

Aus dem
Department für Anatomie
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

**Otische Differenzierung humaner iPS-Zellen:
Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf
Markerexpression und Entwicklung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Hollweg, Nils Maximilian

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

2. Berichterstatter: Professorin Dr. E. Reisinger

Tag der Disputation: 19.05.2026

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, in Liebe und Dankbarkeit für Ihre unermüdliche Unterstützung und Ihren Glauben an mich.

„ Was wäre das Leben, hätten wir nicht den Mut, etwas zu riskieren? “

- Vincent van Gogh -

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	1
II. Abbildungsverzeichnis.....	4
III. Tabellenverzeichnis.....	7
IV. Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Verschiedene Potenzen von Stammzellen.....	10
1.2 Das Gehörorgan.....	11
1.2.1 Makroskopie des Gehörorgans.....	13
1.2.2 Mikroskopie des Corti-Organs.....	15
1.2.3 Die Entwicklung des Innenohres.....	17
1.2.3.1 Die frühe menschliche Embryonalentwicklung.....	17
1.2.3.2 Die Neurulation mit Fokus auf die otische Plakode.....	19
1.2.3.3 Die Entstehung der präplakodalen Region.....	21
1.2.3.4 Die Entstehung der Plakoden mit Fokus auf die otische Plakode.....	23
1.2.3.5 Transkriptionsfaktoren und Marker der frühen otischen Differenzierung.....	24
1.2.3.6 Annexine und ihr Vorkommen in der otischen Entwicklung.....	26
1.3 Induziert pluripotente Stammzellen humanen Ursprungs.....	28
1.4 Dreidimensionale Organoidmodelle.....	30
1.5 Medien zur Kultivierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen.....	31
1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	33
2. Material und Methoden.....	35
2.1 Material.....	35
2.1.1 Ethikvotum.....	35
2.1.2 Chemikalien.....	35
2.1.3 Antikörper.....	35
2.1.4 Oligonukleotide.....	36
2.1.5 Geräte.....	37
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.7 Software und Internetressourcen.....	38

2.1.8 Hersteller	39
2.1.9 Stammzellmedien.....	40
2.1.10 Differenzierungsmedien	40
2.2 Methoden	42
2.2.1 Differenzierung der Innenohr-Organoiden.....	42
2.2.1.1 Organoiden einbetten	42
2.2.1.2 Schnittpräparate der Organoiden erstellen	42
2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung	43
2.2.2.1 Vorbereitung für die Primärantikörper-Behandlung.....	43
2.2.2.2 Herstellung der Primärantikörperlösungen und Auftragen	43
2.2.2.3 Herstellung der Sekundärantikörperlösungen und Auftragen	44
2.2.2.4 Dauerpräparate herstellen	44
2.2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie	44
2.2.3 RNA-Analyse	45
2.2.3.1 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	45
3. Ergebnisse	46
3.1 Expression von frühen otischen Marker-Proteinen.....	47
3.1.1 Markerexpression der NNE und PPR	47
3.1.2 Markerexpression der otischen Plakode	52
3.2 RNA-Expression an verschiedenen Differenzierungstagen in den verwendeten Stammzellmedien	58
3.2.1 RNA-Expression von <i>EYA2</i>	58
3.2.2 RNA-Expression von <i>ECAD</i>	59
3.2.3 RNA-Expression von <i>SIX1</i>	60
3.2.4 RNA-Expression von <i>PAX8</i>	61
3.2.5 RNA-Expression von <i>SOX9</i>	62
3.2.6 RNA-Expression von <i>SOX2</i>	63
3.2.7 RNA-Expression der <i>Annexine 1, 2, 4 und 5</i>	65
3.3 Annexine und ihre Expression in der frühen otischen Entwicklung	66
3.3.1 Expression von ANXA1	66
3.3.2 Expression von ANXA2 und ANXA4	67
3.3.3 Expression von ANXA5	68
4. Diskussion	70

4.1 Lassen sich in den Organoiden zu frühen Differenzierungszeitpunkten typische Markerproteine der frühen otischen Entwicklung nachweisen?	70
4.2 Gibt es im Hinblick auf folgende Unterpunkte Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Stammzellmedien?	72
4.2.1 Morphologie der frühen Organoide	72
4.2.2 Protein-Expression	73
4.2.3 RNA-Expression	76
4.3 Lassen sich publizierte Vertreter der Annexin Familie in den (frühen) otischen Organoiden nachweisen?	78
4.3.1 Protein-Expression	78
4.3.2 RNA-Expression	81
4.4 Ausblick	82
5. Zusammenfassung	84
6. Literaturverzeichnis	86
6.1 Verwendete Bücher	86
6.2 Verwendete Publikationen	86
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	
Danksagung	

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Corti-Organs in der Cochlea	16
Abbildung 2: Die Entwicklung von der Zygote bis zum vollständigen Organismus	18
Abbildung 3: Differenzierung des Ektoderms und Neurulation	20
Abbildung 4: Neurulation und Darstellung der otischen Entwicklung.....	21
Abbildung 5: Entwicklung des Ektoderms	22
Abbildung 6: Die Präplakodale Region und der Übergang zu den Plakoden ...	23
Abbildung 7: Gewinnung von iPSZ aus menschlichen Keratinozyten	30
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX6 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	48
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX6 in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	48
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX4 und TFAP2 α in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	49
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX4 und TFAP2 α in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	49
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung gegen EYA2 und ECAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	50
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung gegen EYA2 und ECAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	51
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX1 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	52
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX1 in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	52
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX8 und ECAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	53
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX8 und ECAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	54
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX9 und NCAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	55

Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX9 und NCAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	55
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX2 und ECAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	56
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX2 und ECAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden	57
Abbildung 22: <i>EYA2</i> - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	59
Abbildung 23: <i>ECAD</i> - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	60
Abbildung 24: <i>SIX1</i> - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung.....	61
Abbildung 25: <i>PAX8</i> - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	62
Abbildung 26: <i>SOX9</i> - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	63
Abbildung 27: <i>SOX2</i> - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	64
Abbildung 28: <i>ANXA1,2,4</i> und <i>5</i> - Expression der in PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung	65
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA1 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	66
Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA2 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	67
Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA4 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden.....	68

Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA5 in PT-differenzierten
hiPSZ-basierten Organoiden..... 68

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	35
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper	35
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper	36
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide	37
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	37
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	38
Tabelle 7: Verwendete Software	39
Tabelle 8: Verwendete Internetressourcen.....	39
Tabelle 9: Verwendete Hersteller	39
Tabelle 10: Verwendete Stammzellmedien	40
Tabelle 11: Verwendete Differenzierungsmedien.....	40
Tabelle 12: Expression verschiedener Marker-Proteine.....	57
Tabelle 13: Expression verschiedener Gene.....	65

IV. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AHNAK	giant ankyrin repeat-containing protein
AK	Antikörper
ANXA	Annexin
BSA	Bovine serum Albumin
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
ca.	Circa
CDM	Chemically Defined Medium
C-MYC	Zelluläres myelocytomatose Protein
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECAD	Epithelial-Cadherin (Cadherin-1)
<i>et al.</i>	und andere
EYA2	Eyes absent homolog 2
FGF	Fibroblast Growth Factor
FTDA	FGF2/TGFβ/Dorsomorphin/Activin A
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMP	Good Manufacturing Practice
gt	goat
hESZ	humane embryonale Stammzellen
hiPSZ	humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPS-Zellen	humane induzierte pluripotente Stammzellen
<i>In vitro</i>	Im Glas / Reagenzglas
<i>In vivo</i>	Im lebenden Organismus
Kat. Nr.	Katalognummer
KLF4	Kruppel Like Factor 4
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ms	mouse

NCAD	Neural-Catherin (Cadherin-2)
NDS	Normal Donkey Serum
NE	neuronaies Ektoderm
NG	neurale Grenzzone
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NNE	nicht-neuronaies Ektoderm
OCT4	Octamer Binding Transcription Factor 4
OMM	Verwendetes Differenzierungsmedium
p	Wahrscheinlichkeitswert
PAX6	Paired Box 6
PAX8	Paired Box 8
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Lösung)
PPR	präplakodale Region
rb	rabbit
REF-Nr.	Referenznummer
SEM	Standartfehler des Mittelwerts
SHH	Sonic Hedgehog
SIX 1	Sine oculis homebox homolog 1
SIX 4	Sine oculis homebox homolog 4
SOX2	sex determining region Y-box 2
SOX9	sex determining region Y-Box 9
TFAP2 α	Transcription Factor AP-2 Alpha
TGF β	Transforming Growth Factor β
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Verschiedene Potenzen von Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die in der Lage sind, sich asymmetrisch zu teilen, nämlich in eine Zelle eines bestimmten Gewebetyps und eine erneute Stammzelle. So ist gewährleistet, dass die Population der Stammzellen immer gleichbleibt (Kurzlehrbuch Embryologie. S. 161. Ulfing. Thieme, Stuttgart 2005). Es gibt verschiedene Typen von Stammzellen, wobei diese nach der Potenz unterschieden werden. Die Potenz gibt dabei die Fähigkeit des jeweiligen Stammzelltypen an, in welche Zellen er sich differenzieren kann. Die höchste Potenz hat demnach die befruchtete Eizelle, welche auch Zygote genannt wird. Aus ihr allein entsteht durch Teilung der Embryo und somit der gesamte menschliche Organismus. So besitzt sie also die Fähigkeit sich in jegliche Zellen des menschlichen Organismus und auch in extraembryonales Gewebe, wie die Trophoblastenzellen, entwickeln zu können. Sie wird deshalb als totipotent bezeichnet (De Paepe et al., 2014, Ishiuchi and Torres-Padilla, 2013). Ebenfalls totipotente Stammzellen sind die Blastomeren, die durch Teilung der Zygote entstanden sind. Zellen mit einer eingeschränkten Potenz entstammen dem Blastozysten-Stadium, genauer gesagt der inneren Zellmasse der Blastozyste. Diese Zellen werden als humane embryonale Stammzellen bezeichnet (hESZ) und sind pluripotent (Ishiuchi and Torres-Padilla, 2013, Thomson et al., 1998). Das wiederum bedeutet, dass sie befähigt sind, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu entwickeln (Thomson et al., 1998). Des Weiteren gibt es noch adulte Stammzellen, welche sich nur noch in spezifische Gewebearten differenzieren können und z.B. zur Reparatur von geschädigtem Gewebe zuständig sind (Mayani, 2003). Diese adulten Stammzellen, darunter die hämatopoetischen Stammzellen, verbleiben zeitlebens im Organismus. Hier spricht man von multipotenten Stammzellen. Um in der Forschung ausgehend von einer Stammzelle in Richtung eines beliebigen Gewebetyps des Körpers differenzieren zu können, war bis vor nicht allzu langer Zeit die Verwendung von pluripotenten hESZ notwendig. Dies führte immer wieder zu ethischen Debatten (Passier and Mummery, 2003, Wert and Mummery, 2003, Jaenisch, 2004). Um pluripotente hESZ zu gewinnen war es

notwendig auf humane Embryonen aus abgebrochenen Schwangerschaften oder auch auf Embryonen, die bei *in vitro* Fertilisationen übrig geblieben sind zurückzugreifen (Mieth, 2000).

