

Originalien

HNO 2007 · 55:862–870
 DOI 10.1007/s00106-007-1538-4
 Online publiziert: 9. Mai 2007
 © Springer Medizin Verlag 2007

Redaktion

H.-P. Zenner, Tübingen

I. Nagy¹ · S. Fuchs² · A. Monge¹ · A. Huber¹ · D. Bodmer^{1,3}

¹ Klinik für Ohren-, Nasen-, Hals- und Gesichtschirurgie, Universitätsspital Zürich

² Institut für Zellbiologie, Departement für Biologie, Eidgenössisch Technische Hochschule Zürich, ETH-Hönggerberg HPM, Zürich

³ Zentrum für Integrative Humanphysiologie Zürich

Neurogene Stammzelltransplantation in die Cochlea

In den letzten Jahren hat die Forschung an und mit Stammzellen großes Interesse auf sich gezogen, da diese Zellen das Potenzial haben, defekte oder abgestorbene Zellen im Organismus zu ersetzen. Je nach Typ und Umgebung, in die sie eingebracht werden, können sich Stammzellen in ganz unterschiedliche Zelltypen entwickeln.

Interessant ist insbesondere die Anwendung von Stammzellen im Innenohr [5, 17, 21]. Die Haarzellen stellen die empfindlichsten Elemente im Innenohr dar, und ihre Schädigung bzw. ihr Tod ist der häufigste Grund für eine Schallempfindungsschwerhörigkeit. Da Haarzellen bei Säugetieren, anders als bei manchen Vögeln und Amphibien, nicht regenerieren, führt ihr Tod zu einem irreversiblen Gehörverlust. Patienten mit einem Hörverlust aufgrund unterschiedlichster Ursachen [11] verlieren an Lebensqualität [12]. Umso wichtiger ist es daher, das geschädigte Ohr z. B. durch Hörhilfen zu verbessern [1, 2, 13]. In jüngster Zeit wird ein neuer Ansatz erforscht: das Ersetzen geschädigter oder abgestorbener Haarzellen durch Stammzellen. Kürzlich konnten Studien publiziert werden, die erfolgreiche Transplantationen ins Innenohr beschreiben. So konnte gezeigt werden, dass sich hippocampale Stammzellen von Ratten nach Implantation in das Innenohr neugeborener Ratten teilweise ins cochleäre Epithel integrierten [8]. Ebenfalls ist es gelungen, neurogene Stammzellen in die Cochlea von gesunden und neomycin-geschädigten Innenohren zu transplantie-

ren [6]. Eine andere Studie konnte im Vergleich mit nichttransplantierten Kontrolltieren zeigen, dass neurogene Stammzellen nach Transplantation in die ischämiegeschädigte Cochlea das Hörvermögen der betroffenen Tiere verbessern konnte [3]. In dieser Studie wollten wir untersuchen, wie sich frisch isolierte neurogene Vorläuferzellen verhalten, wenn sie auf ein Corti-Organ *in vitro* und *in vivo* transplantiert werden.

Material und Methoden

Tiermodelle

Alle Tierversuche wurden gemäß aktueller Fassung des Tierschutzgesetzes und der Richtlinien und deren Prüfung durch das Kantonale Veterinäramt Zürich durchgeführt. Für die *In-vitro*-Studien wurden 7 Tage alte CL57BL/6 Mäuse (Harlan, Holland) und für die *In-vivo*-Studie 4 Wochen alte CL57BL/6 Mäuse (Harlan, Holland) verwendet.

Präparation des Innenohres für die *in vitro* Studie

7 Tage alte CL57BL/6 Mäuse wurden euthanasiert, das Innenohr wurde mikrochirurgisch entfernt. Das Corti-Organ wurde frei schwimmend in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM), supplementiert und mit 10% Kälberserum (FBS), 25 mM HEPES (Fluka, Schweiz) und 30 U/ml Penicillin (*In vitro*, Schweiz) kultiviert [18].

Gentamycin-Schädigung der Corti-Explantate *in vitro*

Nach Isolation wurde das Corti-Explantat zur Erholung für 24 h kultiviert [22]. Danach wurde eine Gentamycin-Lösung (*In vitro*, Schweiz) dazugegeben (Endkonzentration 200 μ M). Bei unbehandelten Kontroll-explantaten wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Explantate wurden nun für 48 h kultiviert. Danach wurden die Explantate gewaschen, und es wurde serumfreies Medium zusammen mit N₂-Supplement, 20 ng/l EGF sowie 50 ng/ml IGF-1 (*In vitro*, Schweiz) dazugegeben, um die Explantate für die Stammzelltransplantation vorzubereiten.

Isolation von neuronalen Vorläuferzellen

Neurale Vorläuferzellen wurden von E9,5 Tage alten Mausembryonen isoliert. Für jedes Experiment wurden 4 schwangere Mäuse mittels CO₂ euthanasiert, die Embryonen isoliert und in eiskalte Hanks-Salzlösung (HBSS) zusammen mit Ca/Mg überführt (*In vitro*, Schweiz). Anschließend wurde von jedem Embryo der Neuraltubus isoliert und in HBSS zusammen mit Phenolrot und Dispase überführt (Sigma-Aldrich Chemie, Schweiz). Daraufhin wurden die Neuraltuben in DMEM zusammen mit 10% FBS überführt und die Neuraltuben wurden verdaut, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten: 2% Trypsin/HBSS mit Phenolrot und zentrifugiert bei 2000 rpm für 2 Mi-

nuten. Die Zellen wurden anschließend in DMEM-F12 (Invitrogen, Schweiz) resuspendiert und supplementiert mit 25 ng/ml bFGF (Invitrogen, Schweiz), 100 µg/ml Transferrin (Invitrogen, Schweiz), 5 µg/ml Insulin (Invitrogen, Schweiz), 16 µg/ml Putrescine (Invitrogen, Schweiz), 20 nM Progesteron (Sigma-Aldrich Chemie, Schweiz), 30 nM Seleniussäure (Sigma-Aldrich Chemie, Schweiz), 1 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich Chemie, Schweiz), 2% B27-Supplement (Invitrogen, Schweiz) und 10% Hühnerembryo-Extrakt (selbst hergestellt). Die Zellen wurden in Neubauer-Kammern gezählt, und 3×10^5 Zellen wurden auf mit Fibronectin beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert und für 24 h bei 37°C und 1% O₂ sowie 5% CO₂ kultiviert (■ **Abb. 1**) [9].

