. (A) Sphärenanzahl errechnet pro 900 kultivierte Zellen und (B) pro Corti'sches Organ

Die Anzahl generierter Sphären wurde pro präpariertes Corti'sches Organ errechnet und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 19B). Aus Kontrollzellen des Corti'schen Organs der Maus (p3-5) konnten wie bereits beschrieben durchschnittlich $1136,8 \pm 519,2$ (n=11) Sphären, davon $904,4 \pm 468,4$ (n=11) (s+t)-Sphären und $120,2 \pm 74,6$ (n=11) (h)-Sphären, generiert werden (Abb. 19B, Gruppe 1). Ein geringeres Altersstadium der Maus führte zu keinem Unterschied der Sphärenbildungskapazität pro Corti'sches Organ. Aus Kontrollzellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) wurden insgesamt $952,5 \pm 324,6$ (n=6) Sphären, davon $756,8 \pm 367,0$ (n=6) (s+t)-Sphären und $212,9 \pm 111,7$ (n=6) (h)-Sphären, generiert. Nach mikropräparatorischer Trennung des Corti'schen Organs (p0) in die verschiedenen Windungen Apex, Mitte und Basis wurde je Versuchsgruppe ein Drittel des Corti'schen Organs in die *in vitro* Kultur eingebracht. Pro apikales Segment des Corti'schen Organs (p0) wurden insgesamt $298,1 \pm 187,2$ (n=11) Sphären, davon $251,6 \pm 168,2$ (n=11) (s+t)-Sphären und $46,5 \pm 29,7$ (n=11) (h)-Sphären, generiert. Aus dem mittleren Segment gingen insgesamt $174,5 \pm 120,8$ (n=7) Sphären, davon $154,3 \pm 105,7$ (n=7) (s+t)-Sphären und $20,2 \pm 19,5$ (n=7) (h)-Sphären, hervor. Aus dem basalen Segment konnten nach Kultivierung insgesamt $158,3 \pm 57,7$ (n=7) Sphären, davon $138,3 \pm 52,5$ (n=7) (s+t)-Sphären und $20,0 \pm 14,3$ (n=7) (h)-Sphären, quantifiziert werden. Durchschnittlich konnten (Abb. 19B, Gruppen 2-5) aus *post partem* (p0) entnommenen Zellen pro Corti'sches Organ der Maus (insgesamt oder nach Windung getrennt) $210,3 \pm 76,5$ Sphären, davon $181,4 \pm 61,3$ (s+t)-Sphären und $28,9 \pm 15,2$ (h)-Sphären, gewonnen werden. Entsprechend der reduzierten Anzahl verwendeter Zellen pro Corti'sches Organ verringerte sich die Sphärenanzahl pro Segment des Corti'schen Organs der Maus (p0) im Vergleich zu Kontrollzellen (p3-5, p0). Apikale Zellen konnten dabei tendenziell mehr Sphären ausbilden als Corti'sche Zellen aus dem mittleren oder basalen Abschnitt.

Zusammenfassend führte die segmentale Trennung des Corti'schen Organs der Maus im Altersstadium p0 quantitativ zu keinem Anstieg der Sphärenbildungskapazität pro eingesetztes Corti'sches Organ (gesamt oder pro Segment).

3.4.2 Differenzierungspotenzial von Sphären aus verschiedenen Segmenten des Corti'schen Organs

Neben der Sphärenbildungskapazität sollte das *in vitro* Differenzierungsverhalten segmental getrennter Zellen des Corti'schen Organs im Vergleich zu Kontrollzellen des Corti'schen Organs der Maus (p3-5 und p0) beurteilt werden. Nach Differenzierungs-Assay wurden die differenzierten Sphären (Patches) immunhistochemisch markiert und fluoreszenzmikroskopisch analog zu differenzierten Sphären nach MACS-Sortierung analysiert. Dabei wurde die Anzahl der Patches, der Zellkerne (DAPI⁺) sowie der prozentuale Anteil MyosinVIIa⁺ (Abb. 20, schwarz) und Sox2⁺ (Abb. 20, grau) Zellen von DAPI⁺ Zellen innerhalb der Patches bestimmt, differenziert für verschiedene Sphärenpopulationen (Kontrollsphären p3-5, Kontrollsphären p0, Sphären aus segmental getrennten Zellen). Wie bereits beschrieben konnten aus unsortierten Corti'schen Kontrollzellen der Maus (p3-5) Patches mit durchschnittlich $2,1 \pm 1,0$ % (n=3, 258 Patches) MyosinVIIa⁺ Zellen und $15,9 \pm 17,7$ % (n=3, 258 Patches) Sox2⁺ Zellen gewonnen werden. Differenzierte Sphären aus unsortierten Corti'schen Zellen im Altersstadium p0 enthielten $2,3 \pm 1,0$ % (n=2, 186 Patches) MyosinVIIa⁺ sowie $13,9 \pm 11,1$ % (n=2, 186 Patches) Sox2⁺ Zellen. Zellen des apikalen Segments des Corti'schen Organs der Maus (p0) erzielten in differenzierten Sphären einen Anteil von $8,6 \pm 3,2$ % (n=6, 119 Patches) MyosinVIIa⁺ Zellen sowie einen Anteil von $24,0 \pm 12,4$ % (n=6, 119 Patches) Sox2⁺ Zellen nach *in vitro* Differenzierung. Corti'sche Zellen aus dem mittleren Segment differenzierten sich Patches mit einem Anteil von $7,7 \pm 6,3$ % (n=2, 140 Patches) MyosinVIIa⁺ Zellen und mit einem Anteil von $22,3 \pm 18,3$ % (n=2, 140 Patches) Sox2⁺ Zellen. Von basalen Zellen des murinen Corti'schen Organs wurden differenzierte Patches ausgewertet, die zu einem Anteil von $9,0 \pm 10,3$ % (n=2, 79 Patches) aus MyosinVIIa⁺ Zellen und zu einem Anteil von $10,5 \pm 7,0$ % (n=2, 79 Patches) aus Sox2⁺ Zellen bestanden. Es konnten durchschnittlich $112,7 \pm 31,0$ (Apex n=6, Mitte n=2, Basis n=2) differenzierte Sphären aus den verschiedenen Segmenten des Corti'schen Organs ausgewertet werden. Insgesamt konnte eine tendenzielle Verbesserung der *in vitro* Differenzierung in segmental getrennten Corti'schen Zellen

beobachtet werden. Dabei war der 4,1-fache Anstieg MyosinVIIa⁺ Zellen in Patches aus apikalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Mann-Whitney Test, $p = 0,0238$).

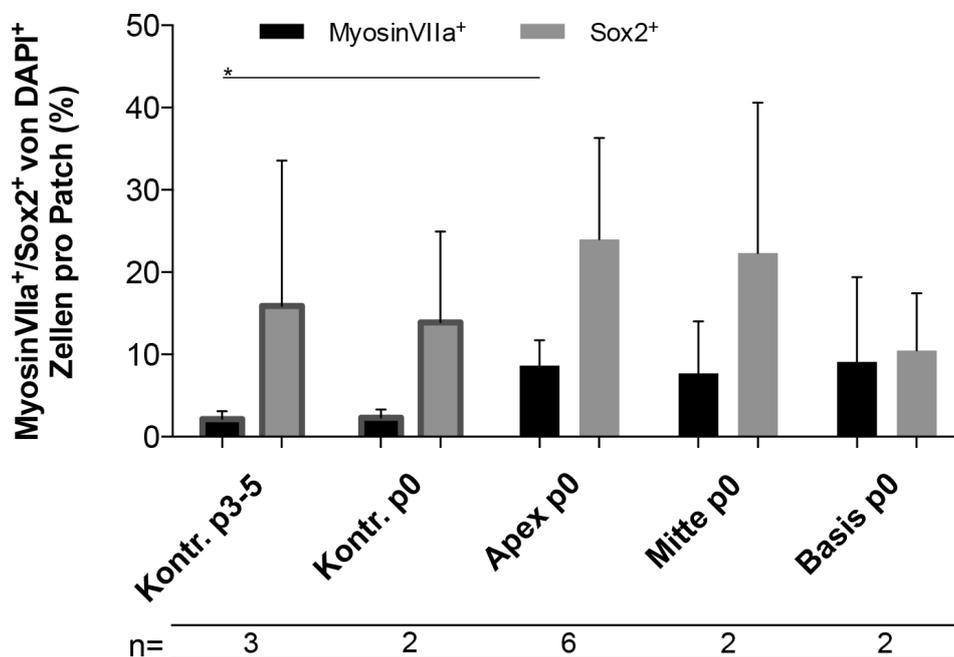


Abbildung 20: Quantitative Analyse der immunhistochemischen Markierung mit Haar- und Stützzellmarkern in differenzierten Sphären nach segmentaler Sortierung des Corti'schen Organs der Maus. Prozentualer Anteil MyosinVIIa⁺ (schwarz) und Sox2⁺ (grau) Zellen von DAPI⁺ Zellen in differenzierten Sphären, die aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus im Altersstadium p0 nach insgesamt 19 DIV *in vitro* generiert wurden, im Vergleich zu differenzierten Sphären aus unsortierten Zellen des gesamten Corti'schen Organs der postnatalen Maus im Altersstadium p3-5 und p0.

Zusammenfassend enthielten differenzierte Sphären aus segmental getrennten Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) tendenziell mehr MyosinVIIa⁺ (Apex, Mitte, Basis) und Sox2⁺ Zellen (Apex, Mitte) als differenzierte Sphären aus Kontrollzellen (p3-5, p0). Signifikant war der Anstieg MyosinVIIa⁺ Zellen in differenzierten Sphären der Apex.

3.4.3 Inhibition des Notch-Signalwegs in differenzierenden Sphären

Sphären aus verschiedenen Zellfraktionen wurden im Differenzierungs-Assay chemisch mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L685458 *in vitro* stimuliert. Anschließend wurden die Sphären im etablierten Differenzierungs-Assay kultiviert, immunhistochemisch markiert und systematisch mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der prozentuale Anteil MyosinVIIa⁺ und Sox2⁺ Zellen von DAPI⁺ Zellen innerhalb einer differenzierten Sphäre wurde für apikale, mittlere und basale Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) vergleichend mit Kontrollzellen des gesamten Corti'schen Organs (p0), jeweils mit und ohne Stimulation mit Notch-Inhibitor errechnet (Abb. 21B). Zusätzlich dienten Sphären aus Corti'schen Zellen der Maus im Altersstadium p3-5 sowie p0 unter *in vitro* Zusatz von DMSO als Kontrollfraktionen. Die quantitative Analyse zeigte, dass der Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen in differenzierten Sphären von Kontrollzellen durchschnittlich bei 2,2 % lag (Abb. 21B, $2,1 \pm 1,0$ % (n=3, 258 Patches) für p3-5 Kontrollzellen, $2,3 \pm 1,0$ % (n=2, 186 Patches) für p0 Kontrollzellen und $2,2 \pm 1,2$ % (n=3, 193 Patches) für p0 Kontrollzellen mit DMSO). Der Anteil Sox2⁺ Zellen in differenzierten Sphären von Kontrollzellen lag durchschnittlich bei 12,6 % (Abb. 21B, $15,9 \pm 17,7$ % (n=3, 258 Patches) für p3-5 Kontrollzellen, $13,9 \pm 11,1$ % (n=2, 186 Patches) für p0 Kontrollzellen und $8,1 \pm 1,3$ % (n=3, 193 Patches) für p0 Kontrollzellen mit DMSO). Wie bereits beschrieben ergab die segmentale Trennung des Corti'schen Organs der Maus (p0) ohne Notch-Inhibitor einen durchschnittlichen Anteil von 8,4 % MyosinVIIa⁺ Zellen und einen durchschnittlichen Anteil von 18,9 % Sox2⁺ Zellen in differenzierten Sphären (Abb. 20 und 21B) mit signifikantem Anstieg MyosinVIIa⁺ Zellen in differenzierten Sphären der Apex im Vergleich zu p3-5 Kontrollzellen. Im Vergleich zu p0 Kontrollzellen (mit DMSO) war der Anstieg MyosinVIIa⁺ (Mann-Whitney Test, $p = 0,0476$) und der Anstieg Sox2⁺ Zellen (Mann-Whitney Test, $p = 0,0238$) in differenzierten Sphären der Apex signifikant. Nach *in vitro* Notch-Signalweg Inhibition enthielten differenzierte Sphären aus Kontrollzellen (p0) zu $11,7 \pm 5,7$ % (n=5, 302 Patches) MyosinVIIa⁺ Zellen und zu $21,4 \pm 6,2$ % (n=5, 302 Patches) Sox2⁺ Zellen. In Sphären aus apikalen Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) betrug der

Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen $5,9 \pm 2,8$ % (n=4, 80 Patches) und der Anteil Sox2⁺ Zellen $29,3 \pm 6,8$ % (n=4, 80 Patches). Zellen aus dem mittleren Segment des Corti'schen Organs der Maus (p0) generierten nach Notch-Inhibition differenzierte Sphären mit $7,2 \pm 5,4$ % (n=2, 120 Patches) MyosinVIIa⁺ Zellen und $17,3 \pm 13,5$ % (n=2, 120 Patches) Sox2⁺ Zellen. In differenzierten, Notch-inhibierten Sphären aus basalen Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) betrug der Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen $8,6 \pm 5,3$ % (n=2, 80 Patches) und der Anteil Sox2⁺ - Zellen $18,0 \pm 9,4$ % (n=2, 80 Patches). Nach Notch-Signalweg Inhibition lag der durchschnittliche Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen bei 7 % und der durchschnittliche Anteil Sox2⁺ - Zellen bei 22 % in segmental getrennten Zellen (Apex, Mitte, Basis). Dies entsprach einem 3-fachen Anstieg MyosinVIIa⁺ Zellen und einem 3-fachen Anstieg Sox2⁺ Zellen verglichen mit Kontrollzellen (p0 mit DMSO). In Notch-inhibierten Sphären aus Kontrollzellen des Corti'schen Organs (p0) war der 5,3-fache Anstieg MyosinVIIa⁺ Zellen (Mann-Whitney Test, $p = 0,0357$) und der 2,6-fache Anstieg Sox2⁺ Zellen (Mann-Whitney Test, $p = 0,0357$) signifikant, verglichen mit Kontrollsphären (p0 mit DMSO). Hier war der Anstieg MyosinVIIa⁺ Zellen auch im Vergleich zu p3-5 Kontrollzellen signifikant (Mann-Whitney Test, $p = 0,0357$). Die segmentale Trennung von Corti'schen Zellen mit zusätzlicher Notch-Inhibition ergab nur in differenzierten Sphären aus apikalen Zellen einen tendenziellen Anstieg Sox2⁺ Zellen (Mann-Whitney Test, $p = 0,0571$). Eine differenzierte, mit Notch-Inhibitor stimulierte Sphäre aus apikalen Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) ist beispielhaft in Abbildung 21A als konfokale Aufnahme mit MyosinVIIa⁺ (Abb. 21A, grün) und Sox2⁺ (Abb. 21A, rot) markierten Zellen dargestellt. Dabei fiel eine spezielle Anordnung der Zellen auf: Die Sox2⁺ Zellen umrandeten die zentral gelegenen MyosinVIIa⁺ Zellen innerhalb der differenzierten Sphäre (Abb. 21A, Merge). Zusätzlich war jede Zelle des Patches immunhistochemisch positiv, entweder MyosinVIIa⁺ oder Sox2⁺, markiert.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass DMSO als organisches Lösungsmittel im Reagenz des γ -Sekretase-Inhibitors L685458 keinen Effekt auf die Zelldifferenzierung hatte. Im Vergleich zu den drei Kontrollfraktionen (p3-5, p0, p0 mit DMSO) konnte der Anteil MyosinVIIa⁺ Zellen und Sox2⁺ Zellen

in segmental getrennten Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) mit und ohne Notch-Signalweg-Inhibition gesteigert, nur in apikalen Zellen aber signifikant gesteigert werden. In *in vitro* differenzierten, mit Notch-Inhibitor stimulierten Sphären aus Kontrollzellen des Corti'schen Organs (p0) war sowohl der Anstieg von MyosinVIIa⁺ Zellen als auch der Anstieg von Sox2⁺ Zellen signifikant. Zusätzlich war eine auffällige Zellanordnung positiv markierter Zellen innerhalb der differenzierten Sphären darstellbar.