1.2 Das Gehörorgan

Das Ohr ist wohl eines der wichtigsten Sinnesorgane des menschlichen Körpers, da es zugleich Hör- und Gleichgewichtsorgan beherbergt. Durch die Aufnahme akustischer Reize besteht so die Möglichkeit Sprache zu erlernen und zu verstehen. Das Gehör ist somit essenziell für die menschliche Entwicklung, vor allem da die menschliche Sprache mit keiner tierischen Kommunikationsform vergleichbar ist (Pagel, 2017). Ein Verlust dieses Sinnes kann somit dazu führen, dass die Lebensqualität eingeschränkt wird und die oder der Betroffene in depressive Zustände verfällt (Dillard et al., 2023). Weiterhin würde ein Verlust sich auf die Sprachentwicklung, das allgemeine Wohlbefinden und auch den Bildungsstand auswirken (Kotby et al., 2008, Olusanya et al., 2014).

Das Ohr wird generell als das empfindlichste Sinnesorgan des Menschen bezeichnet (Physiologie des Menschen. S. 316. Schmidt, Lang, Heckmann. Springer, Würzburg/ Tübingen 2017). Dabei lassen sich in einem menschlichen Innenohr jeweils um die 3.500 innere Haarzellen und 11.000 äußere Haarzellen finden (Ashmore, 2008). Die Haarzellen können mechanosensitive Reize, die durch Schallwellen ausgelöst werden, wahrnehmen und in elektrische Reize umwandeln. Dabei ist das Hörorgan für alle akustischen Reize der Umwelt zuständig. Ergänzend dazu ist das Gleichgewichtsorgan verantwortlich für die Aufnahme von Bewegungsreizen und zur Orientierung der Lage des Kopfes im Raum. Da Haarzellen nicht die Fähigkeit zur Regeneration besitzen (Mizutari et al., 2013) und in ihrer Anzahl begrenzt sind, können verschiedene Ätiologien ursächlich sein. Zum einen kann das natürliche Altern zum Gehörverlust und/oder zum Gleichgewichtsverlust führen (Mattei et al., 2019), zum anderen kann der Gehörverlust bereits seit der Geburt bestehen oder sich durch Krankheiten entwickeln, wie zum Beispiel durch eine Mittelohrentzündung (Graydon et al., 2019). Weiterhin kann es auch durch Medikamentenmissbrauch, Unfälle oder aufgrund des fortgeschrittenen Alters zum Gehörverlust kommen

(Graydon et al., 2019). Hauptsächliche Ursachen für eine irreversible Schädigung der Haarzellen oder der neuronalen Strukturen sind der physiologische Alterungsprozess, eine gesteigerte Lärmexposition und die Einnahme ototoxischer Medikamente (Smith-Cortinez et al., 2023).

Betroffene anatomische Strukturen können unter anderem das Mittelohr, das Innenohr, sowie auch der Nervus cochlearis sein (Graydon et al., 2019). Schäden im Bereich des äußeren Ohres und/oder des Mittelohres führen zu einer Schallleitungsschwerhörigkeit, wohingegen Schäden im Bereich des Innenohres zu einer Schallempfindungsstörung führen (Anthwal and Thompson, 2016).

Nach geschätzten Angaben der World Health Organization (WHO) wurde die Zahl der Menschen mit Hörverlust 2011 bereits mit 360 Millionen angegeben, wobei sie seit 1985 um 318 Millionen gestiegen ist (Olusanya et al., 2014). Im Jahr 2019 wurde festgestellt, dass weltweit etwa 1,57 Milliarden Menschen von Hörverlust betroffen sind (Haile et al., 2021), womit dieser den am meisten vorkommende Sinnesverlust darstellt (Smith-Cortinez et al., 2023). Nach neueren Angaben der WHO wird erwartet, dass bis 2050 rund 2,5 Milliarden Menschen einen Hörverlust erleiden werden (WHO, 2025).

Durch die Entwicklung von sogenannten Cochlea-Implantaten ist es bei spezifischen Patientengruppen mit Gehörverlust möglich geworden, eine partielle Wiederherstellung der Gehörfunktion zu erhalten (Géléoc and Holt, 2014). Dabei wurden die ersten Cochlea-Implantate in den 1970er – Jahren eingeführt (Naples and Ruckenstein, 2020).

Durch neue Möglichkeiten im Bereich der Stammzellforschung wird große Hoffnung auf neue Therapiemöglichkeiten gesetzt. Mit Hilfe von hiPSZ können *in vitro* Modelle erstellt werden um pathophysiologische Prozesse besser zu verstehen, um neue Medikamente zu testen (Ohnishi et al., 2015) und um verschiedene Therapiemöglichkeiten zu erforschen. So wurde beispielsweise bereits in einer Studie an Tiermodellen mit adulten Mäusen gezeigt, dass durch eine Inhibition des Notch-Signalwegs eine mögliche Regeneration von Haarzellen erfolgen kann (Mizutari et al., 2013).

1.2.1 Makroskopie des Gehörorgans

Das Ohr kann anatomisch in drei Teilabschnitte untergliedert werden. Diese sind das äußere Ohr (*Auris externa*), das Mittelohr (*Auris media*) und das Innenohr (Labyrinth) (Anthwal and Thompson, 2016). Das äußere Ohr besteht aus der Ohrmuschel (*Auricula*) und dem äußeren Gehörgang (*Meatus acusticus externus*) mit dem Trommelfell (*Membrana tympanica*) als Abgrenzung zum Mittelohr und dient vor allem der Schallaufnahme, Schallweiterleitung und auch der Richtungsorientierung. Die Ohrmuschel besitzt ein knorpeliges Grundskelett mit häutigem Überzug. Die Haut erstreckt sich in den äußeren Gehörgang, welcher sich vom *Porus acusticus externus* bis zum Trommelfell erstreckt. Der äußere Gehörgang hat einen äußeren knorpeligen und einen inneren knöchernen Anteil. Das Trommelfell, welches mittels eines Faserknorpelrings (*Anulus fibrocartilagineus*) im *Sulcus tympanicus* der *Pars squamosa* des *Os temporale* befestigt ist, markiert schließlich den Übergang zwischen dem äußeren Ohr und dem Mittelohr. Eintreffende Schallwellen werden auf den, im angrenzenden Mittelohr, mit dem Trommelfell verwachsenen Hammergriff (*Manubrium mallei*) und somit auf die Gehörknöchelchen übertragen (Anthwal et al., 2013). Das Mittelohr ist ein pneumatisierter Hohlraum innerhalb des *Os temporale*, welcher mit Schleimhaut ausgekleidet ist und lateral an das Trommelfell, sowie medial an das Innenohr grenzt (Anthwal and Thompson, 2016). Es besteht aus der Paukenhöhle (*Cavitas tympani*) in welcher sich die Gehörknöchelchen befinden, dem *Antrum mastoideum*, den Paukennebenhöhlen (*Cellulae mastoideae*) und der Eustachi-Röhre (*Tuba auditiva*), welche für einen Druckausgleich zwischen Nasenrachenraum und der Paukenhöhle sorgt. Des Weiteren finden sich noch zwei wichtige Muskeln im Mittelohr, nämlich der *Musculus tensor tympani* und der *Musculus stapedius*, die beide hohe Schallintensitäten reduzieren, den Lautstärkebereich durch dynamische Anpassung regulieren und die Wahrnehmung der eigenen Stimme abschwächen. Die Gehörknöchelchen sind der Hammer (*Malleus*), der Amboss (*Incus*) und der kleinste Knochen des menschlichen Körpers, der sogenannte Steigbügel (*Stapes*). Der Steigbügel ist über das *Ligamentum anulare stapediale* in dem Ovalen Fenster (*Fenestra vestibuli*) verankert. Über die Gehörknöchelchenkette wird der Schall durch