Infektion der Vorläuferzellen mit einem GFP-exprimierenden Adenovirus

Die Vorläuferzellen wurden mit einem Adenovirus infiziert, der GFP exprimiert (500 Viruspartikel pro Zelle); 16 Stunden nach Infektion wurden die Zellen gewaschen, in PBS Lösung aufgenommen und transplantiert.

Charakterisierung der neurogenen Vorläuferzellen

Die GFP⁺-neuralen Vorläuferzellen wurden mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit 5% Triton X-100 in PBS zusammen mit 10% FBS permeabilisiert. Folgende Antikörper wurden verwendet, um die Vorläuferzellen zu charakterisieren: Nestin (Maus, monoklonal, #556309, BD Biosciences, Schweiz) 1:200 2 h bei Raumtemperatur, Sox-2 (Kaninchen, monoklonal, S7693, Sigma Aldrich Chemie, Schweiz) 1:200 2 h bei Raumtemperatur, Myosin VIIa (Ziege, polyklonal, A-16, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1:100 2 h bei Raumtemperatur, Tuji1 (Maus, monoklonal, C4585, Sigma-Aldrich Chemie, Schweiz) 1:100 2 h bei Raumtemperatur, Math1 (Kaninchen, polyclonal, Abcam, Cambridge, England) 1:100 2 h bei Raumtemperatur, Texas Red X-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:300 für 1 h bei Raumtemperatur. Die entsprechenden sekundären

Hier steht eine Anzeige.



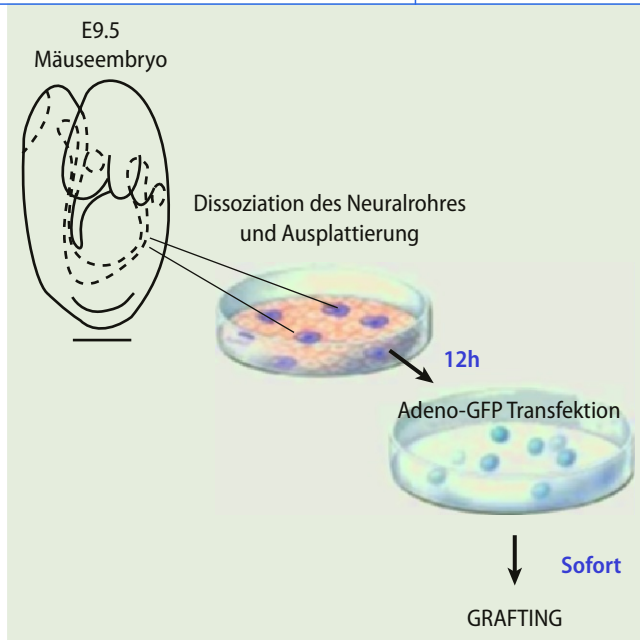


Abb. 1 ◀ Entnahme der neuronalen Vorläuferzellen von E9,5 Tage alten Mäusembryonen. Danach Infektion mit einem GFP-exprimierenden Adenovirus

fluoreszierenden Antikörper wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; 1:300). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (1 min). Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Schweiz) visualisiert und fotografiert (AxioCam Carl Zeiss, Schweiz; **Abb. 2**).

Transplantation von Vorläuferzellen auf Innenorexplantate in vitro

In Zellkulturplatten, die jeweils 3 Corti-Organen enthielten, wurden 2×10^4 GFP⁺-neurogene Vorläuferzellen transferiert. Die infizierten Explantate wurden daraufhin in serumfreiem Medium mit N₂ Supplement, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF und 50 ng/ml IGF-1 für 7 Tage kultiviert.

Immunhistochemie

Nach der Kultivierung wurden die Innenorexplantate zusammen mit den adhären GFP⁺-Vorläuferzellen in 4% Paraformaldehyd fixiert und mittels 5% Triton X-100 in PBS zusammen mit 10% FBS permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Corti-Explantate mit Texas Red X-phalloidin (1:300; Molecular Probes, Eugene, USA) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Explantate zusammen mit den Vorläuferzellen wurden mittels einem Inversions-Fluoreszenzmikroskop

(Olympus, Schweiz) visualisiert und Bilder mittels einer AxioCam (Carl Zeiss, Schweiz) aufgenommen (**Abb. 3**).

Gentamycin-Injektion in das Maus-Mittelohr

Fünf 4 Wochen alte CL57BL/6 Mäuse wurden durch eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran (400 ml/Min) und Sauerstoff (300 ml/min; Abbot Laboratories, Schweiz) anästhetisiert. Danach wurde den Tieren mit einer Mikronadel (0,33 mm 29 G; BD Biosciences, Schweiz) 50 µl einer 100 mM Gentamycin-Lösung transtympanal ins rechte Mittelohr injiziert. Nach erfolgter Injektion wurden die Narkosegase abgestellt und das Tier erhielt reinen Sauerstoff, bis es vollständig wach war. Die Tiere wurden in die Käfige überführt und für 2 Tage genau beobachtet. Sie zeigten ein normales Verhalten und es gab keine Hinweise für eine Infektion.