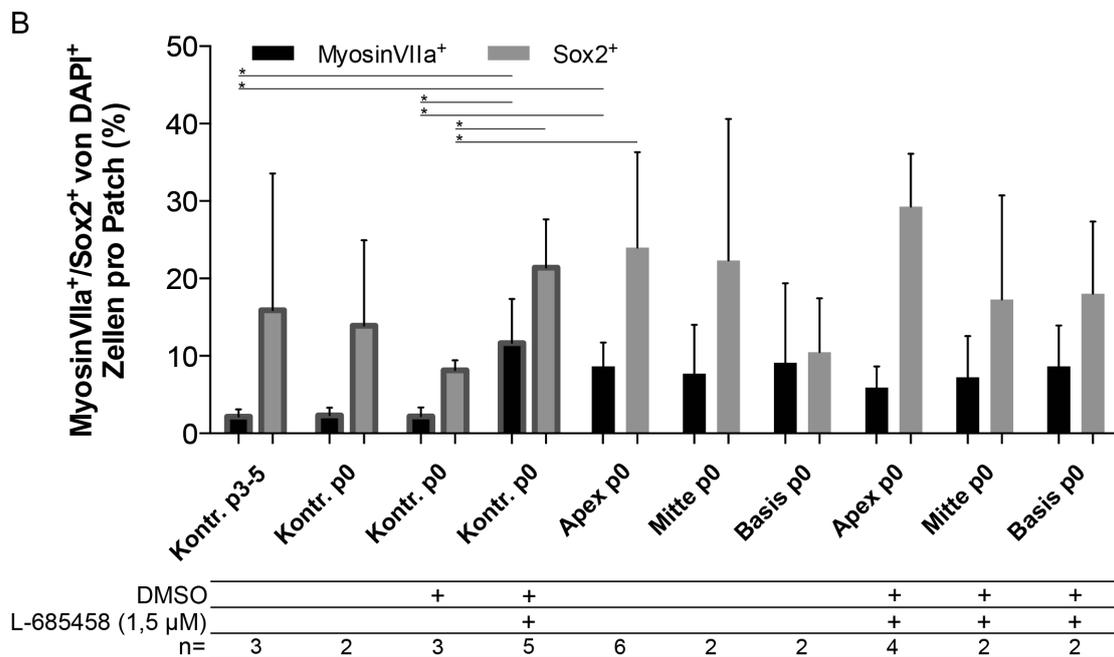
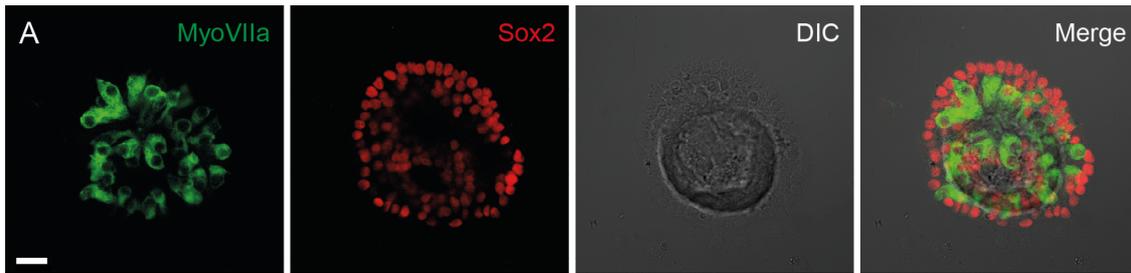


Abbildung 21: Quantitative Analyse des Differenzierungspotenzials nach chemischer *in vitro* Stimulation von differenzierten Sphären anhand immunhistochemischer Markierung. (A) Konfokalaufnahmen der simultanen Immunfluoreszenz-markierung von MyosinVIIa (grün) und Sox2 (rot) sowie kolokalisiert (Merge) in einer differenzierten, mit Notch-Inhibitor stimulierten Sphäre aus apikalen Zellen des Corti'schen Organs der Maus (p0) mit Durchlicht-Aufnahme (DIC). (B) Prozentualer Anteil MyosinVIIa⁺ (schwarz) und Sox2⁺ (grau) Zellen von DAPI⁺ Zellen in differenzierten Sphären, die aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus im Altersstadium p0 nach insgesamt 19 DIV *in vitro* generiert wurden, im Vergleich zu differenzierten Sphären aus unsortierten Zellen des gesamten Corti'schen Organs der postnatalen Maus im Altersstadium p3-5, p0 und p0 mit DMSO. Chemische Stimulation mit Notch-Signalweg Inhibitor L685458 entsprechend gekennzeichnet (+). (Maßstabsbalken = 20 μ m).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

I) Immunhistochemische Charakterisierung der Markerexpression im Corti'schen Organ der postnatalen Maus

Das Expressionsmuster der CD-Marker p75^{NTR} und GLAST konnte in zwei distinkten Stützzellsubpopulationen des Corti'schen Organs der postnatalen Maus (p4) identifiziert werden. Der Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} wurde von der äußeren Pillarzelle, den Deiterszellen und den Hensenzellen exprimiert. Die Expression von GLAST beschränkte sich auf die innere Phalangenzelle und Zellen des großen epithelialen Wulstes.

II) Etablierung von geeigneten Verfahren zur Zellsortierung

Anhand der Markerexpression für p75^{NTR} und GLAST konnten zwei Verfahren zur Zellsortierung etabliert werden. Mit der Magnet-assoziierten Zellsortierung gelang eine Anreicherung von zwei distinkten Stützzellpopulationen des Corti'schen Organs der Maus. Eine Erhöhung des prozentualen Anteils positiv-markierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle konnte nicht erreicht werden. Die Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung ermöglichte eine Isolation von zwei hochreinen Zellfraktionen. Bei beiden Verfahren musste ein hoher Zellverlust in Kauf genommen werden.

III) Bestimmung der Sphärenbildungskapazität der distinkten Zelltypen des Corti'schen Organs und Dokumentation des Stammzellcharakters der Sphären

Aus MACS- und FACS-isolierten Zellen konnten *in vitro* morphologisch unterschiedliche Sphären generiert werden. Dabei konnte für MACS-sortierte p75^{NTR+} und GLAST⁺ Zellen ein erhöhtes intrinsisches Sphärenbildungspotenzial nachgewiesen werden. Eine hohe EdU-Inkorporation bestätigte, dass Sphären aus MACS- und FACS-sortierten Zellen infolge mitotischer Zellproliferation generiert wurden. Weiterhin konnte der

Stammzellcharakter in Sphären aller MACS- und FACS-sortierten Zellfraktionen mit geeigneten Stammzellmarkern dokumentiert werden.

IV) Bestimmung des Differenzierungspotenzials der Sphären aus distinkten Zelltypen des Corti'schen Organs

Sphären aus MACS-sortierten Zellen konnten im *in vitro* Differenzierungs-Assay epitheliale Zellverbände generieren, die tendenziell, aber nicht signifikant mehr Haar- und Stützzell-ähnliche Zellen enthielten.

V) Untersuchung von Sphärenbildungskapazität und Differenzierungspotenzial Corti'scher Zellen unter chemischer in vitro Stimulation

Die Untersuchung der Sphärenbildungskapazität von neonatalen Corti'schen Zellen der Maus (p0) mit und ohne segmentaler Mikropräparation in apikale, mittlere und basale Windung ergab im Vergleich zu postnatalen Corti'schen Zellen (p3-5) keine signifikanten Unterschiede. Das *in vitro* Differenzierungspotenzial konnte vergleichend für Sphären aus neonatalen Corti'schen Zellen (p0), aus segmental präparierten Zellen und aus Notch-Signalweg-inhibierten Zellen analysiert werden. Dabei konnte die Kultivierung von *post partem* entnommenen Zellen (p0) in Kombination mit der Inhibition des Notch-Signalwegs die *in vitro* Differenzierung in Haar- und Stützzellen signifikant steigern. Die zusätzliche, segmentale Trennung des Corti'schen Organs zur Notch-Signalweg-Inhibition ergab keine weitere Verbesserung der *in vitro* Differenzierung.

4.2 p75^{NTR}- und GLAST- exprimierende Stützzellen als Progenitorzellen von Haarsinneszellen und Stützzellen

Die Expression von zwei CD-Oberflächenmarker wurde in Stützzellen des Corti'schen Organs der Maus dargestellt. Dabei konnte der Haarzellmarker Calretinin wie in anderen Studien die Lokalisation der Stützzellen zu den äußeren und inneren Haarsinneszellen und damit den markierten Stützzelltyp identifizieren (Doetzlhofer et al., 2004, Chai et al., 2012). Zur Isolation von

neuronalen Stammzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen war der p75-Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR}, CD271, p75^{NGFR}) weniger interessant, mit dem CD-Marker konnten aber humane embryonale Stammzellen sowie Stammzellen der Neuralleiste markiert werden (Yuan et al., 2011). Im hörgeschädigtem Innenohr der Ratte wurde eine Korrelation zwischen der Expression von p75^{NTR} in Schwann'schen Zellen des Spiralganglions mit dem Prozess der Zellproliferation vermutet (Provenzano et al., 2011). Nach Hörschädigung trug eine gesteigerte Expression von p75^{NTR} auch zu einer Protektion von primären auditorischen Neuronen bei (Tan et al., 2010). Im Corti'schen Organ der Maus galt p75^{NTR} als Marker von Pillar- und Hensenzellen und wurde bereits zur Isolation und *in vitro* Kultivierung dieser Stützzellen verwendet (White et al., 2006). Die Sortierung von p75^{NTR+} Zellen war daher geeignet, um das intrinsische, regenerative Potential von verschiedenen Stützzellen der Maus zu untersuchen. Eine Genanalyse zeigte, dass die CD271⁺ Zellfraktion mit Monozyten und Makrophagen angereichert war, wobei jedoch methodische Unterschiede sowie das Vorhandensein anderer Zelltypen nicht ausgeschlossen wurde (Sinkkonen et al., 2011a). In dieser Arbeit konnte die Expression von p75^{NTR} in der äußeren Pillarzelle, den Deiterszellen und den Hensenzellen des Corti'schen Organs lokalisiert werden, welche sich mit den immunhistochemischen Studien von Sinkkonen et al., 2011 deckte. Andere Studien konnten die Expression von p75^{NTR} am Whollemount-Explantat des Corti'schen Organs nicht in Deiterszellen, aber ebenfalls in den äußeren Pillarzellen sowie den Hensenzellen nachweisen und für Zellsortierungen am transgenen Mausmodell verwenden (White et al., 2006, White et al., 2012).

Es ist bekannt, dass der Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST, EAAT1) die synaptische Transmission zwischen der inneren Haarsinneszelle und ihren afferenten Neuronen vermittelt (Chen et al., 2010). Die Expression von GLAST wurde anhand immunhistochemischer Studien mit HRP (Meerrettichperoxidase, HRP, horse raddish peroxidase) in unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstadien der Maus von untersucht (Jin et al., 2003). Dabei konnte demonstriert werden, dass GLAST in der basolateralen Membran von

Stützzellen der inneren Haarzellen, in immaturren Satellitenzellen des Spiralganglions und in Fibrozyten des spiralen Ligaments abhängig vom murinen Altersstadium exprimiert wurde (Jin et al., 2003). Auch in vestibulären Haarsinneszellen und Calyxsynapsen konnte GLAST bereits nachgewiesen werden (Dalet et al., 2012). Andere Studien konnten GLAST bisher nicht in der humanen Cochlea nachweisen, bestätigten aber, dass die Expression von GLAST in der murinen Cochlea in Satellitenzellen des Spiralganglions und in Stützzellen der inneren Haarsinneszelle lokalisiert war (Furness and Lehre, 1997, Ahmed et al., 2013). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Expression von GLAST wurde in den inneren Phalangenzellen (Stützzellen der inneren Haarzellen) sowie im Bereich des großen epithelialen Wulstes (GER) und damit in unmittelbarer Nachbarschaft zur inneren Haarsinneszelle identifiziert. Eine mögliche Antikörper-Markierung und fälschliche Sortierung von Zellen im Bereich des Spiralganglions und des spiralen Ligaments konnte durch mikropräparatorische Entfernung des Modiolus, des Spiralganglions sowie der lateralen Wand des Ductus cochlearis inklusive des spiralen Ligaments weitgehend ausgeschlossen werden.

Immunhistochemisch konnten in dieser Arbeit zwei distinkte, nicht-überlappende Stützzellpopulationen identifiziert werden, die vor allem durch ihre Nähe zu den äußeren bzw. zu den inneren Haarsinneszellen gekennzeichnet waren. Neben der Etablierung spezifischer Marker für anschließende Zellsortierungen mit MACS und FACS war in diesem Schritt wichtig, relevante Zellpopulationen für die Haar- und Stützzellregeneration einzugrenzen. Das Stammzellpotenzial der in dieser Arbeit markierten und sortierten Stützzellpopulationen konnte bereits in anderen Studien beschrieben werden. Die *in vitro* Transdifferenzierung in Haarsinneszellen wurde für alle Stützzelltypen des Corti'schen Organs anhand der Expression von p27 und für Pillar- und Hensenzellen anhand der Expression von p75^{NGFR} beschrieben (White et al., 2006, White et al., 2012). In anderen Studien wurden Lgr5 (Leucine rich repeat containing G-protein coupled receptor 5)-exprimierende Stützzellen des neonatalen Corti'schen Organs untersucht. Dabei konnte die Stützzellpopulation bestehend aus der 3. Deiterszelle, inneren Pillarzelle,

inneren Phalangenzelle und des lateralen GER oder bestehend aus der 3. Deiterszelle, inneren Pillarzelle, 4-5 Zellen des GER und der inneren Grenzzelle als Gruppe potenzieller sensorischer Progenitorzellen des Innenohres identifiziert werden (Chai et al., 2012, Shi et al., 2012). Die beiden Stützzellpopulationen, die in dieser Arbeit anhand ihrer Expression für p75^{NTR} und GLAST untersucht wurden, sind demnach Bestandteil der bereits beschriebenen, für die Haar- und Stützzellregeneration relevanten Zellpopulationen.

4.3 Beurteilung von MACS zur Stammzellenanreicherung

4.3.1 Effizienz von MACS

Zur Separierung von Stützzellpopulationen bot sich das Verfahren der Magnet-assoziierten Zellsortierung an, da es bereits zur Isolierung von anderen sensorischen und neuronalen Progenitorzellen verwendet wurde. Dies zeigten Studien, in denen retinale Zellen, Gliazellen und Zellen des sensorischen Riechepithels mittels MACS angereichert und auf ihre Stammzeleigenschaften untersucht wurden (Carter et al., 2009, Cizkova et al., 2009, Eberle et al., 2011, Ohnishi et al., 2013, Eberle et al., 2014). Bei der Sortierung von p75^{LN^{GF}R} (Low-affinity nerve growth factor receptor)-exprimierenden Schwann'schen Zellen der Maus wurde MACS als besonders schnelles und zuverlässiges Verfahren beschrieben (Vroemen and Weidner, 2003). Hier wurde jedoch festgestellt, dass MACS sich zwar für die direkte, positive Selektion von Schwann'schen Zellen eignete, die Aufreinigung einer Zellpopulation durch Depletion anderer Zellen (beispielsweise Fibroblasten) resultierte jedoch in eine geringere Spezifität und Sensitivität (Vroemen and Weidner, 2003). In einer anderen Arbeit gelang es mit MACS, aus Basalzellen des olfaktorischen Epithels der Ratte Progenitorzellen von Oligodendrozyten und Astrozyten zu isolieren und aus diesen in einer Serum-freien Kultur nach 3-4 DIV olfaktorische Sphären zu generieren (Ohnishi et al., 2013). Astrozyten gehören zu den Gliazellen des Zentralen Nervensystems, Stützzellen zu Gliazellen des Sinnesepithels. Zur

MACS-Zellsortierung wählten Ohnishi et al., 2013 GLAST als Marker und bestätigten die Verwendung von GLAST als Marker einer potenziellen Stammzellpopulation aus Stützzellen des Innenohrs. Das Verfahren der Zellsortierung und die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums bei Ohnishi et al., 2013 waren vergleichbar mit denen in dieser Arbeit. Unterschiedlich war die chemische Dissoziation der Sphären zu einer Einzelzellsuspension, die jeweils zu 5.000 Zellen pro Well in das Differenzierungs-Assay eingebracht wurden. Ohnishi et al. 2013 konnten dabei demonstrieren, dass sich olfaktorische Sphären aus MACS-sortierten Zellen *in vitro* zu Oligodendrozyten, jedoch nicht zu Astrozyten differenzieren können. Ohne genaue Quantifizierung bleibt jedoch unklar, welche Sphärenbildungskapazität und Effizienz bei MACS dabei erreicht wurden.

In Anlehnung an die Studien mit neuronalen und anderen sensorischen Zellen wurden in dieser Arbeit erstmalig Corti'sche Zellen der Maus durch das MACS-Verfahren angereichert. Der Anteil $p75^{NTR+}$ Zellen blieb in der MACS-sortierten $p75^{NTR+}$ Zellfraktion im Vergleich zur Kontrolle unverändert, reduzierte sich aber signifikant von der Kontrolle und von der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion zur $p75^{NTR-}/GLAST^{-}$ Zellfraktion. Der Anteil $GLAST^{+}$ Zellen konnte zwischen der Kontrolle und der $GLAST^{+}$ Zellfraktion nicht verändert werden, war aber in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion im Vergleich zur $GLAST^{+}$ Zellfraktion signifikant reduziert. Diese Ergebnisse sprechen daher nicht für eine effiziente Isolierung von $p75^{NTR+}$ und $GLAST^{+}$ Zellen. Eine Anreicherung durch das MACS-Verfahren konnte hier nur im Sinne einer Depletion von positiv-markierten Zellen erfolgen. Kritisch zu betrachten war der Gesamtanteil positiv-markierter Zellen von 2,6 % in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion und von 18,4 % in der $GLAST^{+}$ Zellfraktion. Während der Anteil $p75^{NTR-}/GLAST^{-}$ Zellen in der $p75^{NTR-}/GLAST^{-}$ Zellfraktion 98,4 % betrug, war der Anteil von $p75^{NTR-}/GLAST^{-}$ Zellen bzw. von unmarkierten Zellen mit 97,2 % in der $p75^{NTR+}$ Zellfraktion sowie mit 81,1 % in der $GLAST^{+}$ Zellfraktion ähnlich hoch. Es stellte sich die Frage, ob diese ungenügende Reinheit der sortierten Zellfraktionen mit einer ineffizienten Antikörperbildung zusammenhängen könnte. In geeigneten Kontrolluntersuchungen konnte sowohl eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers als auch eine

mögliche Autofluoreszenz der Zellen weitgehend ausgeschlossen werden. Nach immunhistochemischer Charakterisierung der Markerexpression an Kryoschnitten der murinen Cochlea ergaben sich quantitativ eine p75^{NTR}-Expression (1 äußere Pillarzelle, 3 Deiterszellen, 2 Hensenzellen) und eine GLAST-Expression (1 innere Phalangenzelle, etwa 5 Zellen des GER) in jeweils 6 Zellen pro Anschnitt des Corti'schen Organs. Unabhängig von der Länge des Corti'schen Organs müsste der Anteil positiv-markierter Zellen immunhistochemisch in einem ähnlich Verhältnis von 1:1 liegen. Bereits in der Kontrolle ließ sich dieses Verhältnis jedoch nicht bestätigen. Der Anteil an GLAST⁺ Zellen war in der Kontrollfraktion unsortierter Zellen mehr als 4-mal so hoch wie der Anteil an p75^{NTR+} Zellen. In der humanen Cochlea wurde GLAST in Fibrozyten statt in Stützzellen nachgewiesen (Ahmed et al., 2013). Auch Jin et al., 2003 beschrieb eine deutliche Expression von GLAST in Fibrozyten in diversen Bereichen der Cochlea. Während eine lediglich schwache Expression von GLAST in den Stützzellen der inneren Haarsinneszelle im Altersstadium p0 und p3 nachgewiesen wurde, wurde in der p0 Cochlea eine deutlichere Expression von GLAST im immaturren Bindegewebe, in Fibrozyten des spiralen Ligaments, in Fibrozyten des spiralen Limbus, in mesenchymalen Zellen unterhalb der Basilarmembran sowie in Fibrozyten an der perilymphatischen Seite der Reissner'schen Membran dokumentiert (Jin et al., 2003). Erst in Altersstadien ab p10 war die Expression von GLAST in Stützzellen der inneren Haarsinneszelle stärker ausgeprägt (Jin et al., 2003). Demnach würde GLAST erst von maturen Stützzellen exprimiert werden und in Stützzellen früherer Altersstadien wie p3-5 nur schwer nachweisbar sein. Gleichzeitig ist zu klären, ob der relativ hohe Anteil GLAST⁺ Zellen in der unsortierten Zellfraktion mit der Expression umliegender Fibrozyten zusammenhängt und ein hoher Anteil an Fibrozyten durch eine geeignete Optimierung der Mikropräparation verhindert werden könnte. Unabhängig davon mussten in den sortierten Zellfraktionen weiterhin Ursachen für die zu geringen Anteile an positiv-markierten Zellen gefunden werden. Da im Laufe des MACS-Protokolls sowie vor Kultivierung der Zellen häufig Zellaggregate beobachtet wurden, muss ein messtechnischer Fehler ausgeschlossen werden. MACS-sortierte Zellen wurden zur

Effizienzkontrolle durchflusszytometrisch analysiert. Wie in den Kontrolluntersuchungen aufgeführt, wurde die zu analysierende Zellpopulation P1 dabei unter optimierten Bedingungen definiert. Während größere Zellaggregate die Messkapillare nicht passieren konnten oder bereits durch den 70 µm Zellfilter vor der Messung entfernt wurden, wurden kleinere Zellaggregate und Zelldebris durch das Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht identifiziert und aus der Messung ausgeschlossen. Alle möglichen Zellaggregate aus MACS-sortierten Zellen würden anders als bei FACS in die Kultivierung eingehen, werden prozentual aber nicht durch durchflusszytometrische Analysen erfasst. Schließlich handelt es sich bei MACS nur um eine Teilanalyse der bereits erfolgten Zellsortierung, nicht um die Analyse und Sortierung aller zu kultivierenden Zellen selbst. Um dem nachzugehen könnte eine chemisch-mechanische Dissoziation der MACS-sortierten Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse sinnvoll sein. Ebenso müsste die Bildung von Zellaggregaten während des MACS-Protokolls quantitativ erfasst werden.