Hebelwirkung verstärkt und über das ovale Fenster auf den Perilymphraum des Innenohrs weitergeleitet. Das Innenohr befindet sich im Felsenbein (Pars petrosa des os temporale) und ist aufgebaut wie ein komplexes System aus Kanälen, weshalb es auch als knöchernes Labyrinth (Labyrinthus osseus) beschrieben wird. Gemeinsam mit dem, im knöchernen Labyrinth befindlichen, häutigen Labyrinth (Labyrinthus membranaceus) beherbergt das Innenohr somit das Hör- und Gleichgewichtsorgan (Anthwal and Thompson, 2016). Der Spaltraum zwischen knöchernem und häutigem Labyrinth wird als perilymphatischer Raum bezeichnet, da sich in ihm eine Flüssigkeit befindet, die sogenannte Perilymphe. Dieser Spaltraum ist in der Lage über den ductus perilymphaticus mit dem Subarachnoidalraum zu kommunizieren. Das häutige Labyrinth besteht aus Labyrinthus cochlearis und Labyrinthus vestibularis. Innerhalb des Ductus cochlearis im Labyrinthus cochlearis befindet sich das Sinnesepithel für die akustischen Reize, wohingegen das Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan) im Labyrinthus vestibularis zu finden ist. Das Labyrinthus vestibularis wird aus Sacculus, Utriculus und den Ampullae membranaceae, in den drei Bogengängen (Ductus semicirculares), gebildet. Knöcherne Grundlagen sind für die Bogengänge die Canales semicirculares (posterior, lateralis und anterior) und für Sacculus und Utriculus das sogenannte Vestibulum, welches einer Kapsel entspricht. Die knöcherne Schnecke (Cochlea) besteht aus einer Schneckenbasis (Basis cochlea), einer Schneckenkuppel (Cupula cochlea), dem Schneckenkanal (Canalis spiralis cochlea) mit 3,5 mm Länge und insgesamt 2,5 Windungen und dem Modiolus als knöcherne Achse. Sie ist spiralförmig aufgebaut und teilt sich in die Scala vestibuli, die Scala media und die Scala tympani, welche als 3 parallele Gänge angeordnet sind (Kalinec et al., 2009). Der Schneckenkanal wird durch eine Membran (Basilarmembran) in eine obere Etage (Scala vestibuli) und eine untere Etage (scala tympani) unterteilt. Beide Scalae, zwischen denen sich der mit Endolymphe gefüllte Ductus cochlearis (Scala media) befindet, vereinigen sich an der Schneckenspitze über das sogenannte Helicotrema. Die Scala vestibuli nimmt über das ovale Fenster den weitergeleiteten Schall durch die in den Scalae befindliche Perilymphe auf, sodass durch Flüssigkeitsverschiebung eine Wanderwelle entsteht. Die Scala

tympani endet schließlich am runden Fenster (Fenestra cochleae), welche durch die Membrana tympanica secundaria abgedichtet wird. Durch die Schallübertragung und die Wanderwelle wird schließlich die Basilarmembran ausgelenkt und die äußeren Haarzellen werden dadurch im Bezug zur Tektorialmembran verschoben. Somit verarbeitet die Cochlea die aufgenommenen Schallwellen zu elektrochemischen Signalen und leitet diese weiter (Anthwal and Thompson, 2016). Das Gleichgewichtsorgan hingegen nimmt Reize über die Veränderung der Lage des Kopfes im Raum wahr (Duale Reihe Anatomie 4. Auflage. S.1074 – 1091. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2017).

1.2.2 Mikroskopie des Corti-Organs

Das Corti-Organ ist Sitz der Haarzellen (Gehörsinneszellen). Es befindet sich im Innenohr innerhalb der Cochlea auf dem Boden des Ductus cochlearis (Scala media), der von der Basilarmembran gebildet wird. Die Haarzellen werden in äußere und innere Haarzellen eingeteilt. Sogenannte innere und äußere Phalangenzellen stützen die jeweiligen Haarzellen, wobei die äußeren Phalangenzellen ihren Zellkörper über einen Ausläufer nach apikal erweitern, um dort die sogenannte Membrana reticularis zu bilden. Diese Membran dient vor allem als Barriere, damit es nicht zu einer Diffusion zwischen Extrazellulärraum des Corti-Organs und dem Endolymphraum des Ductus cochlearis kommt. Pfeilerzellen trennen die inneren von den äußeren Haarzellen und bilden den inneren Tunnel. Die Phalangenzellen mit aufgesetzten Haarzellen werden von Grenzzellen flankiert, welche zu den Außenseiten hin kleiner werden und so den sulcus spiralis internus und externus bilden. Die inneren Haarzellen sitzen in einer Reihe und die äußeren Haarzellen sind in 3-4 Reihen unterhalb der Tektorialmembran angeordnet. Über den Haarzellen ragt die Tektorialmembran (Membrana tectoria) in den Endolymphraum, mit der nur die äußeren Haarzellen über ihre größten Stereozilien verbunden sind. Alle Haarzellen besitzen jeweils ca. 100 Stereozilien. Diese Stereozilien sind durch sogenannte Tip links miteinander verbunden und sie haben Transduktionskanäle, die auf Zug die Öffnung der Kanäle bewirken. So kommt es zum Einstrom von K⁺ Ionen aus der

Endolymphe in die Haarzellen und zur Depolarisation, wenn die Tectorialmembran in Schwingung versetzt wurde. Die Stereozilien sind somit ausschlaggebend für die mechanoelektrische Transduktion (Taschenlehrbuch Histologie. S. 682 - 686. Lüllman-Rauch / Asan. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2019). Haarzellen des Cortiorgans sind somit Mechanorezeptoren (Gadhvi and Waseem, 2020), welche eine Umwandlung von Schallwellen in elektrische Signale hervorrufen (Géléoc and Holt, 2014, Kurihara et al., 2022). Die äußeren Haarzellen bewirken somit durch gegensätzliche Auslenkung der Basilar- und Tectorialmembran Verstärkung des Signals und sind somit vermutlich auch an der Auslenkung der Stereozilien der inneren Haarzellen beteiligt, die nicht mit der Tectorialmembran verbunden sind und somit nur durch Strömungen innerhalb der Endolymphe zur Auslenkung gebracht werden können. Äußere Haarzellen haben basal fast nur Kontakt zu efferenten Nervenbahnen, sodass sie eher als Verstärker angesehen werden. Innere Haarzellen hingegen haben basal afferente synaptische Kontakte zum Nervus cochlearis (Taschenlehrbuch Histologie. S. 682 - 686. Lüllman-Rauch / Asan. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2019).

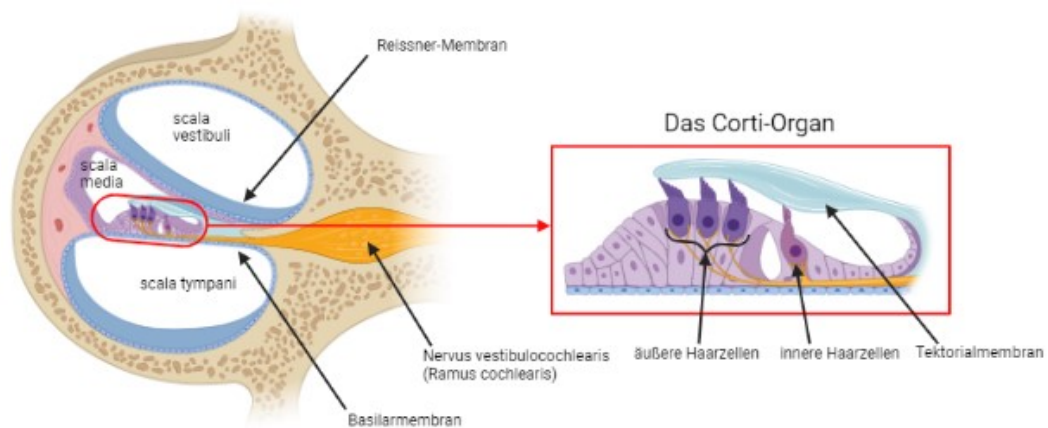


Abbildung 1: Darstellung des Corti-Organ in der Cochlea

Die Abbildung zeigt die Anatomie im Bereich der Cochlea und den Mikroskopischen Aufbau des Cortiorgans. Erzeugt mit BioRender.

1.2.3 Die Entwicklung des Innenohres

1.2.3.1 Die frühe menschliche Embryonalentwicklung

In dem folgenden Abschnitt wird auf die ersten drei Entwicklungswochen der menschlichen Embryonalentwicklung eingegangen.

Der Zeitpunkt, an dem sich ein Spermium mit einer Eizelle (Oozyte) vereinigt, markiert den Beginn der pränatalen embryonalen Entwicklung und wird als Konzeption (Befruchtung) bezeichnet. Die pränatale Entwicklung erstreckt sich insgesamt über eine Dauer von 38 Wochen, wobei drei Stadien unterschieden werden, die Frühentwicklung (1.-3. Entwicklungswoche), die Embryonalperiode (4.-8. Entwicklungswoche) und die Fetalperiode (9.-38. Entwicklungswoche).

Nach der Aufnahme des Spermiums in die Eizelle kommt es im weiteren Verlauf zur Verschmelzung der Vorkerne von Eizelle und Spermium, was die Vereinigung des Erbguts der Eltern bedeutet. Entstanden ist die sogenannte Zygote. Die Zygote ist die erste totipotente Zelle, da aus ihr im weiteren Entwicklungsverlauf der komplette menschliche Organismus entsteht. In den nächsten Tagen kommt es zur fortschreitenden Teilung der Zygote in die sogenannten Blastomere. Alle Blastomere zusammen bezeichnet man als Morula. Sobald die Morula etwa am 3.-4. Tag in der Gebärmutterhöhle (Cavum uteri) ankommt, grenzen die außen liegenden Blastomeren die innen liegenden Blastomeren durch Bildung von sogenannten Zonulae occludentes (Tight junctions) gegen die extraepithelial liegende Umgebung innerhalb der Gebärmutterhöhle ab, dies markiert den Beginn des Blastozystenstadiums und somit auch den Verlust der Totipotenz. Durch ein osmotisches Gefälle, bedingt durch die äußeren Blastomere, kommt es zu einem Eintritt von Flüssigkeit und zur Bildung der sogenannten Blastozystenhöhle durch Verlegung der inneren Blastomeren an eine gemeinsame Stelle. Die äußeren Blastomeren werden nun als Trophoblast und die inneren Blastomeren als Embryoblast bezeichnet. Die Zellen des Embryoblasten sind pluripotent und werden als embryonale Stammzellen bezeichnet. Am 6.-8. Tag nistet sich die sogenannte Blastozyste im Bereich der Gebärmutter Schleimhaut ein, wobei der Embryoblast der Uterusschleimhaut zugeneigt liegt. Der Trophoblast spaltet sich in den Zytotrophoblast und den Synzytiotrophoblast. Der Zytotrophoblast umgibt weiterhin den Embryoblast und

der Synzytiotrophoblast wächst durch das Epithel der Uterusschleimhaut in das darunterliegende Bindegewebe. Dort bildet er die sogenannten Chorionzotten, welche als Oberflächenvergrößerung für den Kontaktbereich zwischen dem Blut der Mutter und dem Blut des Embryos dient und somit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aufrechterhält. In Abbildung 2 ist der Verlauf der Entwicklung von der Zygote bis zum Blastozysten dargestellt.