Transplantation von neurogenen Vorläuferzellen ins Mausinnenohr in vivo

Zwei Tage nach Gentamycin-Injektion ins Mittelohr wurden die Mäuse erneut anästhetisiert. Danach wurde über einen endauralen Zugang mittels einer feinen Nadel (0,33 mm 29 G) transpromontorial 50 µl einer Suspension neurogener Vor-

läuferzellen (3×10^4 GFP⁺ Zellen in PBS) ins rechte Innenohr appliziert. Die Wunde wurde dann mittels 6-0 Seide verschlossen. Während der Narkose starb 1 Tier von 5, die restlichen Tiere erholten sich gut und zeigten keine Hinweise für Schmerzen oder sonst ein auffälliges Verhalten über 11 Tage.

Immunhistochemische Analyse der transplantierten Zellen, HE-Färbung der Felsenbeine

Die Tiere wurden 11 Tage nach Implantation der Vorläuferzellen euthanasiert und das Corti-Organ wurde bei 50% der Tiere entfernt und aufgearbeitet. Die Fixation der Organe und die Färbung mit Texas Red X-phalloidin sowie mit DAPI wurden wie früher beschrieben [18] durchgeführt. Die Vorläuferzellen wurden mit einem Antikörper gegen GFP (Kaninchen, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 1:100 dargestellt. Die Organe zusammen mit den Vorläuferzellen wurden mittels eines Inversions-Fluoreszenzmikroskopes (Olympus, Schweiz) visualisiert und Bilder mittels einer AxioCam (Carl Zeiss, Schweiz) aufgenommen (**Abb. 4**). Bei den anderen 50% der Tiere wurde, nach Perfusion derselben mit 4% Paraformaldehyd, das Felsenbein entkalkt, geschnitten und mit HE eingefärbt (**Abb. 5**).

Ergebnisse

Charakterisierung der neurogenen Vorläuferzellen

Frisch isolierte neurogene Vorläuferzellen der Maus (9,5d) exprimieren 1 Tag nach viraler Infektion die Stammzellmarker Nestin und Sox-2, den Marker Tuji für unreifes neuronales Gewebe und GFP als Zeichen der erfolgten viralen Transfektion (**Abb. 2**). Der Haarzellmarker Myosin VIIa wird nicht exprimiert, ebenso lässt sich keine Anfärbung mit Texas Red X-phalloidin nachweisen. Die hier verwendete Konzentration von Texas Red X-phalloidin ist so gewählt, dass es nur die Haarzellen mit stark gebündeltem F-Aktin in den Stereozilien anfärben würde, andere Zellen mit tieferem F-Aktin Ge-

halt werden durch die niedrige Konzentration nicht gefärbt (■ **Abb. 2**).

Neurogene Vorläuferzellen setzten sich *in vitro* auf geschädigte Corti-Organ

Frisch isolierte neurogene Vorläuferzellen überleben, wenn sie auf ein geschädigtes Corti-Organ aufgebracht werden über 7 Tage (■ **Abb. 3**). Interessanterweise finden sich die Zellen nicht zufällig über das Organ verteilt, sondern in einer linearen Anordnung parallel zu den Haarzellreihen.

Nachweis neurogener Vorläuferzellen in der Kochlea nach Transplantation

Elf Tage nach Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen ins Gentamycin-geschädigte Innenohr finden sich GFP⁺-Zellen im Bereich des Corti-Organs neben den Haarzellen. Daneben zeigt sich das die Gentamycin-Applikation viele Haarzellen geschädigt hat; es lassen sich nur die inneren Haarzellen sowie die zweite und dritte Reihe der äußeren Haarzellen abgrenzen (■ **Abb. 4**). Interessanterweise finden sich die GFP⁺ Zellen an den Stellen, wo sich sonst Haarzellen befunden haben. Allerdings zeigt die Kernfärbung mit DAPI, dass die Kerne der Vorläuferzellen sich nicht auf Höhe der Haarzellkerne finden, sondern etwa auf Höhe der Haarzell-Stereozilien. Im Innenohr von transplantierten Mäusen zeigt sich kein Hinweis für eine Entzündungsreaktion oder eine Alteration des Corti-Organs.

Das Innenohr von transplantierten Mäusen zeigt keine Hinweise auf eine Infiltration von Entzündungszellen bis am 11. Tag nach der Transplantation. Ebenfalls zeigen sich eine intakte Basilar- und Reissner-Membran (■ **Abb. 5**).

Diskussion

In dieser Studie zeigen wir, dass frisch isolierte neurogene Vorläuferzellen in der Lage sind, sich auf einem geschädigten Corti-Organ *in vitro* niederzulassen und dass sich nach *In-vivo-Transplantation* von neurogenen Vorläuferzellen in ein

Zusammenfassung · Abstract

HNO 2007 · 55:862–870 DOI 10.1007/s00106-007-1538-4
© Springer Medizin Verlag 2007

I. Nagy · S. Fuchs · A. Monge · A. Huber · D. Bodmer

Neurogene Stammzelltransplantation in die Kochlea

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Stammzelltherapie ist insbesondere im Hinblick auf eine Applikation im Innenohr interessant, da die Haarzellen nicht regenerieren. Einmal abgestorbene Haarzellen werden nicht ersetzt, es kommt zu einem irreversiblen Hörverlust. In den vergangenen Jahren konnten Stammzellen mit wechselndem Erfolg ins Innenohr appliziert werden, zum Teil haben sie sich zu Innenohrzellen entwickelt. In der vorliegenden Studie wollten wir untersuchen, wie sich neuronale Vorläuferzellen verhalten, wenn sie *in vitro* und *in vivo* auf ein geschädigtes Innenohr aufgebracht werden.

Methoden. Neuronale Vorläuferzellen wurden von E9,5 Tage alten Mausembryonen isoliert und danach mit einem Virus, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, infiziert. In der Folge wurden die GFP⁺-neuronalen Vorläuferzellen sowohl auf ein geschädigtes Corti-Organ *in vitro* aufgebracht als auch Mäusen ins zuvor geschädigte Innenohr *in vivo* appliziert. Anschließend wurden die Vorläuferzellen bzw. ihr Bezug zum Corti-Organ analysiert.