Neben der prozentualen Beurteilung des Reinheitsgrades MACS-sortierter Zellen, wurde der Zellverlust während des MACS-Protokolls beurteilt. Eine vergleichbare MACS-Sortierung an Zellen des Innenohres gibt es bisher nicht. Vroemen and Weidner, 2003 konnten jedoch aus einer Einzelzellsuspension, die aus 6-8 Nervenfragmenten der adulten Ratte (Nervus ischiadicus) mit jeweils etwa 35 mm Länge gewonnen wurde, eine 95 % reine Kultur aus Schwann'schen Zellen nach einmaliger MACS-Separierung erhalten. 860.000 Zellen gewonnen aus einer Ratte enthielten 400.000 p75^{LNGFR+} Zellen, von denen 370.000 Zellen durch MACS isoliert werden konnten (Vroemen and Weidner, 2003). Obwohl 92,5 % der positiv-markierten Zellen demnach separiert wurden, betrug der Verlust positiver Zellen 7,5 %, das einer Zellzahl von 30.000 entsprach. Während sich die Anzahl Corti'scher Zellen einer Maus jedoch kaum erhöhen lässt, wurden im oben beschriebenen Beispiel ca. 8,5-mal mehr neuronale Zellen aus einem 35 mm langem Nervensegment einer Ratte gewonnen. Bei dem geringeren Zellumfang des in dieser Arbeit eingesetzten Gewebes, würde jeglicher Zellverlust stärker ins Gewicht fallen. In

dieser Arbeit ergab die Errechnung der Zellausbeute pro Corti'sches Organ, dass die Zellsortierung mittels MACS insgesamt keinem methodenbedingten Zellverlust unterlag. Eine mögliche Beschränkung auf eine Zellfraktion würde aber einen Verlust der anderen Zellfraktionen bedeuten. Umso wichtiger ist daher die Gewinnung von stark angereicherten Zellfraktionen mit hohem Reinheitsgrad. Eine stabilere Antikörperbindung könnte hier von Vorteil sein, um der mehrfachen mechanischen Beanspruchung während des MACS-Protokolls standzuhalten. Ob die Effizienz der MACS-Sortierung durch geeignete Optimierungen des MACS-Protokolls gesteigert werden kann und Zellsortierungen mit hohen Reinheitsgraden auch an Suspensionen mit geringerer Zellzahl, wie zum Beispiel an Zellsuspensionen des Innenohres möglich sein werden, müsste weiter untersucht werden.

4.3.2 Sphärenbildung nach MACS

Trotz hohem Zellverlust und einer geringen Anreicherung, konnten MACS-sortierte Zellen aller Zellfraktionen in das *in vitro* Sphärenbildungs-Assay eingebracht werden. Das Stammzellpotenzial der generierten Sphären konnte anschließend qualitativ mit Markern dokumentiert werden, deren Relevanz für die Haar- und Stützzellregenerierung bereits beschrieben wurde. Dazu gehörte EdU, das von proliferierenden Zellen inkorporiert wurde (Buck et al., 2008, Chai et al., 2012). Der durchschnittliche Anteil von EdU⁺ Zellen an Sphären MACS-sortierter Zellen des murinen Corti'schen Organs der Maus (p3-5) konnte im Vergleich zur Kontrolle nicht weiter gesteigert werden. Die EdU-Inkorporation war jedoch mit 75,4 % vergleichbar mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die einen EdU⁺ Anteil von etwa 90 % angaben (Lin et al., 2009, Sinkkonen et al., 2011a). Es konnte damit gezeigt werden, dass die Sphären aller MACS-Zellfraktionen mitotischen Ursprungs waren. Nestin wurde als Marker otischer Progenitor- und Stammzellen in pluripotenten Stammzellen des murinen Innenohres sowie in maturen, und immaturren Corti'schen Zellen nach Lärmexposition beschrieben (Li et al., 2003, Chen et al., 2009, Watanabe et al., 2012). Andere Studien dokumentierten, dass das Onkogen Bmi1 von

neuronalen, retinalen und intestinalen Progenitor- und Stammzellen exprimiert wurde (Chatoo et al., 2010, Yadirgi et al., 2011, Yan et al., 2012). Jag1 gehört zu den 5 Liganden des Notch-Signalwegs, der maßgeblich an der Regulation von Zellschicksal, Zellproliferation und Zelltod während der embryonalen Entwicklung beteiligt ist (Kiernan et al., 2006). Der Nachweis von Jag1 in Sphären des postnatalen Corti'schen Organs der Maus ließ vermuten, dass der Notch-Signalweg auch in *in vitro* generierten Progenitorzellen eine Rolle spielt (Savary et al., 2008).

Neben der qualitativen Dokumentation des Stammzellcharakters der aus MACS-sortierten Zellen generierten Sphären, konnte in dieser Arbeit ein quantitativ höheres Sphärenbildungspotenzial in allen MACS-Zellfraktionen, vor allem in der p75^{NTR+} und GLAST⁺ Zellfraktion, dokumentiert werden. Die durchschnittliche Anzahl der generierten Sphären betrug 129,4 Sphären pro 900 kultivierte MACS-sortierte Zellen. Verglichen mit unsortierten Zellen dieser Arbeit, aus denen durchschnittlich 18,9 Sphären pro 900 Zellen generiert wurden, sowie mit unsortierten Zellen aus vorherigen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe, aus denen durchschnittlich 28 Sphären pro 900 Zellen generiert wurden, ergab sich eine Erhöhung der Sphärenbildung um das 5- bis 7-fache. In einer anderen Studie konnten aus 10⁴ unsortierten Corti'schen Zellen der Maus (p3) nach 6 DIV ohne Wachstumsfaktoren 4 ± 2,1 Sphären und mit EGF/TGFα-Applikation 41,3 ± 3,5 Sphären gewonnen werden (Savary et al., 2008). Umgerechnet auf die Kultivierungseinheit in dieser Arbeit entspricht dies 0,4 Sphären ohne und 3,7 Sphären mit EGF/TGFα-Applikation pro 900 Zellen. Diensthuber et al., 2009 kultivierten Zellen aus 6-8 Corti'schen Organen und entnahmen 50 Sphären zur anschließenden Zellpropagation von bis zu 10 Mal. Die daraus resultierte Sphärenbildungskapazität betrug durchschnittlich 70-80 Sphären pro 10⁴ Zellen und demnach 6,3 bis 7,2 Sphären pro 900 Zellen (Diensthuber et al., 2009). Sensorische epitheliale Zellen, die aus dem adulten Utrikulus der Maus gewonnen wurden, erreichten unter Zugabe von EGF und IGF-1 eine Sphärenbildungskapazität von 68 ± 24 Sphären pro 10⁵ Zellen, umgerechnet also von maximal 0,6 Sphären pro 900 kultivierte Zellen (Li et al., 2003). Oshima et al. 2007 verglichen die Sphärenbildung von vestibulären und

cochleären Zellen in einem transgenen Mausmodell. Für Corti'sche Zellen der Maus gaben sie eine Sphärenbildungskapazität von 8 Sphären pro 101 Zellen, umgerechnet also von ca. 71,3 soliden Sphären pro 900 kultivierte Zellen nach 7 DIV an (Oshima et al., 2007). In dieser Arbeit konnte nach MACS auch die relative Sphärenbildungskapazität pro Corti'sches Organ in der GLAST⁺ und in der p75^{NTR}-/GLAST⁻ signifikant gesteigert werden. Es stellte sich hier die Frage, was für die signifikant höhere Sphärenbildungskapazität nach MACS-Sortierung ursächlich war. Eine Erklärung wäre die tatsächlich höhere Anzahl an Progenitorzellen und ein höheres Stammzellpotenzial dieser Progenitorzellen in den MACS-sortierten Zellfraktionen. Durch die geringe Anreicherung und Reinheit der MACS-Zellfraktionen wurde der größte Anteil der positiv-markierten Zellen jedoch als p75^{NTR}-/GLAST⁻ identifiziert. Da der proliferations-steigernde Effekt sich nicht ausschließlich durch den Anteil positiv-markierter Zellen beschreiben ließ, war eine proliferations-stimulierende Wirkung während des MACS-Verfahrens selbst nicht ausgeschlossen. 2012 wurde postuliert, dass Zellaggregation gegenüber einer Einzelzellsuspension überlegen sei, um die *in vitro* Viabilität, Proliferation und Differenzierung von Zellen zu unterstützen (Bayoussef et al., 2012). Da Zellaggregate in MACS-sortierten Zellfraktionen beobachtet wurden, wurde in einem Versuchsansatz dieser Arbeitsgruppe eine mögliche Steigerung der Zellaggregation durch die MACS-Trennsäule untersucht und tendenziell widerlegt (Daten nicht veröffentlicht). Es bestand zusätzlich die Möglichkeit, dass Zellaggregate während der manuellen Quantifizierung nicht in ihrer exakten Zellzahl erfasst wurden. Resultat wäre eine nach oben verfälschte Zellkonzentration bei der Kultivierung der Zellen zu Beginn des Sphärenbildungs-Assays. Eine zusätzliche Zelldissoziation vor Quantifizierung und Kultivierung könnten hier eine exakte Quantifizierung der größeren Zellaggregate erleichtern. Weiterhin bleibt zu klären, ob die mechanische Beanspruchung der Corti'schen Zellen durch mehrfache Resuspension und Zentrifugation während des MACS-Protokolls eine spezielle Umgebung schaffte, das innerhalb der Zellaggregate die Proliferationsfähigkeit otischer Progenitorzellen gesteigert hat.

4.3.3 Zelldifferenzierung nach MACS

Die hohe Sphärenanzahl nach MACS ermöglichte die Einbringung der Sphären in das *in vitro* Differenzierungs-Assay sowie die qualitative und quantitative Auswertung der differenzierten epithelialen Sphären. Im Rahmen der qualitativen Analyse war es gelungen, den Differenzierungsgrad der Patches anhand geeigneter Markerexpression zu dokumentieren. MyosinVIIa stellte dabei einen etablierten Marker dar, der eine Zelldifferenzierung in Richtung Haarsinneszelle bestätigte. Dies konnte in Studien bereits nach Beeinflussung von relevanten Signalwegen, nach Isolierung von humanen fetalen Stammzellen oder distinkten Stützzelltypen *in vivo* und *in vitro* demonstriert werden (Chen et al., 2009, Jeon et al., 2011, Sinkkonen et al., 2011a, Chai et al., 2012, Liu et al., 2012a, Shi et al., 2012, Waldhaus et al., 2012). Es wurde postuliert, dass differenzierende Haarsinneszellen mit Sox2-exprimierenden Stützzellen assoziiert sind und die Expression von Sox2 zur Entwicklung des sensorischen Epithels notwendig ist (Kiernan et al., 2005b). Weiter wurde beschrieben, dass Sox2 in Progenitorzellen von Haar- und Stützzellen, aber nicht von muren Haarzellen exprimiert wird (Dabdoub et al., 2008). In Stützzellen wurde Sox2 dagegen bis in adulte Altersstadien nachgewiesen (Hume et al., 2007, Waldhaus et al., 2012). Die nukleäre Expression von Sox2 wurde daher als zuverlässiger Marker verwendet, um eine frühe Differenzierung in Richtung Stützzelle aufzuzeigen (Chen et al., 2009, Chai et al., 2012, Liu et al., 2012a, Waldhaus et al., 2012). Neben E-Cadherin als Marker epithelialer Zellen, diente S100 als zusätzlicher Stützzellmarker, dessen zytoplasmatische Expression bereits *in vivo* und *in vitro* bestätigt wurde (White et al., 2006, Waldhaus et al., 2012). Der Nachweis einer positiven Markierung für FM1-43 belegte, dass eine funktionelle Ausreifung von *in vitro* differenzierten Haarzellen mit Ausbildung von MET-Kanälen möglich ist (Chen et al., 2013). Durch die genannten Marker konnte die *in vitro* Differenzierung der Zellen in Haar- und Stützzellen sowie der epitheliale Charakter der generierten differenzierten Sphären dokumentiert werden. Für die quantitative Auswertung der *in vitro* differenzierten Haar- und Stützzellen wurde die Expression der Marker MyosinVIIa und Sox2 verwendet. Hierbei ergaben sich im Vergleich zur

unsortierten Kontrolle in keiner der MACS-sortierten Zellfraktionen signifikante Unterschiede im Differenzierungsverhalten zu Haarzell-ähnlichen und Stützzell-ähnlichen Zellen. Eine Erklärung war, dass sich die MACS-Zellfraktionen zwar in der Proliferationskapazität, aber nicht in ihrem Differenzierungspotenzial von Kontrollzellen unterschieden. Eine andere Erklärung war die unzureichende Anreicherung durch MACS, die keine aussagekräftige Quantifizierung der differenzierten Sphären erlaubte. Negativ-markierte und damit undefinierte Zellen machten den Großteil der sortierten Zellfraktionen aus. Der Reinheitsgrad der MACS-Zellfraktionen war demnach so gering, dass keine Unterschiede in der *in vitro* Differenzierung zu erwarten war. Wie bereits an olfaktorischen Sphären der Ratte gezeigt wurde, könnte auch eine zusätzliche Zelldissoziation vor dem Differenzierungs-Assay eine genauere Quantifizierung und Kultivierung der Zellen (von Sphären) ermöglichen sowie das Differenzierungspotenzial selbst verbessern (Ohnishi et al., 2013).

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass verglichen mit der bisherigen Literatur ein höheres *in vitro* Proliferationspotenzial distinkter Zellpopulationen der postmortalen Maus nach MACS-Sortierung dokumentiert werden konnte. Für eine zuverlässige Evaluation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung müsste das Verfahren der MACS-Zellsortierung für Corti'sche Zellen der Maus insbesondere aufgrund der geringen Zellausbeute und Reinheit der sortierten Zellfraktionen weiter optimiert werden. Die Relevanz der beschriebenen Stützzellpopulationen für die *in vitro* Regeneration von Haar- und Stützzellen konnte daher nicht ausreichend beurteilt werden. Dennoch ließ sich zeigen, dass das Corti'sche Organ über ein intrinsisches Stammzellpotenzial verfügt, um aus Progenitorzellen Haar- und Stützzellen zu regenerieren.