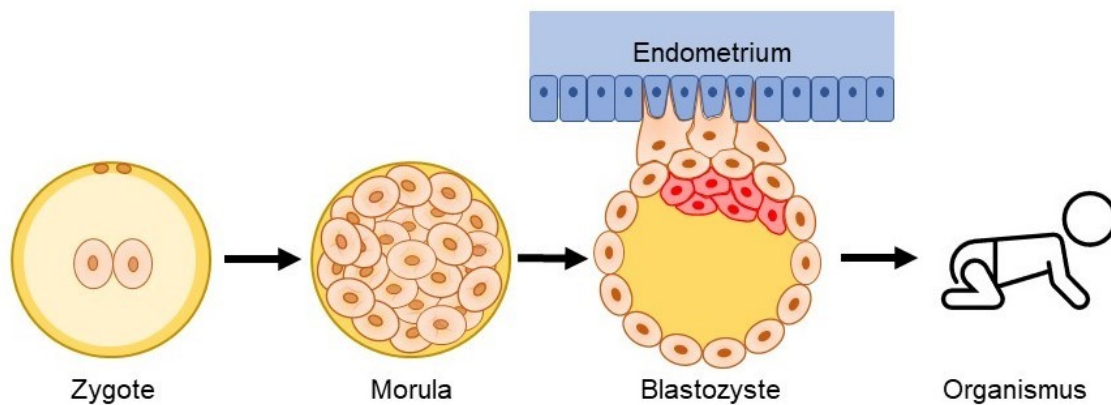


Abbildung 2: Die Entwicklung von der Zygote bis zum vollständigen Organismus

Die Abbildung zeigt die Entwicklung von der Zygote, über die Morula, hin zur Blastozyste mit der Einnistung im Bereich des Endometriums und mit der abschließenden Entstehung des fertigen Organismus. Im Stadium der Zygote und der Morula liegt noch die Totipotenz vor. Sobald das Blastozystenstadium erreicht ist, werden die Zellen des Embryoblasten pluripotent.

Der Embryoblast entwickelt sich ebenfalls weiter und teilt sich ab dem 8. Tag in den Hypo- und den Epiblast, die sogenannte zweiblättrige Keimscheibe. Der Hypoblast, welcher in Richtung der Blastozystenöhle liegt, kennzeichnet den ventralen Anteil, wohingegen der Epiblast, welcher in Richtung Trophoblast liegt, den dorsalen Anteil kennzeichnet. Ab der dritten Woche verdickt sich der Epiblast und bildet den Primitivstreifen, welcher mittig eine weitere Verdickung entwickelt, den Primitivknoten. Der Primitivstreifen formiert sich median im weiteren Verlauf zu einer Primitivrinne. Durch spätere Zellwanderungen aus der Primitivrinne entsteht der sogenannte Mesoblast. Weiterhin entsteht durch Zellwanderungen aus dem Primitivknoten der Chordafortsatz sowie das Endoderm, wodurch die zweiblättrige Keimscheibe nun zur dreiblättrigen Keimscheibe geworden ist. Die dreiblättrige Keimscheibe besteht somit aus den drei Keimblättern Meso-, Endo-

und Ektoderm. Das Ektoderm ist Ursprung der Neuralplatte und des Oberflächen-Ektoderms.

1.2.3.2 Die Neurulation mit Fokus auf die otische Plakode

Im Verlauf der Bildung des Neuralrohrs (Neurulation) entsteht die sogenannte Neuralplatte, welche neuroektodermales Gewebe darstellt, welches sich aus dem Ektoderm differenziert hat. Weiterhin geht das Oberflächenektoderm aus dem Ektoderm hervor. Der Rand der Neuralplatte, welcher später als Neuralleiste bezeichnet wird, ist die Grenze zum Oberflächenektoderm. Im Randbereich der Neuralplatte kommt unter anderem auch die präplakodale Region vor (PPR), aus welcher die Plakoden entspringen (Saint-Jeannet and Moody, 2014) (Abbildung 3 und 4). Somit entstehen Neuralleiste und Plakoden direkt angrenzend an die Neuralplatte (Groves and LaBonne, 2014, Gans and Northcutt, 1983, Saint-Jeannet and Moody, 2014). Bei den Plakoden handelt es sich um zeitweilig vorherrschende Verdickungen im Bereich des Kopfektoderms (von Kupffer, 1891, Webb and Noden, 1993, Gans and Northcutt, 1983, Saint-Jeannet and Moody, 2014), die das Fundament für mehrere spezialisierte sensorische Organe sind (Baker and Bronner-Fraser, 2001, Gans and Northcutt, 1983, Saint-Jeannet and Moody, 2014, Schlosser, 2010). Das Neuralrohr entwickelt sich im späteren Verlauf zum zentralen Nervensystem (Abbildung 3 und 4).

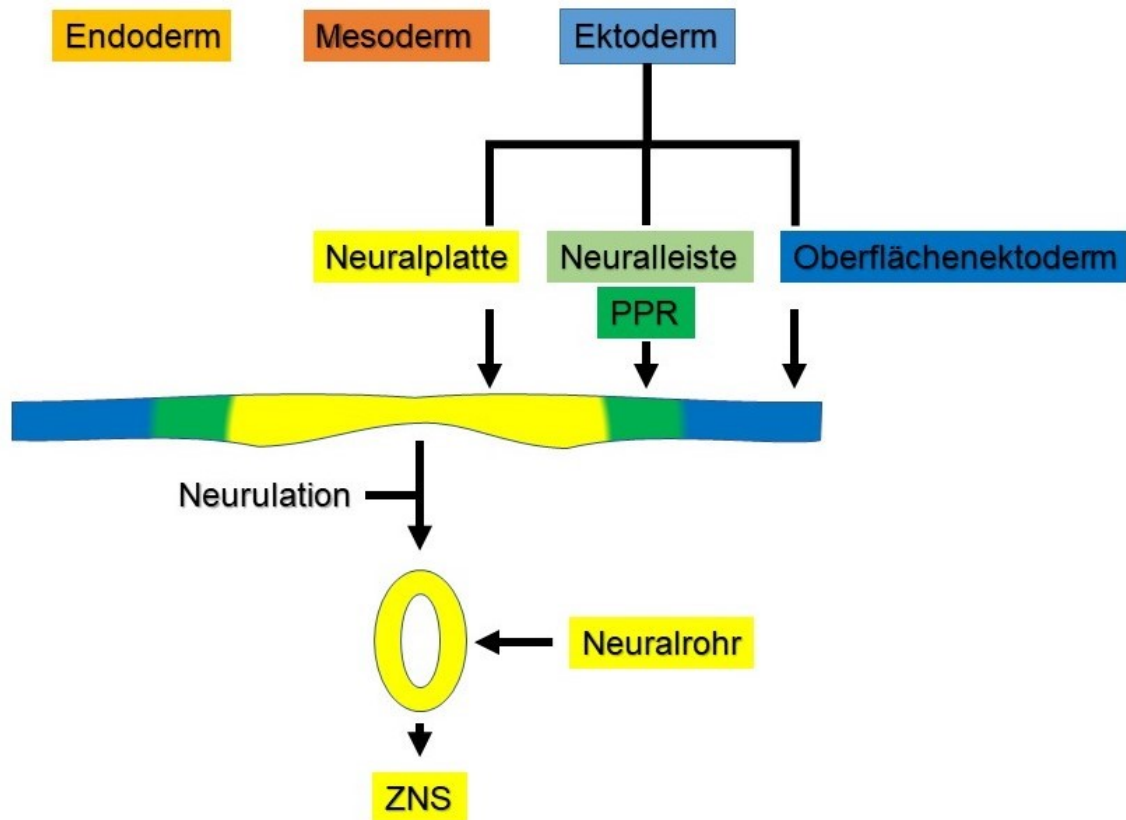


Abbildung 3: Differenzierung des Ektoderms und Neurulation

Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Entwicklung des Ektoderms mit der Teilung in das Oberflächenektoderm und das neuronale Ektoderm, aus welchem später die Neuralplatte und die Neuralleiste entspringen. Aus der Neuralplatte entsteht im weiteren Verlauf das Neuralrohr, wobei dieser Prozess als Neurulation bezeichnet wird. Anschließend entwickelt sich das ZNS. Aus der Neuralleiste entspringt die PPR.

Die früheste Entwicklungsstufe des Innenohres beginnt mit der Bildung der otischen Plakoden (Ohyama et al., 2007, Torres and Giráldez, 1998). In der 4. Embryonalwoche lassen sich die sogenannten otischen Plakoden (Ohrplakoden) im Bereich des seitlichen Rhombencephalon (Rautenhirn) erkennen. Es sind Auftreibungen des Oberflächenektoderms (Ohyama et al., 2007). Im ersten Entwicklungsschritt kommt es zu einer Einsenkung der Ohrplakoden ins darunterliegende Mesenchym, sodass die Ohrgrübchen entstehen (Torres and Giráldez, 1998). Die im Oberflächenektoderm gelegenen Randbereiche der Ohrgrübchen wiederum wachsen kontinuierlich aufeinander zu, sodass es zunächst zu einem Kontakt und schließlich zu einer Verschmelzung der beiden Ohrgrübchen kommt. Die daraus entstandenen Ohrbläschen kapseln sich vom Oberflächenektoderm ins darunterliegende Mesenchym ab (Abbildung 4). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Einschnürung der Ohrbläschen und somit zur

Aufteilung im Bereich des Ductus utriculosaccularis in einen ventralen und einen dorsalen Anteil. Der ventrale Anteil entwickelt sich zum Sacculus und zum Ductus cochlearis. Der dorsale Anteil hingegen wird zum Utriculus und den Bogengängen. An der ehemaligen Verbindungsstelle zum Oberflächenektoderm bilden sich Ductus und Saccus endolymphaticus. Alle zuvor genannten anatomischen Strukturen zählen zum Innenohr, wobei der Ductus cochlearis das Hörempfinden erst ermöglicht. Ein Hörvermögen wurde bereits ab der 28 Schwangerschaftswoche nachgewiesen (Querleu et al., 1988). Andere Forschungsarbeiten berichten sogar von einer Reizbarkeit des Fötus auf akustische Signale bereits in der 19. Schwangerschaftswoche (Hepper and Shahidullah, 1994).