Ergebnisse. Sowohl auf ein geschädigtes Corti-Organ aufgebrachte GFP⁺-neurale Vorläuferzellen als auch *in vivo* in geschädigte Innenohren transplantierte GFP⁺-neurale Vorläuferzellen konnten nach Transplantation nachgewiesen werden. Interessanterweise haben sich die GFP⁺-neuronalen Vorläuferzellen nicht zufällig auf dem Organ niedergelassen, sondern ein gewisses Muster gezeigt. Insbesondere konnte nach der *In-vivo*-Applikation gesehen werden, dass die GFP⁺-neuronalen Vorläuferzellen sich im Bereich des Corti-Organs in der Region von abgestorbenen Haarzellen angesiedelt haben.

Schlussfolgerung. Neuronale Vorläuferzellen haben ein großes Potenzial, einmal abgestorbene Haarzellen zu ersetzen. Allerdings braucht es noch intensive Forschung bis zur klinischen Anwendung.

Schlüsselwörter

Corti-Organ · Gehörsverlust · Innenohr · Kochlea · Regeneration · Stammzellen

Transplantation of neural stem cells into the cochlea

Abstract

Background. Stem cell therapy is especially interesting for inner ear related diseases, since the hair cells are very sensitive and do not regenerate. Hair cell loss is therefore irreversible and is accompanied by hearing loss. In the last few years, different research groups have transplanted stem cells into the inner ear with promising results. In the presented study, our aim was to gain insight into how neuronal stem cells behave when they are transplanted, both *in vitro* and *in vivo*, into a damaged inner ear.

Methods. Neuronal stem cells from E9.5 day old mouse embryos were collected and infected with an adenoviral vector encoding green fluorescent protein (GFP). GFP⁺ cells were then transplanted into a damaged or-

gan of Corti *in vitro* or into a damaged mouse inner ear *in vivo*.

Results. We were able to detect GFP⁺ cells close to the organ of Corti *in vitro* and in the organ of Corti *in vivo*. The GFP⁺ cells do not seem to be randomly distributed in either the *in vitro* or *in vivo* situation. Most interestingly, GFP⁺ cells could be detected close to places where hair cells had been lost *in vivo*.

Conclusion. Neuronal stem cells are interesting candidates to replace lost hair cells. However, a great deal of research is still needed before they can enter clinical trials.

Keywords

Organ of Corti · Hearing loss · Inner ear · Cochlea · Regeneration · Stem cell therapy

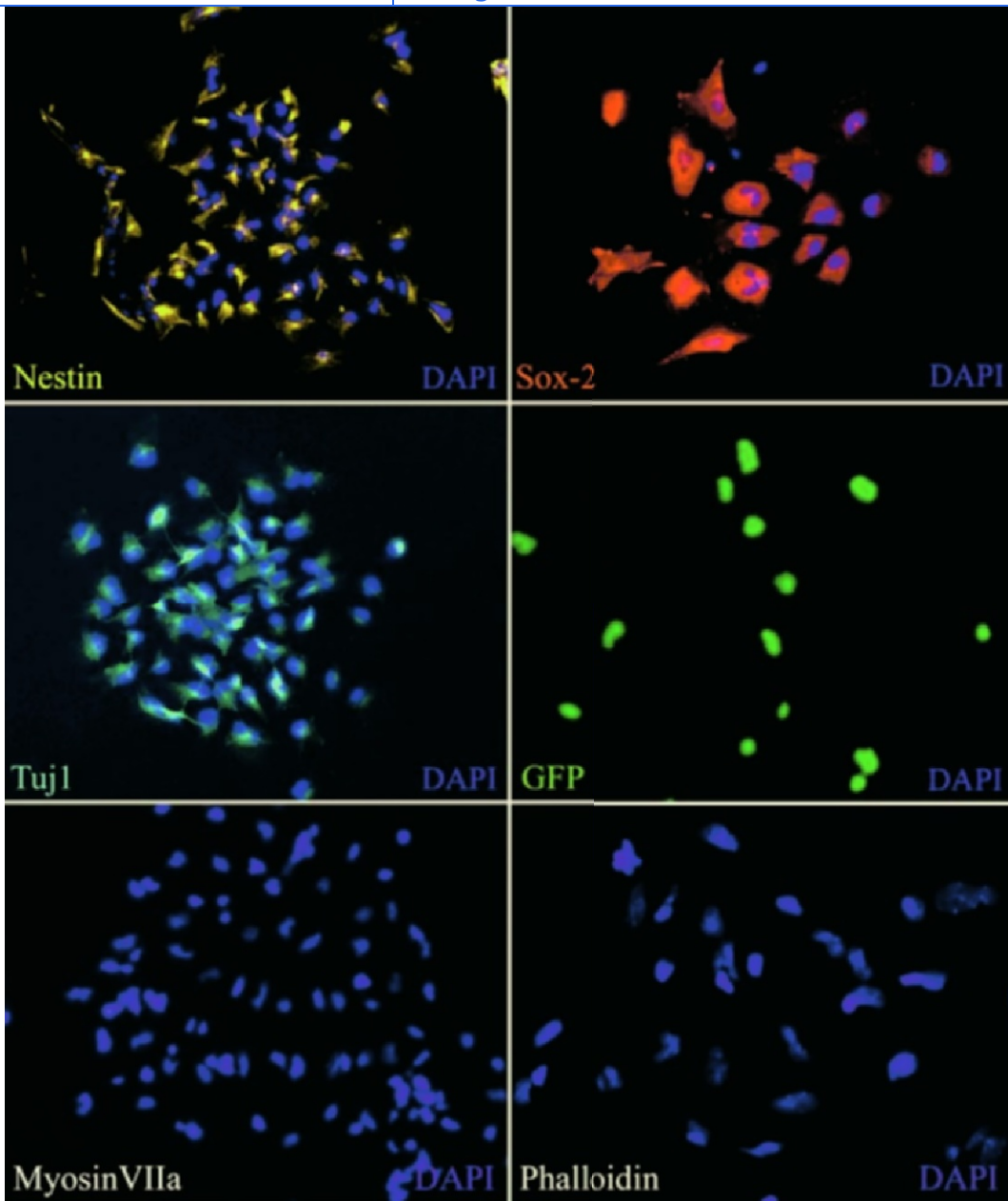


Abb. 2 ▲ Die neuralen Vorläuferzellen sind positiv für Nestin (*gelb*) und Sox-2 (*rot*, zwei Stammzellmarker) sowie für Tuj1 (*grün*, ein Marker für unreifes neurales Gewebe) und für GFP (*grün*, als Zeichen für die virale Transduktion). Die Zellen sind negativ für den Haarzellmarker Myosin VIIa und färben sich nicht mit Texas Red X-phalloidin (färbt F-Aktin). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (*blau*)