4.4 Beurteilung von FACS zur Stammzellanreicherung

4.4.1 Effizienz von FACS

Aufgrund des geringen Reinheitsgrades sortierter Zellen nach MACS-Zellsortierung wurde in dieser Arbeit die Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung etabliert, das bereits zur Isolierung reiner Stützzellpopulationen des murinen Corti'schen Organs verwendet wurde. Da FACS die manuelle Einstellung der Präzision bei der Zellsortierung erlaubte, wurde bei FACS-Sortierungen dieser Arbeit die maximale Reinheit auf Kosten der Zellausbeute gewählt. Während die prozentualen Angaben bei MACS zur durchflusszytometrischen Beurteilung des Reinheitsgrades von bereits MACS-sortierten Zellfraktionen dienen, erlaubten die prozentualen Angaben bei FACS durch den höchsten Reinheitsgrad einen direkten Rückschluss auf den positiv-markierten Zellanteil der heterogenen Primärkultur. Mit denselben Markern, die zuvor für die MACS-Sortierung etabliert wurden, konnten mittels FACS-Sortierung 4,6 % als p75^{NTR+} und 9,1 % der vereinzelter Primärkultur als GLAST⁺ Zellen identifiziert und isoliert werden. Der Anteil an GLAST⁺ Zellen konnte nur knapp zur Hälfte (47,2 %) aus der primären Zellpopulation isoliert werden und stellte damit die Bindungsstabilität der verwendeten Antikörper in Frage. Der Anteil p75^{NTR+} Zellen war dagegen vergleichbar mit der Kontrollfraktion und bestätigte eine erfolgreiche Isolierung der prozentual enthaltenen p75^{NTR+} Stützzellen. Der tatsächliche Reinheitsgrad von FACS-sortierten Stützzellpopulationen des murinen Corti'schen Organs konnte in anderen Studien durch zusätzliche durchflusszytometrische Analyse oder durch den Nachweis einer Stützzellspezifischen Genexpression (z.B. S100A1, Hes5, Jag1, p27^{Kip1}, Lgr5, Sox2) mittels quantitativer PCR mit 84 %, 94 % bzw. über 95 % bestätigt werden (White et al., 2006, Sinkkonen et al., 2011a, Chai et al., 2012). Auffällig war, dass selbst mit hohem Reinheitsgrad der Zellsortierung der Anteil GLAST⁺ Zellen wie bei der MACS-Sortierung höher war als der Anteil p75^{NTR+} Zellen. Dies ließ zu vermuten, dass entweder die Antikörperbindung für die mechanische Beanspruchung während der FACS-Sortierung insuffizient war, dass die bereits beschriebene Markierung von Fibrozyten durch GLAST hier

eine Erklärung bietet oder dass die Expression von $p75^{NTR+}$ wider Erwarten auf weniger Zellen beschränkt war. Letzteres würde Studien von White et al., 2006 bestätigen, die das intrinsische Regenerationspotenzial von Stützzellen der Maus nach FACS untersuchten und eine $p75^{NTR}$ -Expression ausschließlich in Pillar- und Hensenzellen nachgewiesen haben. Die Anzahl der theoretisch $p75^{NTR+}$ Zellen würde sich demnach um die Deiterszellen reduzieren und die geringeren MACS- und FACS-angereicherten $p75^{NTR+}$ Zellanteile in dieser Arbeit erklären. Um die Eignung der FACS-Sortierung für die 3R-Forschung zu ermitteln, wurden die absolute Anzahl isolierter Zellen mit unsortierten Zellen eines Corti'schen Organs (51047,6 Zellen) verglichen. Absolut konnten 46,4 $p75^{NTR+}$, 130,9 $GLAST^+$ und 1236,6 $p75^{NTR-}/GLAST^-$ Zellen pro eingesetztes Corti'sches Organ isoliert werden, was einem Zellverlust von durchschnittlich 74,9 % entsprach. Diese Angabe konnte in der Literatur trotz mehrfach beschriebener FACS-Sortierung von Corti'schen Zellen der Maus nicht gefunden werden, sodass sich die Frage nach dem absoluten Zellverlust in dieser Arbeit erstmalig stellte. Durch den geringen Reinheitsgrad nach MACS-Sortierung und den hohen Zellverlust nach FACS-Sortierung war es begründet, die Ursache im Protokoll zur Zellmarkierung zu suchen, das Teil beider Verfahren war. Die mechanische Beanspruchung durch wiederholte Zentrifugation, Absaugen und Resuspension der Zellen in insgesamt 6 Zyklen bzw. 9 Zyklen (bei der Gewinnung $GLAST^+$ Zellen nach MACS) mit anschließender Zellsortierung war möglicherweise für den hohen Zellverlust mitverantwortlich. Einerseits bestand die Gefahr, dass zu viele Zellen manuell direkt abgesaugt wurden. Andererseits müsste geklärt werden, ob das Protokoll zur Zellmarkierung höhere Anteile an Zelldebris, apoptotische oder deformierte Zellen und Zellaggregate verursachte, die vom FACS-Gerät zur Optimierung der Zellsuspension von der Zellsortierung ausgeschlossen und verworfen wurden.

4.4.2 Sphärenbildung nach FACS

Trotz Zellverlust konnten FACS-sortierte Zellen in das *in vitro* Sphärenbildungs-Assay eingebracht werden. Im Vergleich zu MACS-sortierten Zellen und zu unsortierten Zellen war die Sphärenbildungskapazität FACS-sortierter Zellen mit durchschnittlich 5 Sphären pro 900 kultivierte Zellen deutlich reduziert. Sinkkonen et al., 2011 untersuchten das *in vitro* Proliferations- und Differenzierungsverhalten von 5 FACS-sortierten Stützzellpopulationen der Maus (p3), bei denen die Sphärenbildungskapazität zwischen 15,3 Sphären und 0,2 Sphären pro 900 kultivierte Zellen (5,1 und 0,1 Sphären pro 300 Zellen) lag. Die höchste Sphärenbildungskapazität wurde von $p75^{NGFR+}$ ($p75^{NTR}$, CD271) und allen Stützzellen (CD326, EpCAM, epithelialer Zelladhäsions-Molekül), von Zellen des großen epithelialen Wulstes sowie von Neurit-assoziierten Zellen (CD146, MCAM, Melanom Zelladhäsions-Molekül) erreicht (Sinkkonen et al., 2011a). Dabei konnten in $p75^{NGFR+}$ FACS-sortierten Zellen wider Erwarten keine genetischen Merkmale für Pillar- und Hensenzellen gefunden werden, obwohl immunhistochemische Studien dies vermuten ließen (Sinkkonen et al., 2011a). Das *in vitro* Verhalten von $p75^{NTR+}$ Zellen wurde in dieser Arbeit auf ähnliche Weise untersucht. Die beschriebene Sphärenbildungskapazität konnte mit den hier verwendeten Methoden jedoch nicht erreicht werden. In anderen Studien wurden FACS-sortierte Zellen zur Generierung von Neurosphären kultiviert (Shi et al., 2012). Die Sphärenbildungskapazität pro Corti'sches Organ und damit die Effizienz der Sphärenbildung wurde dabei jedoch nicht dokumentiert. Es stellte sich die Frage, ob die Sortierung im FACS-Gerät selbst die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der Zellen bedingte. Vor diesem Hintergrund wurde die Viabilität der FACS-sortierten Zellen mittels Propidiumiodid Markierung von dieser Arbeitsgruppe ansatzweise untersucht (Daten nicht veröffentlicht). Tendenziell stellte sich dabei heraus, dass weniger die Viabilität, sondern die Funktionalität der Zellen bereits vor FACS-Sortierung eingeschränkt wurde. Die Fähigkeit zur *in vitro* Sphärenbildung könnte demnach während der Schritte der Zellmarkierung oder durch die effizientere Vereinzelnung der Zellen während des FACS-Protokolls reduziert worden sein. Letzteres würde dafür sprechen, dass

Zellaggregate, wie bei MACS-sortierten Zellen beobachtet, einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation hatten. Diese Tendenz müsste jedoch weiter evaluiert werden, um die reduzierte Proliferationsfähigkeit FACS-sortierter Zellen und die gesteigerte Proliferationsfähigkeit MACS-sortierter Zellen zuverlässig erklären zu können. Trotz eingeschränkter Funktionalität FACS-sortierter Zellen, konnte zumindest das qualitative Stammzellpotenzial der Stützzellsubpopulationen durch die Expression von Nestin in allen FACS-Zellfraktionen nachgewiesen werden. Zusätzlich bestätigte die Kolo-kalisation von Nestin⁺ Zellen mit EdU den mitotischen Ursprung der Sphären. Die EdU-Inkorporation konnte im Vergleich zur Kontrolle nicht weiter gesteigert werden, war dabei aber vergleichbar mit anderen Studien mit FACS-sortierten EdU- oder BrdU-inkorporierten Zellen (Sinkkonen et al., 2011a, Shi et al., 2012).

4.4.3 Zelldifferenzierung nach FACS

Durch die geringe Anzahl an generierten Sphären, war eine Auswertung des Differenzierungspotenzials nach FACS-Sortierung nicht möglich. White et al., 2006 untersuchten die Transdifferenzierung distinkter Stützzellpopulationen, die nach FACS-Sortierung 6 DIV auf embryonalen Mesenchymzellen (E13,5) kultiviert wurden. Dabei konnten 870 p27-GFP⁺ Stützzellen unter Inhibition von p27^{Kip1} (zyklinabhängiger Kinase-Inhibitor) epitheliale Patches mit 25 ± 10 Haarzell-ähnlichen Zellen (MyosinVI⁺) bilden. Im Rahmen derselben Studie wurden 500 FACS-sortierte p75^{NGFR}-exprimierende Pillar- und Hensenzellen zur *de novo* Differenzierung in 54 ± 25 Haarzell-ähnliche Zellen (Math1-GFP⁺) gebracht (White et al., 2006). Sinkkonen et al., 2011 kultivierten FACS-isolierte Zelltypen für eine ähnliche Kultivierungsdauer von 3-5 DIV auf mitotisch inaktivierten Zellen aus der Basalmembran des Corti'schen Organs des Hühnchens. Wie in dieser Arbeit musste die CD-Markerexpression vor Zellsortierung durch immunhistochemische Studien bestätigt werden. Obwohl die Expression von dem p75^{NTR} (p75^{NGFR}, CD271) immunzytologisch nachgewiesen wurde, ergab eine Genanalyse, dass die FACS-sortierte Zellfraktion mit Monozyten und Makrophagen statt mit Pillar- und Hensenzellen

angereichert war (Sinkkonen et al., 2011a). In der Stützzellfraktion mit einer geringen CD271-Expression wurde dagegen mRNA nachgewiesen, die für p75^{NGFR} codiert (Sinkkonen et al., 2011a). Es wurde vermutet, dass Unterschiede in der enzymatischen Zelldissoziation oder der Primär- oder Sekundärantikörper für die unzureichende Spezifität von p75^{NGFR} ursächlich waren (Sinkkonen et al., 2011a). Diese Beobachtung deckte sich mit der geringen relativen und absoluten Anreicherung von p75^{NTR+} Zellen durch MACS und FACS in dieser Arbeit. Gleichzeitig würde eine ineffiziente Antikörperbindung das Ungleichgewicht zwischen p75^{NTR+} und GLAST⁺ Zellen bereits in der unsortierten Primärkultur erklären. Die geringe Spezifität des CD-Markers kam auch für Sinkkonen et al., 2011 unerwartet, da von White et al., 2006 bereits im Voraus eine spezifische Expression von p75^{NGFR} in Pillar- und Hensenzellen des murinen Corti'schen Organs beschrieben wurde. Bezüglich des *in vitro* Verhalten der FACS-sortierten nicht-sensorischen und sensorischen Zellpopulationen wurde postuliert, dass eine hohe Proliferationskapazität nicht mit einem hohen Differenzierungspotenzial korrelieren muss (Sinkkonen et al., 2011a). Eine Diskrepanz zwischen *in vitro* Proliferation und Differenzierung zeigten die Ergebnisse der MACS-Sortierung mit einer isolierten Steigerung der Proliferationsfähigkeit. Das Differenzierungspotenzial unterschied sich dagegen nur innerhalb der MACS-Zellfraktionen, nicht aber im Vergleich zur Kontrolle. Zusätzlich wurde von Sinkkonen et al., 2011 beschrieben, dass Zellen im Bereich des GER die höchste Proliferationskapazität aufwiesen, sich aber seltener in Haarzell- und Stützzell-ähnliche Zellen differenzieren ließen. Diese Beobachtung würde für ein geringes Differenzierungspotenzial von GLAST⁺ Zellen sprechen, da die Expression von GLAST im Bereich des GERs nachgewiesen wurde. In dieser Arbeit schienen GLAST⁺ Zellen besser zur *in vitro* Differenzierung von Haarsinneszellen geeignet zu sein als p75^{NTR+} und p75^{NTR-}/GLAST⁻ Zellen. Die Zellpopulation, die über ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotenzial verfügte, waren Stützzellen und Zellen des LER (Sinkkonen et al., 2011a). Unter Annahme, dass die Antikörperbindung zur Untersuchung p75^{NTR}-exprimierender Zellen nicht effizient genug war, konnten Stützzellen im Bereich der äußeren Haarsinneszellen sowie des LER nicht}

untersucht werden. Dies müsste unter optimierten Bedingungen nachgeholt werden, um das *in vitro* Verhalten dieser Stützzellpopulationen mit den Methoden dieser Arbeit zuverlässig evaluieren zu können. Andere Studien konnten durch die Expression des Markers Lgr5 zumindest die 3. Deiterszelle, die sich im Bereich des LER befindet, in ihre FACS-sortierten Zellfraktionen miteinschließen (Chai et al., 2012, Shi et al., 2012). Chai et al., 2012 kultivierten Lgr5-exprimierende Zellen auf Mitomycin-inaktivierten Mesenchymzellen aus dem embryonalen Utrikulus des Hühnchens und konnten innerhalb von 10 DIV epitheliale Patches generieren. Shi et al., 2012 bestätigten im gleichen transgenen Tiermodell, dass Lgr5⁺ Zellen des Corti'schen Organs der Maus otische Progenitorzellen darstellten, die *in vitro* und *in vivo* mitotisch oder über direkte Transdifferenzierung zur Regeneration von Haarsinneszellen fähig waren.

Worin bestand der Unterschied zwischen den genannten Studien und den in dieser Arbeit verwendeten Methoden?

- Mittels FACS wurden Zellpopulationen eines transgenen Mausmodells isoliert, die Zellmarker und Fluoreszenzsignal intrazellulär koexprimierten. Eine zusätzliche Antikörpermarkierung der dissoziierten Zellen war zur Zellsortierung daher nicht nötig (White et al., 2006, Chai et al., 2012, Shi et al., 2012, White et al., 2012).
- Durch Verwendung transgener Tiere konnten Haarzellen anhand ihrer Math1-GFP-Expression aus der Zellsuspension eliminiert werden. Dadurch konnte eine Kultivierung von reinen nicht-sensorischen Corti'schen Zellen gesichert und eine fälschliche Quantifizierung von „überlebenden“ Haarsinneszellen ausgeschlossen werden. Gleichzeitig sprach eine Math1-GFP-Expression der *in vitro* generierten Haarzell-ähnlichen Zellen für eine *de novo* Differenzierung (White et al., 2006, Sinkkonen et al., 2011a).

- Die Beschichtung der Zellplatten bestand aus Ammenzellen (Nährzellen), die für ihren stimulierenden Effekt auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung von sensorischen Progenitorzellen der embryonalen Cochlea bekannt waren (Doetzlhofer et al., 2004). In den beschriebenen Studien wurden die FACS-sortierten Zellen mit embryonalen Mesenchymzellen aus dem Utrikulus des Hühnchens (E13,5) oder auf mitotisch-inaktivierten Zellen der Basilarmembran des Corti'schen Organs vom Hühnchen kultiviert (White et al., 2006, Sinkkonen et al., 2011a, Chai et al., 2012, Oujii et al., 2012).
- Zur FACS-Sortierung wurden Zellen aus postnatalen Mäusen im Altersstadium p0-3 verwendet (White et al., 2006, Sinkkonen et al., 2011a, Chai et al., 2012, Shi et al., 2012). Diese früheren Altersstadien schienen mehr Progenitorzellen zu enthalten, weshalb das Alter der Maus im Versuchsansatz mit Notch-Signalweg-Inhibition auf p0 reduziert wurde.
- Die *in vitro* Zellproliferation und Zelldifferenzierung von FACS-sortierten Zellen wurden in den genannten Studien unabhängig voneinander untersucht, sodass die Zellen entweder zur Sphärenbildung oder zur Ausbildung von differenzierten Patches angeregt wurden (Sinkkonen et al., 2011a, Shi et al., 2012). Andere Studien beschränkten sich auf die Evaluation der direkten Transdifferenzierung von Stützzellen in Haarzell-ähnliche Zellen ohne vorherige Proliferation bzw. mitotische Sphärenbildung (White et al., 2006, Chai et al., 2012).
- Während Shi et al., 2012 das Kulturmedium mit fetalem Kälberserum versetzten, wurde bei Sinkkonen et al., 2011 Serum-freies Medium verwendet. Die verwendeten Mesenchymzellen aus dem Utrikulus zur Beschichtung der Zellkammern wurden jedoch unter Bedingungen mit fetalem Kälberserum gewonnen (Sinkkonen et al., 2011a). Eine alleinige

Verwendung von Laminin zur Beschichtung von Zellkammern wurde ebenfalls beschrieben (Shi et al., 2012).

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Modells des Innenohrs mit Haar- und Stützzell-ähnlichen Zellen. Dabei sollte gemäß der 3R-Forschung das Gewebe von Versuchstieren möglichst effizient verwendet werden. Eine vorherige Zellproliferation mit vermehrter Sphärenbildung war daher besser geeignet, um das Ausgangsmaterial aus einem Versuchstier für die *in vitro* Zelldifferenzierung optimal zu steigern. Zudem sollte das etablierte *in vitro* Modell als Ausgangspunkt von Wirkstoffscreening-Verfahren verwendet werden. Unter Verwendung von fetalem, embryonalem oder transgenem Gewebe bzw. Zellen wären die Effekte der Wirkstoffe nicht ohne Wechselwirkungen mit dem verwendeten Fremdgewebe beurteilbar. Auch die Verwendung von embryonalen Altersstadien kam nicht in Frage, da das Wirkstoffscreening zur Erforschung von Therapiemöglichkeiten am postnatalen bzw. adulten Innenohr dienen sollte.

Zusammenfassend war es gelungen, mit dem Verfahren der FACS-Zellsortierung Zellpopulationen mit einer Reinheit von 80-100 % zu isolieren und eine Sphärenbildung *in vitro* zu induzieren. Im Vergleich zu unsortierten Zellen des Corti'schen Organs der Maus konnte jedoch keine ausreichende Verbesserung der Zellproliferation und -differenzierung erreicht werden. Durch den geringen Reinheitsgrad bei MACS sowie dem hohen Zellverlust bei FACS waren beide Verfahren nicht dazu geeignet, sich effektiv in ein *in vitro* Modell des Innenohres einzubringen und die Prinzipien der 3R-Forschung zu erfüllen. Es mussten daher alternative Ansätze gefunden und für die *in vitro* Kultur vom Innenohr der Maus etabliert werden.