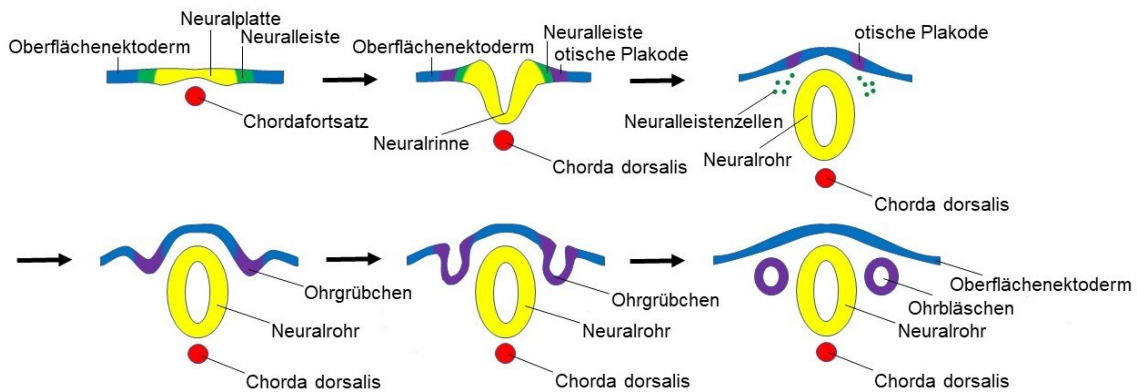


Abbildung 4: Neurulation und Darstellung der otischen Entwicklung

Die Abbildung zeigt in sechs Schritten den Ablauf der Neurulation und den Bezug der otischen Plakode, sowie die Entstehung der Ohrgrübchen und der Ohrbläschen.

1.2.3.3 Die Entstehung der präplakodalen Region

Als präplakodale Region (PPR) bezeichnet man die Vorläuferregion der kranialen sensorischen Plakoden (Saint-Jeannet and Moody, 2014). Diese präplakodale Region soll, nach neueren Erkenntnissen, als ektodermales Band den anterioren Bereich der Neuralplatte umfassen (Baker and Bronner-Fraser, 2001, Bailey and Streit, 2005). Ihre Entstehung ist auf die Differenzierung des embryonalen Ektoderms in neuronales (NE) und nicht-neuronales Ektoderm (NNE) zurückzuführen. Durch BMP- und Wnt- Signalisierung wird das NNE gefördert. Das NE hingegen wird durch BMP- und Wnt- Signalisierung gehemmt und erfährt eine positive Beeinflussung durch FGF- Signalisierung (De Robertis and Kuroda,

2004, Stern, 2005). Durch Beeinflussung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren kommt es schließlich noch zur Entwicklung einer sogenannten neuralen Grenzzone (NG) um die Neuralplatte herum (Saint-Jeannet and Moody, 2014). Untersuchungen an *Xenopus* haben gezeigt, dass es nach einem Kontakt von neuronalen *Sox2* exprimierenden und nicht-neuronalen *Foxi1a/b* exprimierenden Regionen zur Bildung einer Zwischenzone kommt, in welcher diese Gene nicht mehr vorhanden sind, was für die Bildung der NG spricht (Matsuo-Takasaki et al., 2005). Weiterhin kommt es neben Wechselwirkungen zwischen NNE und NE auch zu Beeinflussungen durch Meso- und Endoderm (Moody and LaMantia, 2015). Noch vor Bildung der Neuralplatte lassen sich in der NG bereits Vorläuferzellen finden (Streit, 2002). Weiterhin kommt es noch vor Ausbildung des Neuralrohrs zur Differenzierung dieser Vorläuferzellen und zur Entstehung der PPR und der Neuralleiste. Aus dem NNE bildet sich die Epidermis. Aus dem NE entsteht das ZNS. Die sogenannte NG differenziert sich im weiteren Verlauf in die Neuralleiste und die PPR (Moody and LaMantia, 2015). *SIX*- und *EYA*-Gene wurden als Marker der PPR identifiziert (Pandur and Moody, 2000, Riddiford and Schlosser, 2017, Moody and LaMantia, 2015, Schlosser, 2010).

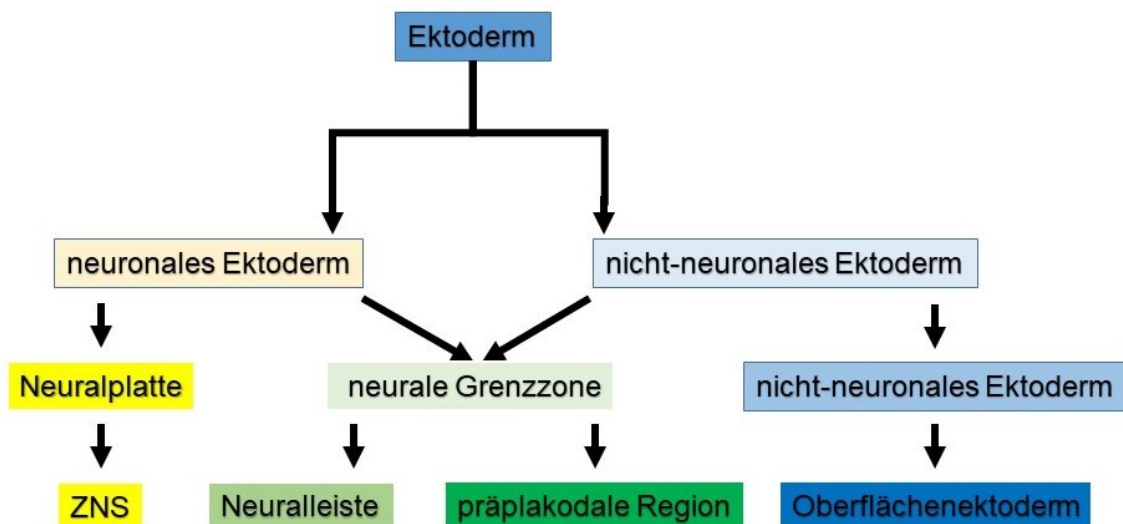


Abbildung 5: Entwicklung des Ektoderms

Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Entwicklung des Ektoderms mit der Teilung in das NE und das NNE. Aus dem NNE entspringt das Oberflächenektoderm. Aus dem NE bildet sich später die Neuralplatte, im weiteren Verlauf das Neuralrohr und anschließend das ZNS. An der Grenzregion zwischen NE und NNE bildet sich die sogenannte neurale Grenzzone, aus welcher die Neuralleiste und die PPR entstehen.

1.2.3.4 Die Entstehung der Plakoden mit Fokus auf die otische Plakode

Den Ursprung hat die Bezeichnung „Plakode“ im Jahr 1891 (Streit, 2004). Die Plakoden (otische-, olfaktorische-, Linsen-, adenohipophysale-, epibranchiale- und trigeminale-Plakode) haben ihren Ursprung in der Präplakodalen Region (PPR) (Streit, 2004, Moody and LaMantia, 2015, Saint-Jeannet and Moody, 2014). In Abbildung 6 sind die menschlichen Plakoden dargestellt.

Die Entstehung der otischen Plakoden benötigt, bedingt durch die komplexe Strukturbildung, die Beeinflussung durch mehrere Gewebe (Jacobson, 1966). Der Entstehungsort der otischen Plakoden liegt beidseits im Bereich des Hinterhirnes (Ohyama et al., 2007) der Rhombomere 5 (Saint-Jeannet and Moody, 2014) und 6 bei Säugetieren (Fekete, 2009). Nach erfolgter Invagination und anschließender Vesikelbildung folgt eine umfangreiche Entwicklung, die schließlich zur Bildung des Innenohres mit dem Gehörorgan in der Cochlea und dem Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan) in den semizirkularen Kanälen mit den angrenzenden Strukturen Sacculus und Utriculus führt (Saint-Jeannet and Moody, 2014, Ohyama et al., 2007).

In der frühen Entwicklung der Plakoden spielen *PAX* Gene eine Rolle, wobei *PAX8* zu den frühesten Marker-Genen der otischen Plakode zählt (Baker and Bronner-Fraser, 2001). *PAX2* ist ebenfalls ein frühes Marker-Gen der otischen Plakode (Baker and Bronner-Fraser, 2001).

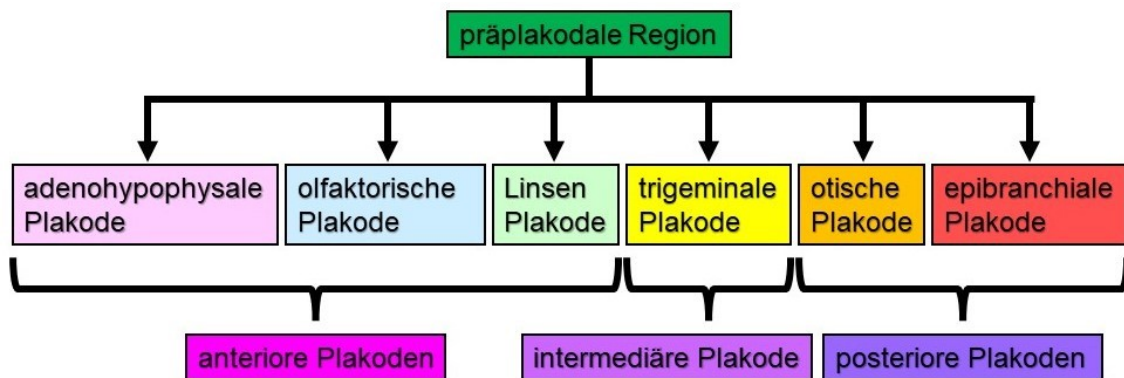


Abbildung 6: Die Präplakodale Region und der Übergang zu den Plakoden

Die Abbildung zeigt die Plakoden, welche aus der PPR entspringen und teilt diese in einen anterioren, einen intermediären und einen posterioren Bereich ein.

1.2.3.5 Transkriptionsfaktoren und Marker der frühen otischen

Differenzierung

Zur molekularen Charakterisierung der frühen otischen Differenzierung wurden Marker ausgewählt, die zentrale Entwicklungsprozesse von der ektodermalen Strukturierung über die präplakodale Ausformung bis zur otischen Plakode widerspiegeln. Diese Marker lassen sich funktionell und zeitlich hierarchisch gliedern.