geschädigtes Innenohr sogar Vorläuferzellen an Orten finden, an denen sich zuvor Haarzellen befunden haben. Daneben zeigt sich, dass es auch nach 11 Tagen nach Transplantation zu keiner Entzündungsreaktion im Innenohr gekommen ist.

Bisher konnten verschiedene Forschungsgruppen über erfolgte Transplantationen von embryonalen Stammzellen ins Innenohr berichten. Die transplantierten Zellen konnten sogar noch nach mehreren Wochen im Innenohr nachgewiesen werden [6]. Kürzlich ist berichtet

worden, dass die Zellen sich 9 Wochen nach Transplantation in der Scala media nachweisen ließen, allerdings ist es zu keiner Integration ins Corti-Organ gekommen, deshalb konnte auch keine Hörverbesserung im transplantierten Ohr im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite nachgewiesen werden [4]. Obwohl wir in dieser Arbeit keine Daten über eine Integration der Vorläuferzellen ins Corti-Organ der Mäuse haben, halten wir dies eher für unwahrscheinlich.

Viele Gruppen haben embryonale Stammzellen über längere Zeit kultiviert, weshalb es möglich ist, dass die Zellen einen Teil ihrer Differenzierungsmöglichkeiten verloren haben. Wir haben, um diese Möglichkeit auszuschließen, die Vorläuferzellen für jedes Experiment frisch isoliert. Es wurden bereits Stammzellen aus dem Innenohr isoliert und transplantiert [14, 16, 20]. Wir haben uns jedoch aufgrund der besseren Isolierbarkeit für neurogene Vorläuferzellen entschieden. Arbeiten zeigen, dass neu-

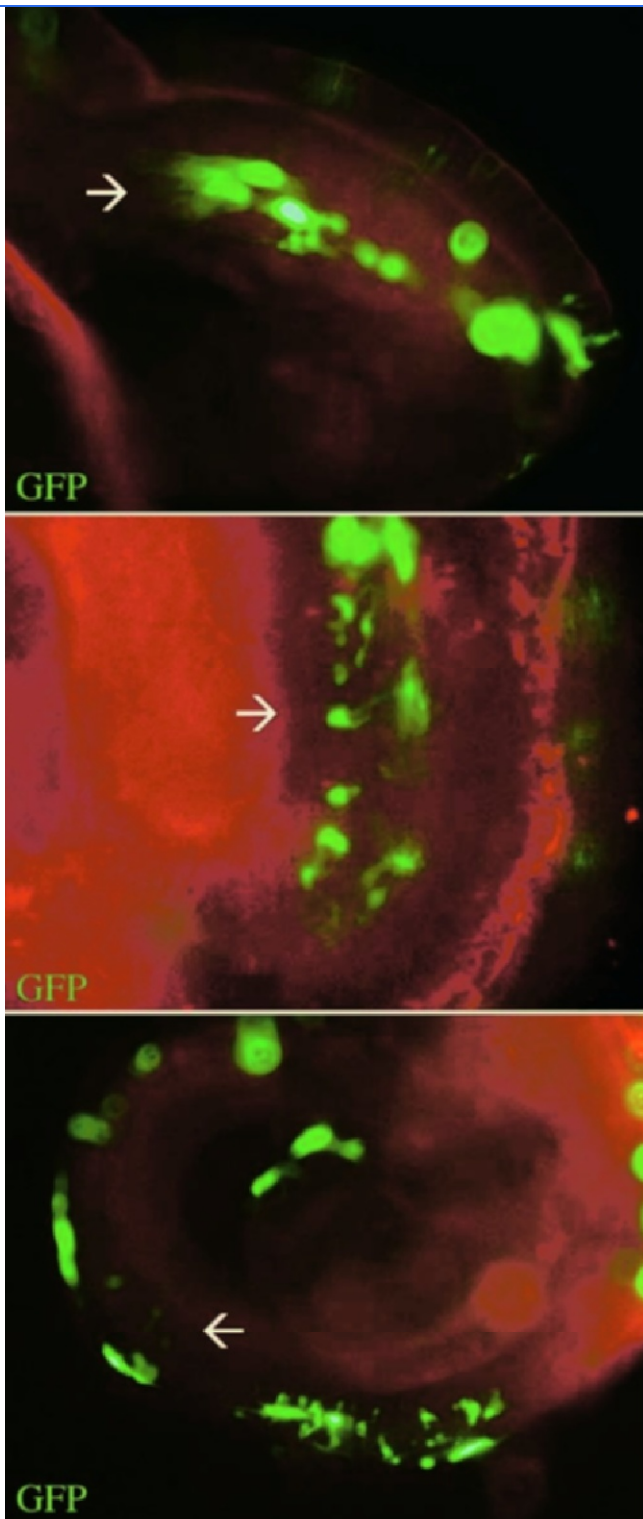


Abb. 3 ▲ Die grün leuchtenden GFP⁺ Vorläuferzellen (Pfeil) finden sich nach In-vivo-Transplantation in linearer Anordnung und parallel zu den Haarzellreihen des durch Gentamycin geschädigten Corti-Organs (rot gefärbt mit Texas Red X-phalloidin)

rogene Vorläuferzellen das Potenzial haben könnten, sich in Haarzellen zu differenzieren [10].