4.5 Chemische Stimulation zur Beeinflussung des Zellschicksals

4.5.1 Notch-Signalweg-Inhibition während der Zelldifferenzierung

Der Notch-Signalweg ist an der Regulation von Zellproliferation und Zellschicksal beteiligt. Es wurde vermutet, dass die Aktivität des Notch-Signalwegs mit der Regenerationsfähigkeit von Haarsinneszellen korreliert und während der embryonalen Entwicklung der Maus und des Hühnchens für die typische Morphologie des Corti'schen Organs aus alternierenden Haar- und Stützzellen verantwortlich ist (Kelley, 2006, Kiernan et al., 2006, Takebayashi et al., 2007, Pan et al., 2010). Dieser Effekt beinhaltet den Einfluss auf direkt benachbarte, parakrine Zellen, die sich in frühen embryonalen Altersstadien gemäß einer sogenannten lateralen Induktion zu prosensorischen Progenitorzellen entwickeln (Pan et al., 2010, Liu et al., 2012b). Eine fehlende Aktivität des Notch-Signalwegs in dieser Entwicklungsphase führte in Studien zu Fehlbildungen des prosensorischen Organs (Kiernan et al., 2006, Munnamalai et al., 2012). In späteren Altersstadien aktivieren Notch-Liganden von differenzierenden Haarsinneszellen den Notch-Signalweg in benachbarten Zellen und beeinflussen diese im Sinne der lateralen Inhibition: Die benachbarten Zellen werden in ihrer Proliferationsfähigkeit und Differenzierung zu Haarsinneszellen gehemmt, wie bereits an Stützzellen von Vögeln gezeigt wurde (Daudet and Lewis, 2005, Stone and Cotanche, 2007). Wird die Expression von Notch-Liganden unterdrückt, fehlt die lateral inhibierende Wirkung des Notch-Signalwegs, sodass mehr Haarsinneszellen auf Kosten der benachbarten Stützzellen im Mausmodell beobachtet wurden (Kiernan et al., 2005a). Beide Wirkmechanismen vom Notch-Signalweg scheinen daher essenziell für die Entwicklung des Corti'schen Organs zu sein, zum einen für die Anlegung des prosensorischen Organs, zum anderen für die mosaik-ähnliche Organisation von Stütz- und Haarsinneszellen. Für die Stimulation der Haarzellendifferenzierung ist in erster Linie der Mechanismus der lateralen Inhibition interessant. Die Inhibition des Notch-Signalwegs in Corti'schen Progenitorzellen während der Differenzierungsphase verspricht eine gezielte Beeinflussung des Zellschicksals. Isolierte Stammzellen aus dem Utrikulus des

murinen Innenohres (p3) zeigten unter Notch-Signalweg-Inhibition bereits Eigenschaften von Haarzell-Progenitorzellen (Jeon et al., 2011). Eine Stimulation der Haarzellregeneration unter Inhibition des Notch-Signalwegs konnte *in vitro* an Explantaten des Corti'schen Organs (p1-3) der Maus und *in vivo* an adulten Mäusen (p28) nach akustischem Trauma demonstriert werden (Mizutari et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte der Notch-Signalweg während des etablierten Differenzierungs-Assays *in vitro* inhibiert und differenziert nach segmentalen Abschnitten (Apex, Mitte, Basis) des Corti'schen Organs vergleichend untersucht werden. In einem *in vitro* Screening-Verfahren wurde der stimulierende Effekt von verschiedenen γ -Sekretase-Inhibitoren anhand von Sphären des murinen Utrikulus (p1-3) untersucht (Mizutari et al., 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass der in dieser Arbeit verwendete γ -Sekretase-Inhibitor L-685458 die *in vitro* Differenzierung in Haarzell-ähnliche Zellen tendenziell steigern konnte, anderen Notch-Inhibitoren jedoch unterlegen war (Mizutari et al., 2013). Zine et al., 2000 konnten den Notch-Signalweg durch Anlagerung von Antisense-Oligonukleotiden hemmen und postulierten, dass die Aktivität und damit die effektive Inhibition des Notch-Signalwegs einem baso-apikalen Gradienten entlang des Corti'schen Organs folgt und vom Altersstadium der Maus abhängig ist. Die Generierung von Sphären aus Corti'schen Zellen der Maus im frühen postnatalen Alter p1 (8 Sphären pro 100 Zellen bzw. 72 Sphären pro 900 Zellen) zeigte zusätzlich, dass das postnatale Stammzellpotenzial in den ersten Lebenstagen am höchsten war (Oshima et al., 2007). Die *in vitro* Inhibition des Notch-Signalwegs im Explantat des Corti'schen Organs induzierte die Bildung von supernumerischen Haarzellen bis zum Altersstadium p3 (Zine et al., 2000). In dieser Arbeit wurde das altersabhängige und segmentabhängige Proliferations- und Differenzierungspotenzial vergleichend untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Sphärenbildungskapazität ohne zusätzliche chemische Stimulation weder von der Reduktion des Altersstadiums, noch von der separaten Kultivierung der unterschiedlichen Segmente des Corti'schen Organs beeinflusst wurde. Das *in vitro* Differenzierungspotenzial zu Haarzell- und Stützzellähnlichen Zellen

konnte dagegen durch die Reduktion des Altersstadiums auf p0 in Kombination mit einer Notch-Signalweg-Inhibition signifikant gesteigert werden. Die Separierung in unterschiedliche Segmente des Corti'schen Organs zeigte, dass die *in vitro* Differenzierung zu Haar- und Stützzellen in apikalen *post partem* entnommenen Corti'schen Zellen verbessert, mit einer zusätzlichen Notch-Inhibition aber nicht weiter stimuliert werden konnte. Zusätzlich ergab sich hinsichtlich der 3R-Prinzipien ein Nachteil: Bei Überlegenheit eines Corti'schen Segments würde pro Corti'sches Organ der Maus jeweils nur ein Teil des Corti'schen Organs kultiviert werden, was einen Zellverlust von 2/3 bereits bei Präparation bedeuten würde. Zine et al., 2000 postulierten, dass die Haarzellendifferenzierung in Ratten im Altersstadium E20 in der basalen Windung beginnt und die apikale Windung im Altersstadium p0 erreicht. In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass apikale Zellen besser zur *in vitro* Differenzierung geeignet sind als andere Segmente des Corti'schen Organs. Das Ansprechen auf eine Notch-Inhibition und damit das Differenzierungspotenzial war jedoch nicht höher als bei nicht-separierten p0 Kontrollzellen. Demzufolge ist zu vermuten, dass die Entwicklung des Corti'schen Organs nach einem baso-apikalen Gradienten zumindest im Altersstadium p0 bereits fortgeschritten und die Sensibilität auf eine Notch-Signalweg-Inhibition daher im gesamten neonatalen Corti'schen Organ der Maus ähnlich ist.

4.5.2 Regeneration von Corti'schen Zellen ohne Transdifferenzierung

In der Literatur fanden sich Hinweise, dass die Inhibition des Notch-Signalwegs die Differenzierung zu Haarsinneszellen infolge einer direkten Transdifferenzierung von Stützzellen ohne vorherige Proliferation stimuliert. Während die einen eine nicht-mitotische Haarzellregeneration von adulten Zellen des murinen Utrikulus unter Notch-Inhibition aufzeigten (Lin et al., 2011), beschrieben andere eine gesteigerte Anzahl MyosinVIIa⁺ Haarzellen auf Kosten von Sox2⁺ Stützzellen in neonatalen Explantaten des Corti'schen Organs der Maus nach Inhibition des Notch-Signalwegs (Mizutari et al., 2013). In dieser Arbeit resultierte die *in vitro* Inhibition des Notch-Signalwegs sowohl in einen

Anstieg von Haarzell-ähnlichen als auch in einen Anstieg von Stützzell-ähnlichen Zellen innerhalb der differenzierten Sphären. Dies würde dafür sprechen, dass eine Notch-Signalweg-Inhibition in Sphären mit Stammzellpotenzial nicht nur Einfluss auf die Haarzellregenerierung hat, sondern auch die Stützzellregenerierung stimuliert. Dies konnte bereits in embryonalen Tiermodellen gezeigt werden (Pan et al., 2010). Ebenfalls wurde postuliert, dass der Notch-Signalweg für die Rekrutierung von sensorischen Progenitorzellen benötigt wird, die die gemeinsamen Progenitorzellen von Haarsinneszellen und Stützzellen darstellen (Jeon et al., 2011).

4.5.3 Beeinflussung der zellulären Organisation nach Zelldifferenzierung

Wie immunhistochemisch in dieser Arbeit demonstriert (Abb. 21A) konnten nach Inhibition des Notch-Signalwegs differenzierte Sphären generiert werden, dessen Zellen einer speziellen morphologischen Gesetzmäßigkeit folgen: Die MyosinVIIa⁺ Haarzell-ähnlichen Zellen befanden sich ausschließlich im Zentrum des Patches und wurden von einzelnen Sox2⁺ Stützzell-ähnlichen Zellen durchsetzt. Die meisten Sox2⁺ Zellen befanden sich dicht formiert an den Grenzen der differenzierten Sphäre und schienen die *in vitro* generierten Haarzellen zu umgeben bzw. in ihrer Mitte einzuschließen. Wie in der Literatur beschrieben spielt der Notch-Signalweg nicht nur bei der frühen prosensorischen Entwicklung eine Rolle, sondern ist durch das Prinzip der lateralen Inhibition auch für die strikte alternierende Anordnung von Haar- und Stützzellen *in vivo* verantwortlich. Die in dieser Arbeit erstmalig beobachteten morphologischen Veränderungen nach *in vitro* Inhibition des Notch-Signalwegs bestätigten die Beobachtungen *in vivo*. Ob die morphologischen Veränderungen durch die Beeinflussung des Notch-Signalwegs allein begründet sind, konnte nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiteren Untersuchungen.

Zusammenfassend ergab die Umstellung des Kultivierungsprotokolls auf *post partem* entnommene Zellen des Corti'schen Organs der Maus in Kombination

mit der Inhibition des Notch-Signalwegs einen signifikanten Effekt auf die *in vitro* Differenzierung in Haarsinneszellen und Stützzellen. Die Separierung in unterschiedliche Segmente des Corti'schen Organs führte zu keiner weiteren Verbesserung des Differenzierungspotenzials und würde zusätzlich zu einem präparationsbedingten Zellverlust führen. Es konnte jedoch *in vitro* bestätigt werden, dass der Notch-Signalweg für die funktionelle und morphologische Entwicklung von Haar- und Stützzellen von Bedeutung ist.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten verschiedene Ansätze zur Optimierung der *in vitro* Differenzierung von otischen Progenitorzellen evaluiert werden. Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung einer *in vitro* Kultur des Corti'schen Organs, welche nach den Prinzipien der 3R-Forschung eine Tierversuchs-einsparende („Replacement“, „Reduction“) und effizientere („Refinement“) Alternative für *in vivo* Versuche, aber auch für Wirkstoff-Screening-Verfahren an Explantaten des Corti'schen Organs bildet. Die beiden Verfahren der Zellsortierung MACS und FACS zeigten sich durch den geringen Reinheitsgrad (MACS), die reduzierte Sphärenbildungskapazität (FACS) sowie durch den hohen Zellverlust (FACS) als ungeeignet und wurden daher nicht im *in vitro* Modell integriert. Mit der Inhibition des Notch-Signalwegs konnte die Kultivierung otischer Progenitorzellen der Maus optimiert und die Prinzipien der 3R-Forschung erfüllt werden. Die differenzierten Sphären, die aus dieser Kultur hervorgegangen sind, enthalten Haarzell- und Stützzell-ähnliche Zellen, die mit den Corti'schen Zellen *in vivo* vergleichbar sind und daher als sogenannte „Mini-Ohren“ bezeichnet werden können. Methodisch optimiert wurde so ein effizientes *in vitro* Modell vom Corti'schen Organ der Maus etabliert. Auf Basis des hier verwendeten Kultivierungsprotokolls kann ein Modell zur gezielten Haarzellschädigung mit geeigneten ototoxischen Substanzen wie Neomycin oder Gentamycin etabliert werden. Dabei sollten verschiedene Konzentrationen und Applikationszeitpunkte unterschiedliche Auswirkungen auf die „Mini-Ohren“ im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kurve aufzeigen. Zusätzlich wird es sinnvoll

sein, auch die genetischen Veränderungen während der Kultivierung z.B. mittels qRT-PCR zu erfassen. Der Nachweis von hochregulierten Stammzellgenen oder für Haar- und Stützzellen spezifische Differenzierungsgenen könnte die *in vitro* stimulierte Stammzellartigkeit von Sphären sowie die Beeinflussung des Zellschicksals in differenzierten Sphären auch auf DNA-Ebene bestätigen. Ziel ist insgesamt die Standardisierung eines *in vitro* Modells vom Innenohr, in dem die Stütz- und Haarzelldifferenzierung oder die isolierte Haarzelldegenerierung kontrolliert beeinflusst werden können. Dieses Modell kann anschließend für zukünftige Wirkstoff-Screening-Verfahren eingesetzt werden, um ototoxische Effekte, aber auch otoprotektive und otoregenerative Substanzen tierversuchsaarm nach den 3R-Prinzipien zu prüfen und so einen Beitrag zur Behandlung von Innenohrerkrankungen zu leisten.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Innenohrschwerhörigkeit ist die häufigste Sinnes- und Berufserkrankung weltweit. Ursächlich ist die Degeneration von Sinneszellen, den sensorischen Haarsinneszellen des Corti'schen Organs. Trotz des hohen Bedarfs stehen bisher keine kausalen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Zur Etablierung eines Modells zum "Wirkstoffscreening" von otoprotektiven und ototoxischen Substanzen bietet sich die Verwendung von *in vitro* Kulturen an, da definierte Kulturparameter bei gleichzeitigem Verzicht eines aufwendigen *in vivo* Tiermodells besser kontrolliert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass aus dem Innenohr der postnatalen Maus Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften isoliert und *in vitro* zur Bildung proliferierender Zellverbände (Sphären) stimuliert werden konnten. Die aus den Sphären differenzierten Zellverbände besitzen typische Merkmale von Haarsinnes- und Stützzellen des sensorischen Sinnesepithels und stellen den Ausgangspunkt zukünftiger Wirkstoffscreening-Verfahren dar. Trotz des Fortschritts muss diese Methode weiter optimiert und standardisiert werden. Stützzellen müssen als potenzielle Vorläuferzellen näher definiert und selektiert werden. Es wird vermutet, dass diese durch Inhibition des Notch-Signalwegs mittels γ -Sekretase-Inhibitor zur vermehrten Differenzierung in Haar- und Stützzellen angeregt werden können. Das optimierte *in vitro* Modell kann anschließend zu einem gezielten Haarzell-Schädigungsmodell erweitert werden.

Zielsetzung: (I) Immunhistochemische Charakterisierung von verschiedenen Stützzellpopulationen mit Stammzeleigenschaften anhand ihrer CD-Markerexpression im Corti'schen Organ der postnatalen Maus (p3-5). (II) Etablierung von geeigneten Verfahren zur Zellsortierung: Magnet- (MACS) und Fluoreszenz-assoziierte Zellsortierung (FACS) zur Selektion der in (I) gefundenen Stützzellen. (III) Untersuchung von Sphärenbildungskapazität und Differenzierungspotenzial Corti'scher Stützzellen nach Zellsortierung und immunhistochemische Dokumentation des Stammzell- und Differenzierungscharakters. (IV) Untersuchung von Sphärenbildungskapazität

und Differenzierungspotenzial Corti'scher Zellen nach chemischer Stimulation mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L-685458 mit und ohne segmentale Trennung des neonatalen Corti'schen Organs.

Ergebnisse: (I) Die CD-Markerexpression für den Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} wurde immunhistochemisch in der äußeren Pillarzelle, den Deiterszellen und den Hensenzellen nachgewiesen. Die Expression von dem Glutamat-Aspartat Transporter (GLAST) zeigte sich in der inneren Phalangenzelle sowie in Zellen des großen epithelialen Wulstes. (II) Mittels Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass MACS keine effiziente Anreicherung ermöglichte, mit FACS jedoch eine Selektion der beiden Stützzellpopulationen mit höchstem Reinheitsgrad erreicht werden konnte. (III) Im Vergleich zu unsortierten Zellen des Corti'schen Organs (Kontrolle) stieg die Sphärenbildungskapazität nach MACS in allen Zellfraktionen signifikant an, während die der FACS-sortierten Zellen reduziert war. Eine Verbesserung des Differenzierungspotenzials konnte innerhalb der MACS-Zellfraktionen, aber nicht im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden. Qualitativ wurden Stammzell- (Nestin, Bmi1, Jag1) und Differenzierungsmarker (MyosinVIIa, Sox2, S100, E-Cadherin, FM1-43) in MACS- und FACS-sortierten Sphären nachgewiesen. (IV) Sphären aus nicht-segmental getrennten Corti'schen Zellen der Maus (p0) konnten durch Inhibition des Notch-Signalwegs zu einer signifikant gesteigerten und effizienten *in vitro* Differenzierung in Haar- und Stützzellen angeregt werden.

Schlussfolgerung: MACS und FACS erwiesen sich zur Sortierung Corti'scher Zellen der postmortalen Maus als ungeeignet, da die Zellanreicherung mit einem geringen Reinheitsgrad, einem hohen Zellverlust und mit keiner wesentlichen Verbesserung des Differenzierungspotenzials in Stützzellen und Haarsinneszellen einherging. Mit der *in vitro* Inhibition des Notch-Signalwegs konnte die Kultivierung von Progenitorzellen aus dem Innenohr der neonatalen Maus jedoch optimiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können ergänzend mit einer *in vitro* Applikation von ototoxischen Substanzen wie Aminoglykosiden die Basis eines effizienten *in vitro* Modells vom Innenohr zur gezielten Haarzellregeneration oder Haarzelldegeneration schaffen.