Zu den ektodermalen und neuralen Markern zählt unter anderem der Transkriptionsfaktor PAX6, welcher einen Marker des neuronalen Ektoderms darstellt. In der frühen Differenzierung pluripotenter Stammzellen dient PAX6 zur Identifizierung und als Marker für das neuronale Ektoderm (Zhang et al., 2010, Koehler et al., 2017). Somit wird eine persistierende PAX6-Expression mit einer neuronalen Differenzierung assoziiert, während eine Reduktion der Expression als Voraussetzung für die Ausbildung plakodaler Zellpopulationen anzusehen ist.

TFAP2 α wurde bereits als ein Marker für das nicht neuronale Ektoderm beschrieben (Koehler et al., 2017). TFAP2 α ist nicht nur ein Marker für das nicht-neuronale Ektoderm, sondern auch für das Fortschreiten der Entwicklung hin zu der präplakodalen Region.

Der Transkriptionsfaktor SIX4 gehört zur SIX-Genfamilie und ist an der Etablierung der präplakodalen Region beteiligt. Darüber hinaus wurde eine Expression von SIX4 im Zuge der otischen Entwicklung auch bei der Entstehung der Ohrbläschen beschrieben (Chatterjee et al., 2010).

Auch die Transkriptionsfaktoren SIX1 und EYA2 sind Marker für die präplakodale Region. Dabei bilden sie zusammen einen funktionellen Komplex (Patrick et al., 2013).

SOX2 ist ein essenzieller Transkriptionsfaktor zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz (Fong et al., 2008). In früheren Publikationen konnte SOX2 bereits als früher Indikator für die otische Differenzierung ermittelt werden (van der Valk et al., 2023, Doda et al., 2023, Jeong et al., 2018). Des Weiteren ist SOX2 ein Marker der posterioren Plakode (Koehler et al., 2017). Während eine frühe SOX2-Expression somit für eine Entwicklung in otische Richtung spricht, ist eine spätere SOX2 Expression ein Indikator für die sensorische Ausformung im

Bereich des Innenohres. So wurde mittels Tiermodellen an Hühnern SOX2 als notwendiger Faktor für die Haarzellentwicklung ermittelt (Neves et al., 2012).

Ein spezifischer Marker für die otische Entwicklung ist PAX8, wobei dessen Expression in der otischen Plakode, im otischen Vesikel und im fortgeschrittenen Stadium der otischen Differenzierung vorkommt. Seine Expression reflektiert eine stabile otische Identität und erlaubt eine Abgrenzung gegenüber anderen plakodalen Zelllinien. Auch PAX8 konnte ebenfalls als früher Indikator für die otische Differenzierung ermittelt werden, so wurde PAX8 bereits als Marker der posterioren Plakode beschrieben (Koehler et al., 2017). Auch in weiteren Publikationen wurde PAX8 als Marker für die frühe otische Entwicklung benannt (Doda et al., 2023, Ealy et al., 2016, Lahlou et al., 2018, van der Valk et al., 2025a).

Ein weiterer untersuchter Marker ist der Transkriptionsfaktor SOX9, welcher in otischen Vorläuferzellen exprimiert wird und insbesondere an der Entwicklung nicht-sensorischer Strukturen des Innenohrs beteiligt ist. So konnte SOX9 in Stützzellen detektiert werden (Mak et al., 2009), was die Entwicklung hin zu Zellen des Corti-Organs markiert. Darüber hinaus wurde SOX9 auch in der Epithelschicht der Reissner-Membran nachgewiesen (Mak et al., 2009). Seine Expression weist somit auf eine fortschreitende otische Differenzierung hin und ergänzt die Analyse früher Marker.

Zu den Zelladhäsionsmarkern zählen die Zelladhäsionsmoleküle ECAD und NCAD, welche für die morphologischen Reorganisationsprozesse von Bedeutung sind, die während der otischen Entwicklung stattfinden. Diese komplexen morphologischen Reorganisationsprozesse finden während der otischen Entwicklung statt, die von epithelialer Verdickung über Invagination bis hin zur Abschnürung des otischen Vesikels reichen. Während ECAD typisch für epitheliale Zellverbände des Oberflächenektoderms ist, wird NCAD vermehrt in neuronalen und otischen Vorläuferzellen exprimiert. ECAD ist dabei für die Ausformung epithelialer Strukturen und die Aufrechterhaltung dieser verantwortlich. NCAD wiederum ist essentiell für die Zelladhäsion und für die Ausformung der otischen Plakode (Christophorou et al., 2010). NCAD wird auch als Marker des neuronalen Ektoderms beschrieben (Koehler et al., 2017). Sowohl

ECAD als auch NCAD werden ebenso als Marker der posterioren Plakoden beschrieben (Koehler et al., 2017). Im Laufe der otischen Entwicklung kommt es zu einer steigenden NCAD-Expression. Später kommt es zu einer Expression von ECAD und NCAD, was die Entstehung der otischen Plakode markiert (van der Valk et al., 2025b).

1.2.3.6 Annexine und ihr Vorkommen in der otischen Entwicklung

Die Annexine bilden eine Familie von zwölf Proteinen beim Menschen, die jeweils von verschiedenen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert werden. Funktionell sind sie an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, darunter Membranorganisation (Gerke et al., 2024), Vesikeltransport (Gerke et al., 2024, Rescher and Gerke, 2004), Signaltransduktion und Apoptose. Sie sind unter anderem auch an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt und tragen so zur Stabilisierung der Lipiddoppelschicht bei (Hu et al., 2024). Die Proteinfamilie, welche zu den Calcium-abhängig regulierenden Phospholipid-bindenden Proteinen zählt (Hayes et al., 2004, Krey et al., 2016, Rescher and Gerke, 2004), kommt vor allem im Zytosol vor (Gerke et al., 2024).

Zusätzlich zu diesen Eigenschaften wurde allerdings auch erkannt, dass die Annexine bei organischem Stress, wie zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen, beteiligt sind (Gerke et al., 2024). Kommt es zum Beispiel durch eine Verletzung der Plasmamembran zu einer erhöhten Calciumkonzentration, dann reagieren Annexine mit Hilfe von Membranumbauvorgängen um die Wunde zu verschließen (Gerke et al., 2024).

Für die Annexine A1, A4 und A5 konnte bereits ein Zusammenhang mit der otischen Entwicklung oder dem Innenohr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gibt es für Annexin A2 bislang lediglich indirekte Hinweise, etwa durch ihre Expression in embryonalen Strukturen oder Zelltypen, die an der Entwicklung des Ohrs beteiligt sein könnten.

In früheren Forschungsarbeiten in Tiermodellen konnte z.B. das Annexin A4 in der Zellmembran, sowie ebenfalls in den Stereozilien von Haarzellen lokalisiert werden (Li et al., 2021). Auch das Annexin A5 konnte in früheren Studien an

Tiermodellen membranständig in den Haarbündeln der Haarzellen des Innenohres nachgewiesen werden (Krey et al., 2016).

In Bezug auf den aktuellen Stand der Forschung konnte bisher nur eine Beteiligung von Annexin A4 und A5 in der Entwicklung des Innenohres experimentell nachgewiesen werden. Für die Annexine A1 und A2 existieren bisher lediglich indirekte Hinweise aus zellbiologischen Studien, ohne dass eine spezifische Rolle im otischen Kontext experimentell nachgewiesen wurde.

Annexin A1 kann nicht nur antiinflammatorisch (Kelly et al., 2022, Gerke et al., 2024) wirken, sondern kann auch eine Rolle im Alterungsprozess, in der Krankheitsentstehung und auch in der Erhaltung der Homöostase im gesamten Körper spielen (Sheikh and Solito, 2018). Es konnte festgestellt werden, dass jegliche Zellen der Scala media Annexin A1 exprimieren, wobei die Hensen Zellen den größten Anteil exprimieren (Kalinec et al., 2009). Annexin A2 interagiert sowohl mit der Plasmamembran als auch mit dem Cytoskelett und unterstützt dabei Membran- und Vesikelvorgänge (Gerke et al., 2024). Direkte Hinweise zu einer Rolle von Annexin A2 im Innenohr sind in der aktuellen Literatur bisher nicht ersichtlich, aber aufgrund der zuvor beschriebenen Funktionen, wie Membranorganisation (Gerke et al., 2024), Vesikeltransport (Gerke et al., 2024, Rescher and Gerke, 2004), Signaltransduktion und Apoptose, sind diese denkbar.

In einem differenzierenden otischen Kontext könnten Annexine beispielsweise an der Organisation von Membrandomänen, der Ausbildung zellulärer Polarität oder der Regulation apoptotischer Prozesse beteiligt sein. Dies sind Mechanismen, welche für die frühe otische Morphogenese essenziell sind. Wie bereits beschrieben, wurden den Annexinen in früheren Arbeiten Funktionen wie Membranorganisation (Gerke et al., 2024), Vesikeltransport (Gerke et al., 2024, Rescher and Gerke, 2004), Signaltransduktion und Apoptose zugeschrieben. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Expression ausgewählter Annexine in frühen otischen Organoiden an Tag 20 untersucht.

1.3 Induziert pluripotente Stammzellen humanen Ursprungs

Der gesamte menschliche Organismus entwickelt sich aus der totipotenten Zygote, welche eine Verschmelzung der Vorkerne von Eizelle und Spermium darstellt. Mit voranschreitender Entwicklungsphase ändert sich auch die Potenz. Die Potenz beschreibt die Fähigkeit einer Stammzelle, in welche Zelltypen sie sich differenzieren kann. Totipotenz ist die höchste Potenz, die Stammzellen besitzen können. Totipotente Stammzellen sind befähigt sich in extraembryonales Gewebe und embryonales Gewebe zu differenzieren. Pluripotenz ist die nächsthöchste Potenz. Pluripotente Stammzellen haben die Fähigkeit sich in Zellen aller drei Keimblätter zu entwickeln (Reubinoff et al., 2000), somit sind sie in der Lage sich in jegliche Zellen des menschlichen Körpers zu differenzieren. Durch die Fähigkeit sich selbst zu erneuern, sind die pluripotenten Stammzellen in der Lage ihre Pluripotenz dauerhaft zu erhalten (Ito and Suda, 2014). Pluripotente Stammzellen haben jedoch die Fähigkeit verloren sich in extraembryonales Gewebe differenzieren zu können. Multipotenz hingegen ist die geringste Potenz. Multipotente Stammzellen sind somit nur noch befähigt sich in verschiedene Zelltypen innerhalb des jeweiligen Gewebes zu differenzieren.