Um sich ins Corti-Organ integrieren zu können, müssen die Stammzellen in der kaliumreichen Endolymphe überleben können. Dies scheint, wie die erfolgreichen Transplantationsexperimente zeigen, der Fall zu sein. Auch die frisch isolierten Vorläuferzellen in unserem Experiment konnten in der Endolymphe überleben, weil wir sie 11 Tage nach Transplantation nachweisen konnten.

Je nach Applikationsort müssen die Zellen die Fähigkeit haben, vom perilymphatischen in den endolymphatischen Raum zu gelangen, d. h. sie müssen die Lamina reticularis, die die eigentliche Barriere zwischen diesen beiden Kompartimenten darstellt, überwinden können. Ob die Zellen in unserem Fall die Lamina passieren mussten, ist unklar, da wir die Zellen transpromontorial ins Innenohr appliziert haben und so die Möglichkeit einer direkten Inokulation in den endolymphatischen Raum besteht. Die Lamina reticularis stellt normalerweise wegen ihren zahlreichen „tight junctions“ eine Barriere dar. Allerdings ist diese Barriere nicht statisch, so konnte zum Beispiel demonstriert werden, dass es nach Lärmtrauma zu einer Rearrangierung von „tight junctions“ kommt [19]. Es scheint durchaus möglich, dass Stammzellen unter gewissen pathologischen Bedingungen durchaus die Lamina passieren können.

Interessant ist die Lokalisation, wo wir die transplantierten Vorläuferzellen beobachten konnten: So zeigen sich nach *In-vitro-Transplantation* die GFP⁺-Zellen in einem gewissen Abstand und fast parallel zum Corti-Organ, während sich die Zellen nach *In-vivo-Transplantation* im Bereich des Corti-Organs finden. Was ist dafür verantwortlich? Arbeiten haben gezeigt, dass für die Differenzierung der Stammzellen in verschiedene Zelltypen die Umgebung, respektive das Milieu, in dem sich die Zellen finden, entscheidend ist. Offenbar führt das Zellkulturmedium zusammen mit dem Corti-Organ zur beobachteten Lokalisation *in vitro*, während das aminoglykosidgeschädigte Corti-Organ *in vivo* eine andere Lokalisation der GFP⁺ Zellen bewirkt.