6 Literatur

- Ahmed M, Wong EY, Sun J, Xu J, Wang F, Xu PX (2012) Eya1-Six1 interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating Atoh1 expression in cooperation with Sox2. *Developmental cell* 22:377-390.
- Ahmed S, Vorasubin N, Lopez IA, Hosokawa S, Ishiyama G, Ishiyama A (2013) The expression of glutamate aspartate transporter (GLAST) within the human cochlea and its distribution in various patient populations. *Brain research* 1529:134-142.
- Baird RA, Steyger PS, Schuff NR (1996) Mitotic and nonmitotic hair cell regeneration in the bullfrog vestibular otolith organs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 781:59-70.
- Balak KJ, Corwin JT, Jones JE (1990) Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:2502-2512.
- Bayoussef Z, Dixon JE, Stolnik S, Shakesheff KM (2012) Aggregation promotes cell viability, proliferation, and differentiation in an in vitro model of injection cell therapy. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 6:e61-73.
- Bramhall NF, Shi F, Arnold K, Hochedlinger K, Edge AS (2014) Lgr5-positive supporting cells generate new hair cells in the postnatal cochlea. *Stem cell reports* 2:311-322.
- Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:678-689.
- Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A (2008) Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* 44:927-929.
- Cai T, Seymour ML, Zhang H, Pereira FA, Groves AK (2013) Conditional deletion of Atoh1 reveals distinct critical periods for survival and function of hair cells in the organ of Corti. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:10110-10122.
- Carter DA, Dick AD, Mayer EJ (2009) CD133+ adult human retinal cells remain undifferentiated in Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). *BMC ophthalmology* 9:1.

- Chai R, Kuo B, Wang T, Liaw EJ, Xia A, Jan TA, Liu Z, Taketo MM, Oghalai JS, Nusse R, Zuo J, Cheng AG (2012) Wnt signaling induces proliferation of sensory precursors in the postnatal mouse cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Chatoo W, Abdouh M, Duparc RH, Bernier G (2010) Bmi1 distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development. *Stem Cells* 28:1412-1423.
- Chen P, Johnson JE, Zoghbi HY, Segil N (2002) The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129:2495-2505.
- Chen W, Johnson SL, Marcotti W, Andrews PW, Moore HD, Rivolta MN (2009) Human fetal auditory stem cells can be expanded in vitro and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem Cells* 27:1196-1204.
- Chen Y, Yu H, Zhang Y, Li W, Lu N, Ni W, He Y, Li J, Sun S, Wang Z, Li H (2013) Cotransfection of Pax2 and Math1 promote in situ cochlear hair cell regeneration after neomycin insult. *Scientific reports* 3:2996.
- Chen Z, Kujawa SG, Sewell WF (2010) Functional roles of high-affinity glutamate transporters in cochlear afferent synaptic transmission in the mouse. *Journal of neurophysiology* 103:2581-2586.
- Chonko KT, Jahan I, Stone J, Wright MC, Fujiyama T, Hoshino M, Fritzsche B, Maricich SM (2013) Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Developmental biology* 381:401-410.
- Cizkova D, Cizek M, Nagyova M, Slovinska L, Novotna I, Jergova S, Radonak J, Hlucilova J, Vanicky I (2009) Enrichment of rat oligodendrocyte progenitor cells by magnetic cell sorting. *Journal of neuroscience methods* 184:88-94.
- Corwin JT (1981) Postembryonic production and aging in inner ear hair cells in sharks. *The Journal of comparative neurology* 201:541-553.
- Corwin JT, Cotanche DA (1988) Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240:1772-1774.
- Corwin JT, Jones JE, Katayama A, Kelley MW, Warchol ME (1991) Hair cell regeneration: the identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues. *Ciba Found Symp* 160:103-120; discussion 120-130.

- Cotanche DA (1987) Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hearing research* 30:181-195.
- Cruz RM, Lambert PR, Rubel EW (1987) Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113:1058-1062.
- Dabdoub A, Puligilla C, Jones JM, Fritzscht B, Cheah KS, Pevny LH, Kelley MW (2008) Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:18396-18401.
- Dalet A, Bonsacquet J, Gaboyard-Niay S, Calin-Jageman I, Chidavaenzi RL, Venteo S, Desmadryl G, Goldberg JM, Lysakowski A, Chabbert C (2012) Glutamate transporters EAAT4 and EAAT5 are expressed in vestibular hair cells and calyx endings. *PloS one* 7:e46261.
- Daudet N, Lewis J (2005) Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair-cell differentiation. *Development* 132:541-551.
- de Celis JF (2013) Understanding the determinants of notch interactions with its ligands. *Science signaling* 6:pe19.
- Diensthuber M, Oshima K, Heller S (2009) Stem/progenitor cells derived from the cochlear sensory epithelium give rise to spheres with distinct morphologies and features. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 10:173-190.
- Doetzlhofer A, Basch ML, Ohshima T, Gessler M, Groves AK, Segil N (2009) Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Developmental cell* 16:58-69.
- Doetzlhofer A, White PM, Johnson JE, Segil N, Groves AK (2004) In vitro growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: a requirement for EGF and periotic mesenchyme. *Developmental biology* 272:432-447.
- Driver EC, Sillers L, Coate TM, Rose MF, Kelley MW (2013) The Atoh1-lineage gives rise to hair cells and supporting cells within the mammalian cochlea. *Developmental biology* 376:86-98.
- Eberle D, Santos-Ferreira T, Grahl S, Ader M (2014) Subretinal transplantation of MACS purified photoreceptor precursor cells into the adult mouse retina. *Journal of visualized experiments : JoVE* e50932.

- Eberle D, Schubert S, Postel K, Corbeil D, Ader M (2011) Increased integration of transplanted CD73-positive photoreceptor precursors into adult mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:6462-6471.
- Furness DN, Lehre KP (1997) Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. *The European journal of neuroscience* 9:1961-1969.
- Gridley T (2007) Notch signaling in vascular development and physiology. *Development* 134:2709-2718.
- Gubbels SP, Woessner DW, Mitchell JC, Ricci AJ, Brigande JV (2008) Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455:537-541.
- Hume CR, Bratt DL, Oesterle EC (2007) Expression of LHX3 and SOX2 during mouse inner ear development. *Gene expression patterns : GEP* 7:798-807.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, Raphael Y (2005) Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature medicine* 11:271-276.
- Jeon SJ, Fujioka M, Kim SC, Edge AS (2011) Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner ear stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:8351-8358.
- Jin ZH, Kikuchi T, Tanaka K, Kobayashi T (2003) Expression of glutamate transporter GLAST in the developing mouse cochlea. *The Tohoku journal of experimental medicine* 200:137-144.
- Kelley MW (2006) Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature reviews Neuroscience* 7:837-849.
- Kelly MC, Chang Q, Pan A, Lin X, Chen P (2012) Atoh1 directs the formation of sensory mosaics and induces cell proliferation in the postnatal Mammalian cochlea in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:6699-6710.
- Kiernan AE, Cordes R, Kopan R, Gossler A, Gridley T (2005a) The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development* 132:4353-4362.
- Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, Steel KP, Cheah KS (2005b) Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 434:1031-1035.

- Kiernan AE, Xu J, Gridley T (2006) The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS genetics* 2:e4.
- Korrapati S, Roux I, Glowatzki E, Doetzlhofer A (2013) Notch signaling limits supporting cell plasticity in the hair cell-damaged early postnatal murine cochlea. *PLoS one* 8:e73276.
- Li H, Liu H, Heller S (2003) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nature medicine* 9:1293-1299.
- Li W, Wu J, Yang J, Sun S, Chai R, Chen ZY, Li H (2015) Notch inhibition induces mitotically generated hair cells in mammalian cochleae via activating the Wnt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:166-171.
- Lin J, Feng L, Hamajima Y, Komori M, Burns TC, Fukudome S, Anderson J, Wang D, Verfaillie CM, Low WC (2009) Directed differentiation of mouse cochlear neural progenitors in vitro. *American journal of physiology Cell physiology* 296:C441-452.
- Lin V, Golub JS, Nguyen TB, Hume CR, Oesterle EC, Stone JS (2011) Inhibition of Notch activity promotes nonmitotic regeneration of hair cells in the adult mouse utricles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:15329-15339.
- Liu Z, Dearman JA, Cox BC, Walters BJ, Zhang L, Ayrault O, Zindy F, Gan L, Roussel MF, Zuo J (2012a) Age-dependent in vivo conversion of mouse cochlear pillar and deiters' cells to immature hair cells by *atoh1* ectopic expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:6600-6610.
- Liu Z, Owen T, Fang J, Zuo J (2012b) Overactivation of Notch1 signaling induces ectopic hair cells in the mouse inner ear in an age-dependent manner. *PLoS one* 7:e34123.
- Lopez-Schier H, Hudspeth AJ (2006) A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:18615-18620.
- Lou XX, Nakagawa T, Nishimura K, Ohnishi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J (2013) Reprogramming of mouse cochlear cells by transcription factors to generate induced pluripotent stem cells. *Cellular reprogramming* 15:514-519.

- Lowenheim H, Furness DN, Kil J, Zinn C, Gultig K, Fero ML, Frost D, Gummer AW, Roberts JM, Rubel EW, Hackney CM, Zenner HP (1999) Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4084-4088.
- Ma EY, Rubel EW, Raible DW (2008) Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:2261-2273.
- Matsui JI, Oesterle EC, Stone JS, Rubel EW (2000) Characterization of damage and regeneration in cultured avian utricles. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 1:46-63.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
- Mizutani K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge AS (2013) Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron* 77:58-69.
- Munnamalai V, Hayashi T, Bermingham-McDonogh O (2012) Notch prosensory effects in the Mammalian cochlea are partially mediated by Fgf20. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:12876-12884.
- Nadol JB, Jr. (1993) Hearing loss. *The New England journal of medicine* 329:1092-1102.
- Neves J, Uchikawa M, Bigas A, Giraldez F (2012) The prosensory function of Sox2 in the chicken inner ear relies on the direct regulation of Atoh1. *PLoS one* 7:e30871.
- Ohnishi Y, Iwatsuki K, Shinzawa K, Ishihara M, Moriwaki T, Umegaki M, Kishima H, Yoshimine T (2013) Adult olfactory sphere cells are a source of oligodendrocyte and Schwann cell progenitors. *Stem cell research* 11:1178-1190.
- Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez Monedero R, Geleoc GS, Edge A, Holt JR, Heller S (2007) Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 8:18-31.
- Oshima K, Heller S (2005) Sound from silence. *Nature medicine* 11:249-250.
- Oshima K, Senn P, Heller S (2009) Isolation of sphere-forming stem cells from the mouse inner ear. *Methods in molecular biology* 493:141-162.

- Oshima K, Shin K, Diensthuber M, Peng AW, Ricci AJ, Heller S (2010) Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141:704-716.
- Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Wanaka A, Yoshikawa M (2013) Induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells. *Cell death & disease* 4:e700.
- Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M (2012) In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell death & disease* 3:e314.
- Pan W, Jin Y, Stanger B, Kiernan AE (2010) Notch signaling is required for the generation of hair cells and supporting cells in the mammalian inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15798-15803.
- Popper AN, Hoxter B (1984) Growth of a fish ear:1. Quantitative analysis of hair cell and ganglion cell proliferation. *Hearing research* 15:133-142.
- Provenzano MJ, Minner SA, Zander K, Clark JJ, Kane CJ, Green SH, Hansen MR (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 neurosciences* 47:306-315.
- Qin H, Zhao LD, Sun JH, Ren LL, Guo WW, Liu HZ, Zhai SQ, Yang SM (2011) The differentiation of mesenchymal stem cells into inner ear hair cell-like cells in vitro. *Acta oto-laryngologica* 131:1136-1141.
- Raphael Y (1992) Evidence for supporting cell mitosis in response to acoustic trauma in the avian inner ear. *Journal of neurocytology* 21:663-671.
- Ryals BM, Rubel EW (1988) Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 240:1774-1776.
- Savary E, Hugnot JP, Chassigneux Y, Travo C, Duperray C, Van De Water T, Zine A (2007) Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis. *Stem Cells* 25:332-339.
- Savary E, Sabourin JC, Santo J, Hugnot JP, Chabbert C, Van De Water T, Uziel A, Zine A (2008) Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential. *Mechanisms of development* 125:674-686.

- Scheffer DI, Shen J, Corey DP, Chen ZY (2015) Gene Expression by Mouse Inner Ear Hair Cells during Development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:6366-6380.
- Schneider, Elke (2005) Noise in figures. Risk observatory, thematic report. European agency for safety and health at work. <https://osha.europa.eu/en/tools-and-publications/publications/reports/6905723> [Zugriff 10.01.16]
- Shi F, Kempfle JS, Edge AS (2012) Wnt-responsive Lgr5-expressing stem cells are hair cell progenitors in the cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:9639-9648.
- Shield, Bridget (2006) Evaluation of the social and economic costs of hearing impairment. A report for Hear-it. http://www.hear-it.org/sites/default/files/multimedia/documents/Hear_It_Report_October_2006.pdf [Zugriff 10.01.16]
- Sinkkonen ST, Chai R, Jan TA, Hartman BH, Laske RD, Gahlen F, Sinkkonen W, Cheng AG, Oshima K, Heller S (2011a) Intrinsic regenerative potential of murine cochlear supporting cells. *Scientific reports* 1:26.
- Sinkkonen ST, Starlinger V, Galaiya DJ, Laske RD, Myllykangas S, Oshima K, Heller S (2011b) Serial analysis of gene expression in the chicken otocyst. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 12:697-710.
- Smolders JW (1999) Functional recovery in the avian ear after hair cell regeneration. *Audiology & neuro-otology* 4:286-302.
- Staecker H, Praetorius M, Baker K, Brough DE (2007) Vestibular hair cell regeneration and restoration of balance function induced by math1 gene transfer. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 28:223-231.
- Stojanova ZP, Kwan T, Segil N (2015) Epigenetic regulation of Atoh1 guides hair cell development in the mammalian cochlea. *Development* 142:3529-3536.
- Stone JS, Cotanche DA (1994) Identification of the timing of S phase and the patterns of cell proliferation during hair cell regeneration in the chick cochlea. *The Journal of comparative neurology* 341:50-67.
- Stone JS, Cotanche DA (2007) Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *The International journal of developmental biology* 51:633-647.

- Takebayashi S, Yamamoto N, Yabe D, Fukuda H, Kojima K, Ito J, Honjo T (2007) Multiple roles of Notch signaling in cochlear development. *Developmental biology* 307:165-178.
- Tan J, Clarke M, Barrett G, Millard R (2010) The p75 neurotrophin receptor protects primary auditory neurons against acoustic trauma in mice. *Hearing research* 268:46-59.
- Taylor RR, Forge A (2005) Hair cell regeneration in sensory epithelia from the inner ear of a urodele amphibian. *The Journal of comparative neurology* 484:105-120.
- Vroemen M, Weidner N (2003) Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. *Journal of neuroscience methods* 124:135-143.
- Waldhaus J, Cimerman J, Gohlke H, Ehrich M, Muller M, Lowenheim H (2012) Stemness of the organ of corti relates to the epigenetic status of sox2 enhancers. *PLoS one* 7:e36066.
- Wang GP, Chatterjee I, Batts SA, Wong HT, Gong TW, Gong SS, Raphael Y (2010) Notch signaling and Atoh1 expression during hair cell regeneration in the mouse utricle. *Hearing research* 267:61-70.
- Warchol ME (2011) Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species. *Hearing research* 273:72-79.
- Warchol ME, Corwin JT (1996) Regenerative proliferation in organ cultures of the avian cochlea: identification of the initial progenitors and determination of the latency of the proliferative response. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:5466-5477.
- Watanabe R, Morell MH, Miller JM, Kanicki AC, O'Shea KS, Altschuler RA, Raphael Y (2012) Nestin-expressing cells in the developing, mature and noise-exposed cochlear epithelium. *Molecular and cellular neurosciences* 49:104-109.
- White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N (2006) Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 441:984-987.
- White PM, Stone JS, Groves AK, Segil N (2012) EGFR signaling is required for regenerative proliferation in the cochlea: conservation in birds and mammals. *Developmental biology* 363:191-200.