Vor der Einführung der Methodik zur Herstellung von hiPSZ wurde durch die Forschung auf embryonale Stammzellen zurückgegriffen, was jedoch zu ethischen Kontroversen führte (Takahashi and Yamanaka, 2006). Auch Tiermodelle, wie die Forschung an Mäusen sind limitiert, was die Übertragung auf den Menschen betrifft, da Unterschiede in der Embryonalentwicklung auf der genomischen Ebene und in der Physiologie bestehen (Avior et al., 2016).

Zur Generierung von pluripotenten Zellen *in vitro* wurde im Jahr 2006 die bahnbrechende Methodik der Reprogrammierung veröffentlicht. Diese Technik ermöglicht somatischen Zellen in einen induziert pluripotenten Stammzellzustand, mittels Zugabe der vier Transkriptionsfaktoren *OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC* und *KLF4*, zurückversetzt zu werden (Takahashi and Yamanaka, 2006), was in nachfolgenden Arbeiten bestätigt wurde (Takahashi et al., 2007b). Dieser Zustand ist dabei vergleichbar mit dem Stadium einer embryonalen Stammzelle. Das bedeutet die hiPSZ sind befähigt sich in jegliche Zellen der drei

Keimblätter zu differenzieren (Avior et al., 2016, Reubinoff et al., 2000). Was zunächst mit murinen Zellen ermöglicht wurde (Takahashi and Yamanaka, 2006), war bereits ein Jahr später auch mit humanen Zellen möglich (Takahashi et al., 2007a, Yu et al., 2007). Hierfür ist die Verwendung von z.B. Keratinozyten, Fibroblasten, Blutzellen oder Zellen aus dem Urin möglich (Klingenstein et al., 2014).

Bereits kurze Zeit nach der Veröffentlichung über die Methodik der hiPSZ kam es zur ersten Erstellung von Krankheitsmodellen (Park et al., 2008). Bei der vorliegenden Arbeit wurde auf die lentivirale Reprogrammierung mittels polycistronischer Kasette mit den Transkriptionsfaktoren OCT3/4, SOX2, c-MYC und KLF4 zurückgegriffen.

Ausgehend von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) können über Differenzierungsansätze nahezu alle möglichen Zell- und Gewebearten, oder Organsysteme des menschlichen Körpers nachgebildet werden, wie beispielsweise Innenohr Organoide. Auch ermöglicht die Methodik der Reprogrammierung die humane embryonale Entwicklung im Detail *in vitro* nachzuvollziehen und bietet einen Ersatz für die Verwendung von embryonalen Stammzellen in der Forschung.

Diese neue Möglichkeit der Stammzellgewinnung bietet in Zukunft Hoffnung auf die Erstellung von humanen Krankheitsmodellen, wenn Tiermodelle an ihre Grenzen stoßen (Avior et al., 2016). Zusätzlich sind Tiermodelle, durch z.B. Explantation des Corti Organs (Mizutari et al., 2013), sehr aufwendig.

Für die Erforschung der Ätiologie von Krankheiten und zusätzlich für die Erstellung neuer Therapiemöglichkeiten bietet diese Methode ebenfalls beste Voraussetzungen (Avior et al., 2016), da mit patientenspezifischen hiPSZ praktisch jede genetische Störung simuliert werden kann (Avior et al., 2016).

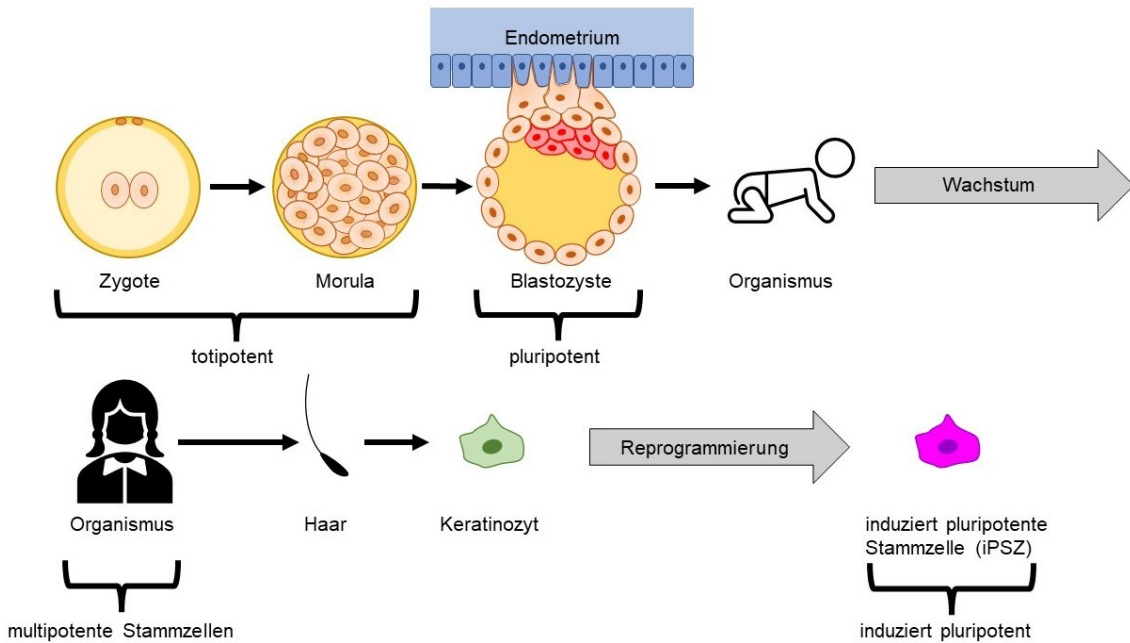


Abbildung 7: Gewinnung von iPSZ aus menschlichen Keratinozyten

Die Abbildung zeigt schematisch wann die Entwicklung von der Zygote bis zum erwachsenen Menschen und wann die Entnahme von Keratinozyten stattfindet, sodass eine Reprogrammierung zur iPSZ durchgeführt werden kann.

1.4 Dreidimensionale Organoidmodelle

In den vergangenen Jahren haben sich dreidimensionale 3D Organoidmodelle als robuste und leistungsfähige *in-vitro*-Modelle zur Untersuchung komplexer entwicklungsbiologischer Prozesse etabliert.

Otische Organoide ermöglichen es, wesentliche Schritte der Innenohrentwicklung *in vitro* nachzubilden, einschließlich der Spezifikation des präplakodalen Ektoderms, der Ausbildung der otischen Plakode, sowie der Entstehung früher otischer Vorläuferzellen. Im Gegensatz zu 2D-Zellkulturen, in denen sich Zellen nicht in alle Richtungen organisieren und wachsen können, erlauben 3D-Kulturen die Entstehung von Organoiden mit einer selbstorganisierten Gewebearchitektur, die Zell-Zell-Interaktionen und morphogenetische Prozesse realistischer widerspiegelt (Koehler and Hashino, 2014).

Die Differenzierung otischer Organoide aus hiPSZ orientiert sich eng an der embryonalen Innenohrentwicklung. *In vivo* entsteht das Innenohr aus dem nicht-neuronalen Oberflächenektoderm, welches durch Signale aus angrenzenden

Gewebe in Richtung einer otischen Identität spezifiziert wird. Dabei spielen insbesondere Signalwege wie FGF, BMP, WNT und TGF- β eine zentrale Rolle. *In vitro* werden diese Entwicklungsprozesse durch die gezielte Modulation der Kulturbedingungen nachgeahmt. Unterschiedliche Differenzierungsprotokolle variieren dabei hinsichtlich der Zusammensetzung der Kulturmedien, der zeitlichen Abfolge der Signalinduktion sowie der dreidimensionalen Kultivierung. Die Differenzierung wurde auf Grundlage des von Koehler *et al.* (2017) beschriebenen Protokolls durchgeführt.

Insbesondere die Zusammensetzung des verwendeten Stammzell-beziehungsweise Differenzierungsmediums beeinflusst die Balance zwischen neuronalem Ektoderm, nicht-neuronalem Ektoderm und präplakodaler Spezifikation und stellt damit einen entscheidenden Faktor für den Erfolg der otischen Differenzierung dar.

1.5 Medien zur Kultivierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Der Einsatz von humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) und hiPSZ in der Forschung birgt ein bekanntes Potenzial, welches maßgeblich von dem, für die Differenzierung und das Wachstum notwendigen, Kultivierungsverfahren abhängt (Akopian *et al.*, 2010). So wird zur Kultivierung von hESZ, sowie hiPSZ ein geeignetes Zellkulturmedium benötigt. Dieses stellt einen wichtigen und entscheidenden Faktor für die erfolgreiche Kultivierung und die Erhaltung der hiPSZ dar. Dazu muss das Medium, im Hinblick auf die enthaltenen Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, exakt abgestimmt sein, sodass das Wachstum der Stammzellen und der Erhalt der Pluripotenz gewährleistet sind. Um den Zustand der hESZ aufrechtzuerhalten, wurde in der Vergangenheit auf Medien mit Feeder-Zellschichten, z.B. aus Mausembryo-Fibroblasten, zurückgegriffen (Akopian *et al.*, 2010). Da allerdings Bestandteile tierischen Ursprungs die Auswirkungen der Versuchsmodelle von z.B. Auswirkungen exogener Substanzen auf das Wachstum und die Differenzierung beeinträchtigen können, sind diese nicht für standardisierte Forschungsstudien geeignet (Akopian *et al.*, 2010). Des Weiteren ist auch eine Krankheitsübertragung denkbar, was in

Hinblick auf zukünftige Therapieoptionen inakzeptabel wäre (Akopian et al., 2010). Daher wird in aktuellen Forschungsarbeiten auf Stammzellmedien zurückgegriffen, welche keine Bestandteile tierischen Ursprungs enthalten. Grundsätzlich gibt es verschiedene Stammzellmedien, auf die man zurückgreifen kann. Dabei unterscheidet man zwischen kommerziell erhältlichen Stammzellmedien und selbst hergestellten Stammzellmedien. Da für viele Forschungseinrichtungen der Kostenfaktor nicht irrelevant ist, scheint die Generierung von eigenen Stammzellmedien eine Alternative zu sein (Frank et al., 2012). Zusätzlich können selbst erzeugte Medien auf spezifische Gegebenheiten angepasst werden (Frank et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde das kommerziell erhältliche PeproGrow™ von PeproTech (PT) und das selbst hergestellte FTDA zur Kultivierung der hiPSZ verwendet.