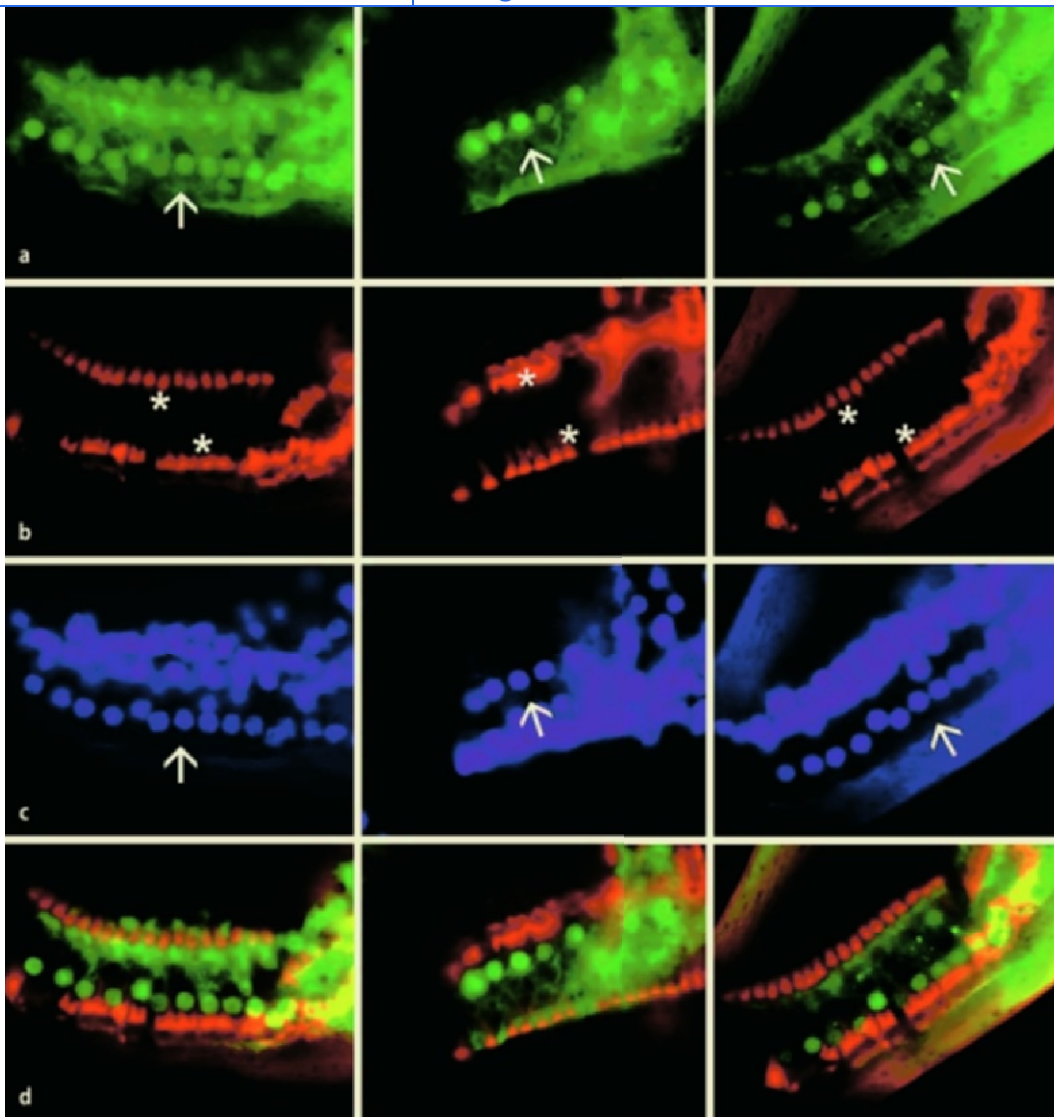


Abb. 4 ▲ Nach Transplantation von Vorläuferzellen in ein geschädigtes Innenohr einer Maus *in vivo* zeigen sich die grün gefärbten GFP⁺-Vorläuferzellen (**a**, Pfeil) an den Stellen, wo sich zuvor die Haarzellen befunden haben. Rot (Texas Red X-phalloidin) färben sich die mit Gentamycin geschädigten Haarzellen an (**b**, Stern). Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt (**c**). Die Kerne der Vorläuferzellen befinden sich auf Höhe der Haarzellstereozilien (Pfeil). **d** Überlapung der GFP⁺ und Texas-Red-X-phalloidin-Färbung

In den meisten Studien wurden die Stammzellen über einen retroaurikulären Zugang und nach Exposition der auditorische Bulla ins Innenohr appliziert [4, 7]. Dieser Zugang eignet sich für größere Labortiere, wie z. B. Meerschweinchen. Wir haben in unserer Studie 4 Wochen alte Mäuse verwendet, um die embryonalen Mausstammvorläuferzellen nicht auf eine andere Spezies übertragen zu müssen. Aufgrund der schlecht ausgebildeten Bulla in diesem Alter haben wir die Vorläuferzellen direkt über einen endauralen Zugang transpromontorial ins Innenohr appliziert. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Zellen nicht in definierte Stellen

des Innenohres gelangen und dass dabei die otische Kapsel verletzt wird.

Wir haben die neuronalen Vorläuferzellen vor der Transplantation charakterisiert. Die Vorläuferzellen exprimieren – wie erwartet – *Tuj1* als Marker für unreifes neuronales Gewebe sowie die Stammzellmarker *Nestin* und *Sox-2*, waren aber negativ für den Haarzellmarker *Myo7A* und für das Zytoskelett Protein F-Aktin. Die frisch isolierten neuronalen Vorläuferzellen exprimieren auch den Marker *Math1*. Ab E13,5 erscheinen die ersten *Math1*-exprimierenden Zellen in der Kochlea. Diese Zellen entwickeln sich zu Haarzellen des Innenohrs, die *Math1*-Expression ist notwendig für die Regulation des sen-

sorischen Epithels [23]. Unsere neurogenen Vorläuferzellen stammen aus dem Neuralrohr von E9,5 alten Mäuseembryonen. Hier ist *Math1* ein Marker für dorsale Interneuron-Vorläuferzellen, die sich wahrscheinlich weiter teilen.

Zu beachten ist, dass wir nach Transplantation keine Abstoßungsreaktion im Innenohr beobachtet haben. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur; so beobachtete Hildebrand auch nach Xenotransplantation (Mausstammzellen in Meerschweinchen) keine immunologische Reaktion des Innenohres auf die eingebrachten Stammzellen [4]. Es wird spekuliert, dass die Blut-Kochlea-Schranke allenfalls zum Teil für diese Beobach-

tung verantwortlich ist. Die Blut-Kochlea-Schranke soll im Innenohr ein Kompartiment schaffen, das der systemischen Immunität nicht leicht zugänglich ist, sodass die zarten Innenohrstrukturen vor einem Angriff des Immunsystems geschützt sind [15].

Fazit für die Praxis

Die Anwendung von Stammzellen als Ersatz für abgestorbene Haarzellen stellt eine sehr interessante Anwendung von Stammzellen dar. Es braucht aber noch viel Forschung, bis eine klinische Anwendung in greifbare Nähe rückt.

Korrespondenzadresse

PD Dr. D. Bodmer

Klinik für Ohren-, Nasen-, Hals- und Gesichtschirurgie
Universitätsspital Zürich
Frauenklinikstr. 24, 8091 Zürich
Schweiz
daniel.bodmer@usz.ch

Danksagung. Diese Studie wurde durch den Forschungskredit 2005 der Universität Zürich unterstützt.

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Brosch S, Michels L, Mauz PS et al. (2005) [Factors influencing rehabilitation of sensorineural hearing loss with hearing aids]. *HNO* 53: 142–147
2. Gstottner W, Pok SM, Peters S et al. (2005) [Cochlear implantation with preservation of residual deep frequency hearing] *HNO* 53: 784–790
3. Hakuba N, Hata R, Morizane I et al. (2005) Neural stem cells suppress the hearing threshold shift caused by cochlear ischemia. *Neuroreport* 16: 1545–1549
4. Hildebrand MS, Dahl HH, Hardman J et al. (2005) Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *JARO* 6: 341–354
5. Holley MC (2005) Keynote review: The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development. *Drug Discov Today* 10: 1269–1282
6. Hu Z, Wei D, Johansson CB et al. (2005) Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res* 302: 40–47
7. Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I et al. (2004) Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. *Acta Otolaryngol (Suppl)* (551): 43–47
8. Ito J, Kojima K, Kawaguchi S (2001) Survival of neural stem cells in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 121: 140–142
9. Kalyani A, Hobson K, Rao MS (1997) Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev Biol* 186: 202–223

Hier steht eine Anzeige.