- WHO, World Health Organization (2015) Deafness and hearing loss. Fact sheet N°300. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en> [Zugriff 02.03.16]
- Wilkins HR, Presson JC, Popper AN (1999) Proliferation of vertebrate inner ear supporting cells. *Journal of neurobiology* 39:527-535.
- Yadirgi G, Leinster V, Acquati S, Bhagat H, Shakhova O, Marino S (2011) Conditional activation of Bmi1 expression regulates self-renewal, apoptosis, and differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 29:700-712.
- Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, Su N, Luo Y, Heilshorn SC, Amieva MR, Sangiorgi E, Capecchi MR, Kuo CJ (2012) The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:466-471.
- Yuan SH, Martin J, Elia J, Flippin J, Paramban RI, Hefferan MP, Vidal JG, Mu Y, Killian RL, Israel MA, Emre N, Marsala S, Marsala M, Gage FH, Goldstein LS, Carson CT (2011) Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PloS one* 6:e17540.
- Zhai S, Shi L, Wang BE, Zheng G, Song W, Hu Y, Gao WQ (2005) Isolation and culture of hair cell progenitors from postnatal rat cochleae. *Journal of neurobiology* 65:282-293.
- Zhao LD, Li L, Wu N, Li DK, Ren LL, Guo WW, Sun JH, Liu HZ, Chen ZT, Xing GQ, Yang SM (2013) Migration and differentiation of mouse embryonic stem cells transplanted into mature cochlea of rats with aminoglycoside-induced hearing loss. *Acta oto-laryngologica* 133:136-143.
- Zheng JL, Gao WQ (2000) Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nature neuroscience* 3:580-586.
- Zine A, Van De Water TR, de Ribaupierre F (2000) Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* 127:3373-3383.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Hörforschungszentrum der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Hubert Löwenheim durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Hubert Löwenheim (Arbeitsgruppenleiter) und Priv. Doz. Dr. Marcus Müller (Wissenschaftlicher Mitarbeiter).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. med. Andreas Eckhard (ehemaliger wissenschaftlicher Mitarbeiter) von mir durchgeführt. Die Präparationen zur MACS- und FACS-Sortierung erfolgten jeweils zu zweit in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Andreas Eckhard und Frau Aurélie Dos Santos (Wissenschaftliche Mitarbeiterin). Die mikroskopische Auszählung der Sphären und differenzierten Sphären wurde zwischen Herrn Dr. med. Andreas Eckhard, Frau Aurélie Dos Santos und mir aufgeteilt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 16.03.2016

Ngoc-Nhi Catharina Luu

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Materialien

Für Organentnahme verwendete Tiere

- NMRI Mäuse im postnatalen Altersstadium von 0 und 3-5 Tagen (p0, p3-5)

Allgemeines Material

- Laborkittel
- Einmal-Handschuhe, Peha-soft® nitrile white – Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Zellstoff
- Descosept AF – Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld-Beiseförth, Deutschland
- 70 % Ethanol aus Wasser und Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Ethanol - Merck Millipore, München, Deutschland / Ethanol 99 % S – SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
- Multifuge 3 L-R – Kendro, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
- Sterile Werkbank, Hera Safe - Kendro, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Material zur Herstellung von Lösungen

- Pipette - eppendorf Research 1000 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette - eppendorf Research 100 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette - eppendorf Research 10 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipette - eppendorf Research 2,5 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 mL - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0 mL - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Macro-Pipettierhilfe – Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Messpipetten, 5 mL, 10 mL, 25 mL, Corning® Costar® Stripette® - Sigma-Aldrich® St. Louis, Missouri, USA
- Accu-jet – Brand®, GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
- Feinwaage, Sartorius Basic – Sartorius-Mechatronik, Göttingen, Deutschland
- Glasflaschen mit Schraubverschluss, 500 mL, 1000 mL – Schott AG, Mainz, Deutschland
- Wäge-Spatel
- pH-Meter, Schott pH-Meter cG 840 – Schott AG, Mainz, Deutschland
- 15 mL Polystyrene Conical Tube, BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA

Material zur Präparation

- Pinzette, Dumont #3 Standard tip / 0,17 mmx0,10 mm / 12 cm – FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Pinzette, Dumont #55 Inox / 0,05 mmx0,02 mm / 11 cm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Pinzette, Dumont #5 Inox / 0,05 mmx0,02 mm / 11 cm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland

- Pinzette, Graefe forceps, narrow pattern with serrated tips curved / 16 cm
- Spritze – Braun Omnican® 0,30x12 mm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- große Schere, ToughCut Straight 17,5 cm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- kleine Schere, Wagner Scissors Straight 12 cm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Spring Scissors, Straight 8 cm / tip diameter 0,005 mm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Dissecting Knife – Straight 4 mm / tip thickness 0,5 mm / 12,5 cm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Petrikulturschale 60/15 mm – Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
- Messbecher 5.000 mL
- Rasierklingen – Wilkinson Sword, High Wycombe, UK

Material zur Fixierung und Einbettung der murinen Cochlea

- Laborschüttler – Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
- 24-Well Kulturplatten, Cell Culture Plate - Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
- Handelsübliche Aluminiumfolie
- Handelsübliche Schere (z.B. Küchenschere)
- konische Zylinder (z.B. Abdichtung von Glasflaschen aus Gummi)
- Tissue-Tek O.C.TTM Compound - Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

Lösungen für Präparation, Fixierung und Kryoprotektion

- Diethylether reinst, stabilisiert - Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze, Deutschland
- Hepes-Hanks-Lösung, Hanks buffered salt solution, HBSS, 285 mosm/L – Universitäts-Apotheke Tübingen, Deutschland
- Aqua bidest. - Millipore-Filteranlage/Abgabe bei 18,2 MΩ / 25 °C - Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
- Phosphat buffered saline PBS tablets –Gibco® Invitrogen, Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
1 x PBS (Angaben für 500 mL): Eine PBS-Tablette wird in 500 mL Aqua bidest. gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.
- Roti®-Histofix 4%, säurefrei (pH 7), phosphatgepufferte Formaldehydlösung PFA 4 % - Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Für eine PFA 2% Lösung: Roti®-Histofix 4% wird im Verhältnis 1:1 mit Aqua bidest. angesetzt, nach Bedarf aliquotiert und bei -80 °C gelagert.
- Saccharose – Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Saccharose 25 % in 1x PBS (Angaben für 20 mL): 5 g Saccharose werden in 20 mL 1x PBS gelöst. Als Vorrat werden größere Mengen angesetzt, nach Bedarf aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Material zur Herstellung von Gefrierschnitten

- Tissue-Tek O.C.TTM Compound - Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
- Microm HM550 + Schneidkeil - Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
- SuperFrost® Plus Objektträger - R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
- Rasierklinge zur Zuschneidung und Entfernung der Gewebeblöcke - Wilkinson Sword, High Wycombe, UK

- Handelsüblicher Pinsel zur Entfernung von Tissue-Tec-Resten
- Verschießbare Aufbewahrungsbox für Objektträger
- Handelsüblicher Bleistift
- Zellstoff

Material für immunhistochemische Markierungen von Gefrierschnitten

- Zellstoff
- Immunopen™ - Calbiochem®, Merck KGaA, Milipore, Darmstadt
- Lichtgeschützte und verschließbare Inkubationskammer für Objektträger
- Deckgläser - 24x60 mm / Glasdicke 0,13-0,17 mm - R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
- Pinzette, Dumont #55 Inox / 0,05 mmx0,02 mm / 11 cm - FST Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Tisch-Vortex - Scientific Industries Vortex-Genie 2™ - Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
- Tisch-Zentrifuge - Heraeus Biofuge pico - Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
- herkömmliche Mikrowelle
- herkömmlicher Dampfgerät
- Hitzebeständiges Inkubationsgefäß für Objektträger

Zusätzlich benötigtes Material für immunhistochemische Markierungen von Sphären

- Filtereinsatz mit Membran, Cell Culture Insert mit der Porengröße 8,0 µm - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- Parafilm – Pechiney Plastic Packaging (früher American National Can™), Chicago, IL, USA
- 24-Well Cell Culture Plate - Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
- Biopsie-Stanze, Biopsy-Punch 6 mm – pfm, Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland

Zusätzlich benötigtes Material für immunhistochemische Markierungen von Patches

- Parafilm – Pechiney Plastic Packaging (früher American National Can™), Chicago, IL, USA
- Kammerentferner mitgeliefert: 8-Kammer-Kulturplatten, 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Slides Glass Slide, includes Chamber Removal Devices - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- Handelsüblicher Nagellack

Lösungen für immunhistochemische Markierungen

- Phosphat buffered saline PBS tablets – Gibco®/Invitrogen, Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
1 x PBS (Angaben für 500 mL): Eine PBS-Tablette wird in 500 mL Aqua bidest. gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.
- DP, Denaturierungspuffer, SDS ultra pure – Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Angaben für 10 mL 1 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) in 1xPBS:
0,1 g SDS-molecular biolog grade / 10 mL 1x PBS
- Triton® X-100 – Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

- 10% Triton X-100 Stammlösung (Angaben für 100 mL):
10 mL Triton® X-100 / 90 mL 1x PBS
- Permeabilisierungspuffer: 0,2 % Triton® X-100 in PBS (Angaben für 10 mL):
0,02 mL der 10%-igen Stammlösung / 10 mL 1x PBS
 - NDS, Normal Donkey Serum, vergleichbar mit Donkey Serum - Sigma-Aldrich© St. Louis, Missouri, USA
 - BP, Blockadepuffer: 1 % NDS in 0,2 % Triton-X100 in PBS (Angaben für 10 mL):
0,1 g NDS / 10 mL 0,2 % Triton-X100 in PBS
 - RP, Reaktionspuffer: 0,5 % NDS in 0,2 % Triton-X100 in PBS (Angaben für 10 mL):
5 mL des BP / 5 mL 0,2 % Triton-X100 in PBS
 - BSA, Bovine Serum Albumin – Sigma-Aldrich© St. Louis, Missouri, USA
 - BP, Blockadepuffer (Sphären): 3 % BSA in 1x PBS (Angaben für 10 mL):
0,3 g BSA / 10 mL 1x PBS
 - Citrat-Puffer: 10 mM Natrium-Citrat gelöst in Aqua dest., justiert auf pH 6,0
 - Fluor Safe™ Reagent - Calbiochem®, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Material zur manuellen Zell- und Sphärenzählung

- Deckgläser - 24x60 mm / Glasdicke 0,13-0,17 mm - R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
- Neubauer-Kammer
- Handelsüblicher Handzähler
- Axiovert 25, Axiovert 100 M - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Lösungen zur Dissoziation des Corti'schen Organs

- Trypsin EDTA Solution 0,25 % - Sigma-Aldrich© St. Louis, Missouri, USA
- Trypsin Inhibitor aus Sojabohnen, ca. 50 U/mg, lyophil. - SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- Desoxyribonuclease I, bovine pancreas - Worthington, Lakewood, USA
- Feiner Präparationsdraht

Material für MACS-Sortierung und FACS-Sortierung

- MACS® Multi Stand –Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- MACS® Buffer, autoMACS™ Rinsing Solution – Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- MACS® Separation Columns – Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- MACS® Pre-Separation Filters, 70 µm – Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA

Material für Zellkultur

- Pipetten (aufgeführt unter Material zur Herstellung von Lösungen)
- 15 mL Polystyrene Conical Tube - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- 50 mL Polystyrene Conical Tube - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- Inkubator HeraCell®, Einstellung 37 °C, 5 % CO₂ – Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

- 8-Kammer-Kulturplatten, 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Slides Glass Slide, includes Chamber Removal Devices - BD Falcon™ - BD Biosciences, Bedford, MA, USA
- 96-Well Kulturplatten, Tissue Culture Plate, Flat bottom with lid - Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland

Material zur Beschichtung der Kulturkammern

- HEPES-Hanks-Lösung, Hanks buffered salt solution, HBSS, 285 mosm/L – Universitäts-Apotheke Tübingen
- Parafilm – Pechiney Plastic Packaging (früher American National Can™), Chicago, IL, USA
- Petrikulturschalen 145/20 mm – Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland

Zusammensetzung des Proliferationsmediums

- Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (1X)+GlutaMAX™-1 - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- F12 Nut Mix (1X)+GlutaMAX™-1 - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- N2 – Supplement (100X), 17502-048 - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- B27 – Supplement (50X), serum free - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Ampicillin - 0,1mg/mL, Ampicillin Sodium Salt – Irradiated - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Heparin
- rhFGF basic, Recombinant Human, 233-FB - R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- rhIGF-1, Recombinant Human, 291-G1 - R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- rhEGF, Recombinant Human, 200 µg - R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

- Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (1X)+GlutaMAX™-1 - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- F12 Nut Mix (1X)+GlutaMAX™-1 - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- N2 – Supplement (100X) - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- B27 – Supplement (50X), serum free - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Ampicillin - 0,1 mg/mL, Ampicillin Sodium Salt, Irradiated - Gibco® Life Technologies, heute Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Notch-Inhibitor, γ -Sekretase-Inhibitor L685,458 - Sigma-Aldrich© St. Louis, Missouri, USA

Antikörper

- anti-FITC Microbeads – Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- anti-PE Microbeads - Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- anti-GLAST (ACSA-1)-PE rabbit - Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- anti-p75^{NTR}-FITC mouse – Abcam®, Cambridge, UK
- anti-GLAST/EAAT1 rabbit - Abcam®, Cambridge, UK
- anti-p75^{NGF}, Anti-Nerve Growth Factor Receptor, p75 rabbit – Merck Millipore, München, Deutschland
- donkey anti-rabbit FITC - Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

- FcR-Blockadereagens - Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- IgG2a (FITC) - Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- IgG2a (PE) - Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

- Click-iT® EdU Fluor® Alexa 594 Imaging Kit – Invitrogen, Molecular Probes
- anti-Nestin mouse – Chemicon®, Merck KGaA, Milipore, Darmstadt
- anti-Bmi1 mouse - Abcam®, Cambridge, UK
- anti-Jag1 rabbit – Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

- anti-MyosinVIIa (TH) rabbit - Axxora Life Sciences Inc, San Diego, CA, USA
- anti-Sox-2 (Y-17) goat SC-17320 – Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
- anti-Calretinin goat – Chemicon®, Merck KGaA, Milipore, Darmstadt
- anti-S100 rabbit – DAKO, Agilent Technologies, Glostrup, Dänemark
- anti-E-Cadherin rat - Sigma-Aldrich® St. Louis, Missouri, USA
- FM1-43FX – Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

- Alexa 488 donkey anti-rabbit – Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Alexa 488 donkey anti-mouse - Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Alexa 594 donkey anti-goat - Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Alexa 594 donkey anti-rat - Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Alexa 546 donkey anti-rabbit - Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol in ddH₂O [30 µM]

Mikroskope

- Zeiss Stemi 2000-C - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Zeiss KL 1500 LCD - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Zeiss cLSM 510 Meta - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Zeiss – LSM Pascal 5 - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Zeiss Axioplan 2 - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Kamera des Samsung Galaxy Note N7000 – Samsung, Seoul, Südkorea
- Precision Wipes, Kimtech Science – Kimberly-Clark Professional, Irving, Texas, USA
- Zeiss Immersionsöl Immersol™ 518 F - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Software

- Zeiss - AxioVision Rel.4.7 - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Zeiss – Zen lite 2011 - Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Microsoft® Word für Mac 2011, Version 14.5.9 - Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Microsoft® Excel für Mac 2011, Version 14.5.9 - Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Endnote X7.2 (Bld 9970) - Thomson Reuters, NYC, USA / Toronto, Kanada
- Adobe® Illustrator® CC, Version 17.0.0 - Adobe Systems, San José, CA, USA
- Adobe® InDesign® CC, Version 9.0 - Adobe Systems, San José, CA, USA
- Prism 6 for Mac OS X, Version 6.0c - GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

8.2 Verzeichnis der Protokolle

8.2.1 Immunhistochemische Markierung an Kryoschnitten der Maus

p75^{NTR}/Calretinin/DAPI – Cochlea – Maus p4

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholungen	Verdünnung
1x PBS	5 min	RT	3x	
Citrat-Puffer	10 min	100 °C		
Citrat-Puffer	10 min	RT, Abkühlung		
1x PBS	5 min	RT	3x	
Blockadepuffer	30 min	RT		
rabbit anti-p75 ^{NTR} goat anti-Calretinin	über Nacht	4 °C		1:100 1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
donkey anti-rabbit Alexa 488 donkey anti-goat Alexa 594	60 min	RT		1:400 1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
DAPI	10 min	RT		1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
Eindeckeln mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save				
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

GLAST/Calretinin/DAPI – Cochlea – Maus p4

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholung	Verdünnung
1x PBS	5 min	RT	3x	
Citrat-Puffer	10 min	100 °C		
Citrat-Puffer	10 min	RT, Abkühlung		
Denaturierungs- puffer	10 min			
1x PBS	5 min	RT	3x	
Blockadepuffer	30 min	RT		
rabbit anti-GLAST goat anti-Calretinin	über Nacht	4 °C		1:100 1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
donkey anti-rabbit Alexa 488 donkey anti-goat Alexa 594	60 min	RT		1:400 1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
DAPI	10 min	RT		1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
Eindeckeln mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save				
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

8.2.2 Kontrolluntersuchungen zur Zellsortierung mittels MACS und FACS

IgG2a-FITC (Isotyp-Kontrolle) – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur	Verdünnung
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	FcR-Blockadereagenz, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	IgG2a (FITC), 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	Proliferationsmedium, 500 µL			
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

IgG2a-PE (Isotyp-Kontrolle) – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Verdünnung
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	FcR-Blockadereagenz, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	IgG2a (PE), 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	Proliferationsmedium, 500 µL			
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

p75^{NTR}-FITC (unsortierte Kontrolle) – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubations- temperatur	Verdünnung
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	FcR-Blockadereagenz, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 45 µL			
	rabbit anti-p75 ^{NTR} -FITC, 5 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	Proliferationsmedium, 500 µL			
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

GLAST-PE (unsortierte Kontrolle) – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubations- temperatur	Verdünnung
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	FcR-Blockadereagenz, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 45 µL			
	rabbit anti-GLAST-PE, 5 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	Proliferationsmedium, 500 µL			
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

8.2.3 MACS-Sortierung

p75^{NTR}-FITC Microbeads – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur	Verdünnung
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	FcR-Blockadereagenz, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	rabbit anti-p75 ^{NTR} , 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 99 µL			
	donkey anti-rabbit FITC, 1 µL	10 min	+4 °C	1:100
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 80 µL			
	anti-FITC Microbeads, 20 µL	10 min	+4 °C	1:5
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 500 µL			
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

MACS – Sortierung in p75^{NTR+} und p75^{NTR-} – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Lösung in der Auftrennsäule	Lösungsmenge	Arbeitstemperatur	Wiederholung
MACS-Halterung vorbereiten, Auffangröhrchen a) b) c)				
MACS-Trennsäule in Magneten einspannen, konnektieren mit Zellstrainer 70 µm				
a) Spülung	MACS-Puffer	500 µL	RT	
b) Sortierung	p75 ^{NTR-} markierte Zellsuspension	500 µL	RT	
b) Auswaschung	MACS-Puffer	500 µL	RT	3x
Magnet entfernen				
c) Sortierung	MACS-Puffer	1000 µL	RT	
b) c) Zentrifugation			+4 °C, 300 rpm, 10 min	
Überstand absaugen				
b) Resuspension	Proliferationsmedium	500 µL	RT	
c) Resuspension	MACS-Puffer	90 µL	RT	

Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauerkammer
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C
a) Spülung verworfen b) p75 ^{NTR+} Zellfraktion c) p75 ^{NTR-} Zellfraktion

GLAST-PE Microbeads – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubations- temperatur	Verdünnung
c) Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL		RT	
	rabbit anti-GLAST-PE, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 80 µL			
	anti-PE Microbeads, 20 µL	10 min	+4 °C	1:5
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 500 µL			
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

MACS – Sortierung in GLAST⁺ und p75^{NTR-}/GLAST⁻ – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Lösung in der Auftrennsäule	Lösungsmenge	Arbeits- temperatur	Wiederholungen
MACS-Halterung vorbereiten, Auffangröhrchen aa) bb) cc)				
MACS-Trennsäule in Magneten einspannen, konnektieren mit Zellstrainer 70 µm				
aa) Spülung	MACS-Puffer	500 µL	RT	
bb) Sortierung	GLAST-markierte Zellsuspension	500 µL	RT	
bb) Auswaschung	MACS-Puffer	500 µL	RT	3x
Magnet entfernen				
cc) Sortierung	MACS-Puffer	1000 µL	RT	
bb) cc) Zentrifugation			+4 °C, 300 rpm, 10 min	
Überstand absaugen				
bb) cc) Resuspension	Proliferationsmedium	500 µL	RT	
Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauerkammer				
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				
aa) Spülung verworfen bb) GLAST ⁺ Zellfraktion cc) p75 ^{NTR-} /GLAST ⁻ Zellfraktion				

8.2.4 FACS-Sortierung

Versuchsprotokolle der Kontrolluntersuchungen siehe Kapitel 8.2.2

p75^{NTR}-FITC / GLAST-PE – Corti'sche Zellen – Maus p3-5

	Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur	Verdünnung
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	FcR-Blockadereagenz, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 45 µL			
	rabbit anti-p75 ^{NTR} , 5 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 200 µL			
	donkey anti-rabbit FITC, 2 µL	10 min	+4 °C	1:100
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 90 µL			
	rabbit anti-GLAST-PE, 10 µL	10 min	+4 °C	1:10
Auswaschung	MACS-Puffer, 1400 µL			
Zentrifugation		10 min	+4 °C, 300 rpm	
Überstand absaugen				
Resuspension	MACS-Puffer, 500 µL			
Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauerkammer				
Zwischenlagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

8.2.5 Immunhistochemische Markierung von Sphären

EdU / Nestin – Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Verdünnung
5 DIV Sphärenbildungs-Assay mit Proliferationsmedium + 10 µM EdU			
Suspension mit Sphären in Filtereinsatz mit Membran übertragen und in 24-Well Platten einhängen*			
PFA 4 %	20 min	+4 °C	
3 % BSA in 1x PBS	5 min	RT	
0,2 % Triton X-100 in PBS	20 min	RT	
3 % BSA in 1x PBS	5 min	RT	
- ab hier lichtgeschützt -			
Click-iT Reaktionslösung - Click-iT Reaktionspuffer - CuSO ₄	30 min	RT	

- Alexa Fluor Säure - Reaktionspuffer Zusatz			
1x PBS	5 min	RT	
mouse anti-Nestin	über Nacht	+4 °C	1:200
1x PBS	5 min	RT	
donkey anti-mouse Alexa 488	60 min	RT	1:400
1x PBS	5 min	RT	
DAPI	10 min	RT	1:100
1x PBS	5 min	RT	
Ausstechen der Körbchenmembran mittels Biopsie Punch			
Eindeckeln der Membran mit aufliegenden Sphären mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save			
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C			

*Nach jedem Inkubationsschritt wird die jeweilige Inkubationslösung aus dem Membran-Korbchen auf Zellstoff gesetzt, ohne die Zellen komplett trocken zu legen.