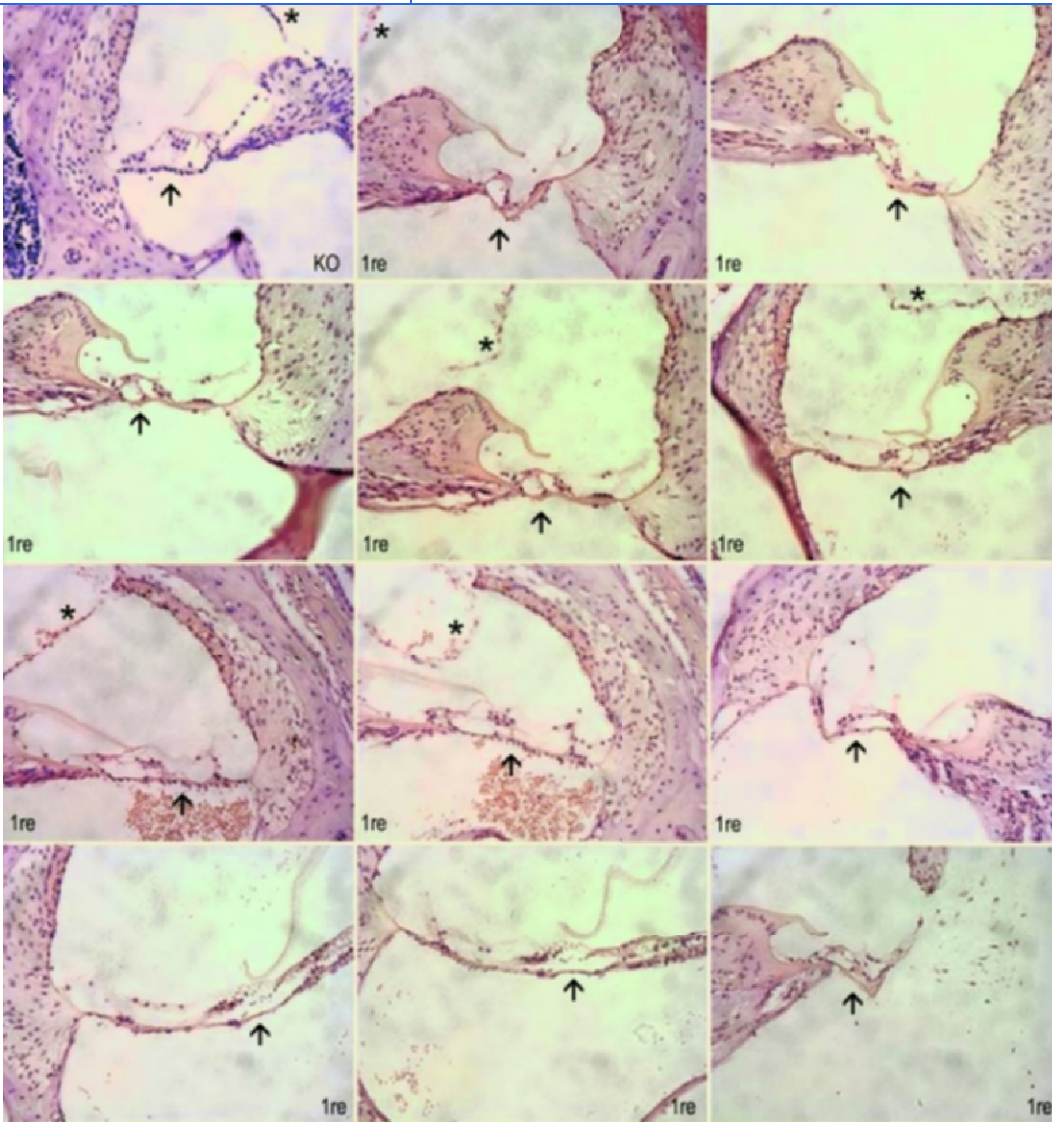


Abb. 5 ▲ Nach Transplantation von neurogenen Vorläuferzellen *in vivo* zeigt sich in der HE-Färbung im Innenohr kein entzündliches Infiltrat. Auch die Basilar- (Pfeil) und Reissner-Membranen (Stern) sind intakt

10. Kojima K, Tamura S, Nishida AT, Ito J (2004) Generation of inner ear hair cell immunophenotypes from neurospheres obtained from fetal rat central nervous system in vitro. *Acta Otolaryngol (Suppl)* (551): 26–30
11. Kunstmann E, Hildmann A, Lautermann J et al. (2005) [Congenital hearing loss. Molecular genetic diagnosis of connexin genes and genetic counselling]. *HNO* 53: 773–778
12. Lehl S, Funk R, Seifert K (2005) [The first hearing aid increases mental capacity. Open controlled clinical trial as a pilot study]. *HNO* 53: 852–862
13. Lesinski-Schiedat A, Illg A, Warnecke A et al. (2006) [Paediatric cochlear implantation in the first year of life: preliminary results]. *HNO* 54: 565–572
14. Li H, Liu H, Heller S (2003) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9: 1293–1299
15. Lin DW, Trune DR (1997) Breakdown of stria vascularis blood-labyrinth barrier in C3H/lpr autoimmune disease mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 530–534
16. Malgrange B, Belachew S, Thiry M et al. (2002) Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev* 112: 79–88
17. Matsui JI, Parker MA, Ryals BM, Cotanche DA (2005) Regeneration and replacement in the vertebrate inner ear. *Drug Discov Today* 10: 1307–1312
18. Nagy I, Monge A, Albinger-Hegyí A et al. (2005) NF-kappaB is required for survival of immature auditory hair cells in vitro. *JARO* 6: 260–268
19. Raphael Y, Altschuler RA (1991) Reorganization of cytoskeletal and junctional proteins during cochlear hair cell degeneration. *Cell Motil Cytoskeleton* 18: 215–227
20. Rask-Andersen H, Bostrom M, Gerdin B et al. (2005) Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in vivo demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* 203: 180–191
21. Sakamoto T, Nakagawa T, Endo T et al. (2004) Fates of mouse embryonic stem cells transplanted into the inner ears of adult mice and embryonic chickens. *Acta Otolaryngol (Suppl)* (551): 48–52
22. Sobkowicz HM, Bereman B, Rose JE (1975) Organotypic development of the organ of Corti in culture. *J Neurocytol* 3: 431–447
23. Woods C, Montcouquiol M, Kelley MW (2004) Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neuroscience* 7: 1310–1318