Reaktionslösungen wurden dem Click-iT® EdU Fluor® 594 Imaging Kit (Molecular Probes®) entnommen und nach Anleitung angesetzt.

EdU / Bmi1 – Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Verdünnung
5 DIV Sphärenbildungs-Assay mit Proliferationsmedium + 10 µM EdU			
Suspension mit Sphären in Filtereinsatz mit Membran übertragen und in 24-Well Platten einhängen*			
PFA 4 %	20 min	+4 °C	
3 % BSA in 1x PBS	5 min	RT	
0,2 % Triton X-100 in PBS	20 min	RT	
3 % BSA in 1x PBS	5 min	RT	
- ab hier lichtgeschützt -			
Click-iT Reaktionslösung - Click-iT Reaktionspuffer - CuSO ₄ - Alexa Fluor Säure - Reaktionspuffer Zusatz	30 min	RT	
1x PBS	5 min	RT	
mouse anti-Bmi1	über Nacht	+4 °C	1:200
1x PBS	5 min	RT	
donkey anti-mouse Alexa 488	60 min	RT	1:400
1x PBS	5 min	RT	
DAPI	10 min	RT	1:100
1x PBS	5 min	RT	
Ausstechen der Körbchenmembran mittels Biopsie Punch			
Eindeckeln der Membran mit aufliegenden Sphären mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save			
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C			

*Nach jedem Inkubationsschritt wird die jeweilige Inkubationslösung aus dem Membran-Korbchen auf Zellstoff gesetzt, ohne die Zellen komplett trocken zu legen.

Reaktionslösungen wurden dem Click-iT® EdU Fluor® 594 Imaging Kit (Invitrogen) entnommen und nach Anleitung angesetzt.

EdU / Jag1 – Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Verdünnung
5 DIV Sphärenbildungs-Assay mit Proliferationsmedium + 10 µM EdU			
Suspension mit Sphären in Filtereinsatz mit Membran übertragen und in 24-Well Platten einhängen*			
PFA 4 %	20 min	+4 °C	
3 % BSA in 1x PBS	5 min	RT	
0,2 % Triton X-100 in PBS	20 min	RT	
3 % BSA in 1x PBS	5 min	RT	
- ab hier lichtgeschützt -			
Click-iT Reaktionslösung - Click-iT Reaktionspuffer - CuSO ₄ - Alexa Fluor Säure - Reaktionspuffer Zusatz	30 min	RT	
1x PBS	5 min	RT	
rabbit anti-Jag1	über Nacht	+4 °C	1:100
1x PBS	5 min	RT	
donkey anti-rabbit Alexa 488	60 min	RT	1:400
1x PBS	5 min	RT	
DAPI	10 min	RT	1:100
1x PBS	5 min	RT	
Ausstechen der Körbchenmembran mittels Biopsie Punch			
Eindeckeln der Membran mit aufliegenden Sphären mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save			
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C			

*Nach jedem Inkubationsschritt wird die jeweilige Inkubationslösung aus dem Membran-Körbchen auf Zellstoff gesetzt, ohne die Zellen komplett trocken zu legen.

Reaktionslösungen wurden dem Click-iT® EdU Fluor® 594 Imaging Kit (Invitrogen) entnommen und nach Anleitung angesetzt.

8.2.6 Proteinbeschichtung von Kulturplatten zur Adhäsion von Sphären

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholungen	Verdünnung
Poly-L-Ornithin in 1x PBS	über Nacht	+37 °C		15 µg/mL
Hepes-Hanks			3x	
Lagerung bei +4 °C, mit Parafilm versiegelt				
Fibronectin in 1x PBS	3 Std.	+37 °C		1 µg/mL
Hepes-Hanks				
Nach Absaugen beschichtete Kulturplatten unmittelbar verwenden				

8.2.7 Immunhistochemische Markierung von differenzierten Sphären

S100 / DAPI – Differenzierte Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholungen	Verdünnung
14 DIV Differenzierungs-Assay, Patches adhärert in 8-Chamber Kulturplatten				
200 µL Medium absaugen, 200 µL PFA 4 % zufügen, 200 µL absaugen				
PFA 4 %, 200 µL	15 min	+ 4°C		
1x PBS	15 min	RT	3x	
Blockadepuffer	30 min	RT		
rabbit anti-S100	60 min	RT		1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
donkey anti-rabbit Alexa 546	60 min	RT		1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
DAPI	10 min	RT		1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
Eindeckeln mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save				
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

E-Cadherin / DAPI – Differenzierte Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholungen	Verdünnung
14 DIV Differenzierungs-Assay, Patches adhärert in 8-Chamber Kulturplatten				
200 µL Medium absaugen, 200 µL PFA 4 % zufügen, 200 µL absaugen				
PFA 4 %, 200 µL	15 min	+4 °C		
1x PBS	15 min	RT	3x	
Blockadepuffer	30 min	RT		
rat anti-E-Cadherin	60 min	RT		1:2000
1x PBS	5 min	RT	3x	
donkey anti-rat Alexa 594	60 min	RT		1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
DAPI	10 min	RT		1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
Eindeckeln mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save				
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

FM1-43FX / MyosinVIIa / DAPI – Differenzierte Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholungen	Verdünnung
14 DIV Differenzierungs-Assay, Patches adhärert in 8-Chamber Kulturplatten				
Medium absaugen				
- ab hier lichtgeschützt -				
FM 1-43FX-Lösung	1 min	auf Eis		5 µg/mL
PFA 4 %	10 min	auf Eis		
1x PBS	5 min	auf Eis	3x	
Blockadepuffer	30 min	RT		
rabbit anti-MyoVIIa	60 min	RT		1:500
1x PBS	5 min	RT	3x	
donkey anti-rabbit Alexa 546	60 min	RT		1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
DAPI	10 min	RT		1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
Eindeckeln mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save				
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

MyosinVIIa / Sox2 / DAPI – Differenzierte Sphären – Maus p3-5

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Wiederholungen	Verdünnung
14 DIV Differenzierungs-Assay, Patches adhärert in 8-Chamber Kulturplatten				
200 µL Medium absaugen, 200 µL PFA 4 % zufügen, 200 µL absaugen				
PFA 4 %, 200 µL	15 min	+4 °C		
1x PBS	15 min	RT	3x	
Blockadepuffer	30 min	RT		
rabbit anti-MyoVIIa goat anti-Sox2	60 min	RT		1:500 1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
donkey anti-rabbit Alexa 488 donkey anti-goat Alexa 594	60 min	RT		1:400 1:400
1x PBS	5 min	RT	3x	
DAPI	10 min	RT		1:100
1x PBS	5 min	RT	3x	
Eindeckeln mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save				
Lagerung in Dunkelheit bei +4 °C				

8.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus dem Corti'schen Organ der Maus als zelluläres Ausgangsmaterial.....	26
Abbildung 2: Analyse einer heterogenen, primären Einzelzellsuspension zur Abgrenzung einer geeigneten Zellpopulation P1 für FACS-Zellsortierungen und durchflusszytometrische Untersuchungen nach MACS-Zellsortierung.	28
Abbildung 3: Analyse einer heterogenen, primären Einzelzellsuspension zum Ausschluss zellulärer Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörperbindung vor Zellsortierung.	31
Abbildung 4: Immunhistochemische Analyse einer heterogenen, primären Einzelzellsuspension aus Corti'schen Zellen der Maus als Ausgangspunkt für Effizienzprüfungen der Zellsortierung mittels MACS oder FACS.	34
Abbildung 5: Identifizierung von p75 ^{NTR+} und GLAST ⁺ Stammzellen des Corti'schen Organs der Maus mittels MACS-Zellsortierung und <i>in vitro</i> Kultivierung.	41
Abbildung 6: Identifizierung von p75 ^{NTR+} und GLAST ⁺ Stammzellen des Corti'schen Organs der Maus mittels FACS-Zellsortierung und <i>in vitro</i> Kultivierung.	46
Abbildung 7: Identifizierung von Stammzellen aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus mittels <i>in vitro</i> Notch-Signalweg-Inhibition.	55
Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis der membranständigen CD-Oberflächenmarker GLAST und p75 ^{NTR} im immaturren Corti'schen Organ der Maus.	63
Abbildung 9: Anreicherung von p75 ^{NTR+} und GLAST ⁺ markierten Zellen des postmortalen Corti'schen Organs der Maus mittels MACS.	66
Abbildung 10: Morphologische und quantitative Analyse der Sphärenbildungskapazität von MACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus.	71
Abbildung 11: Analyse der Sphärenbildung infolge mitotischer Zellteilung von MACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus mittels EdU-Assay.....	72
Abbildung 12: Qualitative Dokumentation der Stammzellartigkeit von <i>in vitro</i> generierten Sphären des postmortalen Corti'schen Organs der Maus nach MACS-Sortierung.....	73
Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von Differenzierungsmarkern in differenzierten Sphären des Corti'schen Organs der Maus nach MACS-Sortierung.....	76
Abbildung 14: Quantitative Analyse der immunhistochemischen Markierung mit Haar- und Stützzellmarkern in differenzierten Sphären des Corti'schen Organs der Maus nach MACS-Sortierung.	78
Abbildung 15: Isolierung von p75 ^{NTR+} und GLAST ⁺ markierten Zellen des postmortalen Corti'schen Organs der Maus mittels FACS.....	80
Abbildung 16: Quantitative Analyse der Sphärenbildungskapazität von FACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus.	82
Abbildung 17: Analyse der Sphärenbildung infolge mitotischer Zellteilung von FACS-sortierten Corti'schen Zellen der Maus mittels EdU-Assay.....	84

Abbildung 18: Qualitative Dokumentation der Stammzellartigkeit von *in vitro* generierten Sphären des postmortalen Corti'schen Organs der Maus nach FACS-Sortierung..... 85

Abbildung 19: Sphärenbildungskapazität von *in vitro* kultivierten Zellen aus dem apikalen, mittleren und basalen Segment des Corti'schen Organs der Maus. 87

Abbildung 20: Quantitative Analyse der immunhistochemischen Markierung mit Haar- und Stützzellmarkern in differenzierten Sphären nach segmentaler Sortierung des Corti'schen Organs der Maus..... 90

Abbildung 21: Quantitative Analyse des Differenzierungspotenzials nach chemischer *in vitro* Stimulation von differenzierten Sphären anhand immunhistochemischer Markierung..... 94

9 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. med. Hubert Löwenheim, der mich als Doktorvater in seinem Labor aufgenommen und meine erste wissenschaftliche Arbeit in der Regenerativen Medizin des Innenohrs ermöglicht hat.

Priv. Doz. Dr. Marcus Müller möchte ich für seine tatkräftige Unterstützung bei allen technischen und statistischen Fragen des Laboralltags, aber auch für die Unterstützung zur Korrektur und Einreichung dieser Arbeit danken.

Prof. Dr. Marlies Knipper war initial dafür verantwortlich, dass ich sowohl das Thema meiner Doktorarbeit als auch meine zukünftige ärztliche Fachrichtung in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde gefunden habe. Ich danke ihr für jeden guten Rat und Überzeugung, für die nötige Portion Druck und Kraft zur Finalisierung dieser Arbeit und für ihre Unermüdlichkeit in ihrer Tätigkeit als Sprecherin des IZKF-Promotionskollegs, für die alle Promotionsstudenten sehr dankbar sein werden.

Dem IZKF-Promotionskolleg der medizinischen Fakultät Tübingen möchte ich für das Doktorandenstipendium sowie für das umfangreiche Angebot an unterstützenden Lehrveranstaltungen danken.

Auch der „Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen“ (SET) danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herr Dr. med. Andreas Eckhard, der meinen ersten Schritten im Labor Verständnis und Geduld entgegengebracht und mir alle experimentellen Techniken dieser Arbeit vermittelt hat. Aurélie Dos Santos danke ich für die enge Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Experimenten. Beide haben mich auf meinem Weg in die Innenohrforschung begleitet, mit mir Höhen und Tiefen durchgestanden und konnten trotzdem mein wissenschaftliches Interesse weiter stärken. Vielen Dank für alles!

Dr. rer. nat. Karina Gültig danke ich für die unentbehrliche Hilfe im Labor und der Tierhaltung.

Für die fachliche Unterstützung, für Trost und Motivation, für ihre Freundschaft und für die gemeinsamen Erlebnisse, für die nötige Portion Licht unter dem Mikroskop danke ich: Andreas Eckhard, Aurélie Dos Santos, Mohamed Bassiouni, Heinz Arnold, Judith Kempfle und Péter Bakó. Vielen Dank für die unvergessliche Zeit!

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich stets bedingungslos unterstützt, aufbaut und motiviert, an mich zu glauben, mich darin bestärkt, meinen eigenen Weg zu gehen.

In liebevoller Erinnerung und Dankbarkeit an meine Großmutter, widme ich diese Arbeit ihr und meiner Familie.

Vielen Dank!

10 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Ngoc-Nhi Catharina Luu
Geburtsdatum und -ort	12.08.1988 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Studium

23.-24. November 2015	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
7.-9. Oktober 2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
6. April 2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2008 – 2015	Studium der Humanmedizin, Universität Tübingen

• Tutorenschaften, Famulaturen und Praktisches Jahr

07/2015 – 10/2015	Praktisches Jahr, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Klinik für Unfallchirurgie, Paracelsus-Krankenhaus Ruit, Kreiskliniken Esslingen
05/2015 – 06/2015	Praktisches Jahr, Department of Otolaryngology, Massachusetts Eye and Ear Infirmary der Harvard University, Boston, USA
03/2015 – 04/2015	Praktisches Jahr, Klinik für Ohren-, Nasen-, Hals- und Gesichtschirurgie, Universitätsspital Zürich, Schweiz
11/ 2014 – 03/2015	Praktisches Jahr, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Klinik für Kardiologie, Interdisziplinäre Notfallmedizin, Universitätsspital Zürich, Schweiz
04/2014 – 07/2014	Tutorin für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Tübingen
03/2014	Famulatur, Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Tübingen
08/2013 – 09/2013	Famulatur, Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Toronto General Hospital, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Kanada
07/2011 – 08/2011	Famulatur, Klinik für Hand-, Plastische-, Rekonstruktive und Verbrennungsmedizin, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Tübingen
02/2010 – 04/2010 08/2009 – 10/2009	Krankenpflegepraktikum, Department of Neurosurgery, Cedars Sinai Medical Center, Los Angeles, USA

• **Klinische Wahlfächer**

11/2012	Kurs – Plastisch-rekonstruktive Kopf und Hals Mikrochirurgie
12/2011	Differentialdiagnostik Chirurgie
10/2011	Ferienakademie der Virologie „Impfstoffe und Impfungen“, Ostallgäu, Präsentation „Impfung in Vietnam“
04/2011 – 06/2011	Grundkurs chirurgischer Techniken

• **Universitäre Weiterbildung**

06/2012	Summer School Tübingen „Comparative Medical Ethics“ in Kooperation mit der Alpert Medical School, Brown University, Providence
03/2012	Neurobiological Practical Course – Hearing Department of Otolaryngology, Hearing Research Center Tübingen

Stipendium

2012 – 2013	Promotionsstipendium – IZKF Promotionskolleg, Universität Tübingen
-------------	--

Schulbildung

20. Juni 2008	Abschluss, Abitur
1999 – 2008	Gymnasium Heidberg, Hamburg
1995 – 1999	Grundschule Krohnstieg, Hamburg

Kurse und Projekte

2008	Forschungsarbeit „Infrarotspektroskopie – Paracetamol“
2007 – 2008	Planung und Durchführung von Seminaren zur Infrarotspektroskopie für Lehrer der Staatlichen Gewerbeschule 13 Chemie, Pharmazie und Agrarwissenschaft, Hamburg
2006	Ethnologie-Projekt in Kooperation mit der Universität Hamburg
2006	Projekt „Interkultureller Dialog“, Arbeiter-Samariter-Bund, Polen

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
Englisch, Vietnamesisch
Spanisch, Latein (Großes Latinum)

Tübingen, 16.03.2016