Das Stammzellmedium PeproGrow™ ist für die Kultivierung von hESZ gleichermaßen wie für hiPSZ geeignet (PeproTech, 2017). Es ist ein chemisch vollständig definiertes Tier- und Protein – freies Medium (PeproTech, 2017) und basiert von seiner Formulierung auf dem bereits etablierten Medium E8®. Weiterhin ist es laut Herstellerangaben ein Phenolrot- und Insulin – freies Medium, welches weniger als 15% spontaner Differenzierungen aufweist. Zudem enthält es unter anderem FGF2, welcher als Wachstumsfaktor fungiert (PeproTech, 2017). FGF2 ist als Wachstumsfaktor für seine Fähigkeit bekannt, die Pluripotenz aufrechtzuerhalten und Spontandifferenzierungen zu verhindern. Somit ist FGF2 ein wesentlicher Faktor, welcher den Erhalt der Pluripotenz sichert und hiPSZ erhält, bevor eine Differenzierung in eine spezifische Zelllinie gewünscht ist. Vom Hersteller PeproTech bekommt man ein Basalmedium und eine separate lyophilisierte Komponente (PeproTech, 2017).

Durch seine chemisch definierte Formel, sowie die fehlende Komponente Insulin, eignet sich das Medium für kontrollierte Pluripotenzkulturen. Dies ist von Vorteil für nachfolgende gerichtete Differenzierungen wie z.B. die otische Differenzierung. Es gibt PeproGrow™ auch als Variante mit niedriger Proteinkonzentration (PeproTech, 2016). Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration (low protein) könnten signalrelevante Zusatzstoffe leicht

kontrolliert zugeführt werden, um gezielt die otische Induktion zu ermöglichen. So könnten beispielsweise Wnt-Weg-Inhibitoren oder Sonic Hedgehog Proteine (SHH) hinzugefügt werden.

Das Stammzellmedium FTDA ist ein xenofreies Medium und ist für die Kultivierung von hiPSZ geeignet, da in diesem geringe Raten an spontanen Differenzierungen vorkommen (Frank et al., 2012). Die Bestandteile von FTDA sind das Basismedium DMEM F12, sowie die weiteren Faktoren FGF2, TGFβ1, Activin A und Dorsomorphin. Dabei beeinflussen die Faktoren FGF2, TGFβ1 und Activin A die Regeneration der Stammzellen positiv. Dorsomorphin wiederum hemmt eine ungewünschte Differenzierung (Frank et al., 2012).

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Gehörsinn ist ein essenzieller Sinn, da er durch die Aufnahme akustischer Reize die Möglichkeit schafft, Sprache zu erlernen und zu verstehen. Dies wiederum ist die Voraussetzung für akustische Kommunikation. Da Haarzellen nicht regenerationsfähig sind und in ihrer Anzahl begrenzt, ist eine Forschung in diesem Bereich von besonderem Interesse.

Mit Hilfe von hiPSZ, die aus Keratinozyten durch lentivirale Infektion gewonnen werden, wird in dieser Arbeit die frühe Entwicklung in Richtung otische Plakode untersucht. Die otische Entwicklung wurde dabei mit Hilfe von *in vitro* generierten dreidimensionalen Organoiden dargestellt. Analysiert wurden die verschiedenen Stadien (NNE, PPR und otische Plakode) auf Protein- und RNA-Ebene.

Die Stammzellmedien dienen als Grundlage und ermöglichen es erst, die Stammzellen *in vitro* zu kultivieren und ihre Funktion als Stammzellen aufrechtzuerhalten. Sie sind daher ein sehr wichtiger Baustein der Forschung und bedürfen einer genaueren Betrachtung hinsichtlich ihrer Funktionalität. Dazu wurden mehrere Differenzierungen in zwei verschiedenen Stammzellmedien, PeroGrow™ von PeproTech (PT) und das nach Frank *et al.* (2012) erstmals beschriebene, selbst hergestellte FTDA, durchgeführt und die entstandenen Organoiden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, durch einen direkten Vergleich der beiden verwendeten Stammzellmedien PT und FTDA festzustellen, ob eines

der beiden Medien geeigneter für die frühe otische Entwicklung ist. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und qRT-PCR wurde dabei die Expression früher otischer Marker untersucht, um somit eine otische Differenzierung prüfen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ethikvotum

Für die durchgeführten Versuche liegt folgendes Aktenzeichen der Ethikkommission vor: 205/2020BO2.

2.1.2 Chemikalien

Die folgende Tabelle zeigt alle verwendeten Chemikalien.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.
DPBS (1X) Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Thermo Fisher Scientific	14190-094
Normal Donkey Serum	EMD Millipore Corporation	S30-100ml
Triton X 100	Carl Roth GmbH + Co.KG	3051
Sakura Finetek™ Tissue-Tek™ O.C.T. Compound 125ml	Sakura Finetek Germany GmbH	4583

2.1.3 Antikörper

Die nachfolgenden Tabellen listen alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper auf.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.
ANXA1	Kaninchen	1:100	Abcam	ab214486
ANXA2	Kaninchen	1:100	Sigma	Lot:R44046
ANXA4	Ziege	1:100	R&D Systems	AF4146
ANXA5	Kaninchen	1:100	Abcam	Ab108194
ECAD	Maus	1:100	Life Technologies	131700

EYA2	Kaninchen	1:100	Proteintech	11314-1-AP
NCAD	Maus	1:100	BD Biosciences	610920
PAX6	Kaninchen	1:100	BioLegend	901301
PAX8	Kaninchen	1:100	Abcam	Ab97477
SIX1	Kaninchen	1:100	CellSignaling	128915
SIX4	Kaninchen	1:50	Proteintech	21305-1-AP
SOX2 (D6D9)	Kaninchen	1:200	CellSignaling	96565
SOX9	Kaninchen	1:100	EMD Millipore Corp.	AB5535
TFAP2 α (AP-2 α)	Maus	1:50	SantaCruz Biotechnologies	Sc12726

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.
Donkey anti-rb IgG (Alexa Fluor® 488)	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen™	A32790
Donkey anti-rb IgG (Alexa Fluor® 546)	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen™	A10040
Donkey anti-ms IgG (Alexa Fluor® 546)	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen™	A10036
Donkey Anti-gt IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	1:1000	Abcam	Ab150129

2.1.4 Oligonukleotide

Die nachfolgende Tabelle listet alle verwendeten Oligonukleotide auf.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.
ECAD	Thermo Fisher Scientific	Hs01023894_m1
EYA2	Thermo Fisher Scientific	Hs00193347_m1
PAX8	Thermo Fisher Scientific	Hs01015257_g1
SIX1	Thermo Fisher Scientific	Hs01018030_m1
SOX2	Thermo Fisher Scientific	Hs01053049_s1
SOX9	Thermo Fisher Scientific	Hs01001343_g1

2.1.5 Geräte

Die nachfolgende Tabelle listet alle verwendeten Geräte auf.

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Axio Imager M2 Forschungsmikroskop	Zeiss
Axiostar 1031-031 (Baujahr 1999)	Zeiss
Eppendorf Research Plus Pipette 0,1 - 2,5 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 - 10 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 10 - 100 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 100 - 1000 µl	Eppendorf
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 1 – 10 µl	Thermo Fisher Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 10 – 100 µl	Thermo Fisher Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 100 – 1000 µl	Thermo Fisher Scientific
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr
HERAfreeze™ HFU400 BV Serie - 86 °C-Ultratiefkühlschränke	Thermo Fisher Scientific
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933-	Liebherr

21B	
Laborabzug Typ ENAS1200	Wesemann
Labor-pH Meter inoLab® pH 7110	Xylem analytics
Microm HM560 Cryostat	Thermo Fisher Scientific
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Fisher Scientific
NeoVortex D-6012	NeoLab
Peqlab HX-2 Digitale Blockheizung	VWR part of avantor
PIPETMAN Classic P100	Gilson
PIPETMAN Classic P200	Gilson
Stereomikroskop GSZ	Zeiss
Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Die nachfolgende Tabelle listet alle verwendeten Verbrauchsmaterialien auf.

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.
Classic Nitril Powder Free Medical Examination Gloves	ABENA	290420
Dako Pen	Agilent	S2002
Kimtech Science™ Precision Wipes	Kimberly-Clark Professional	05511
Mikroskopische Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH Labor- u. Medizintechnik	01-2450/1
Sakura Finetek™ Tissue-Tek™ Cryomold™ Biopsy Molds	Sakura Finetek Germany GmbH	4565
SuperFrost® plus Objektträger, Mattrand weiß	R. Langenbrinck GmbH Labor- u. Medizintechnik	03-0060
Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG&Co.	

2.1.7 Software und Internetressourcen

Die nachfolgenden Tabellen listen die verwendete Software und die verwendeten Internetressourcen auf.

Tabelle 7: Verwendete Software

Software	
Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software
AxioVision SE64 Rel 4.9	Carl Zeiss Microscopy GmbH
EndNote	Clarivate
Microsoft Office	Microsoft Corporation

Tabelle 8: Verwendete Internetressourcen

Internetressourcen	
Bezeichnung	Quelle
NCBI PubMed Publikationsdatenbank	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Zitate 7 (verwendet am 17.05.2025 um 18:30)	https://www.zitate7.de/7529/Was-waere-das-Leben-haetten-wir.html
ChatGPT	https://chatgpt.com/

2.1.8 Hersteller

Die nachfolgende Tabelle listet die Hersteller aller verwendeten Materialien auf.

Tabelle 9: Verwendete Hersteller

Name	Standort
Abcam	Cambridge, United Kingdom
ABENA	Zörbig, Deutschland
Adobe Systems	San José, USA
Agilent	Santa Clara, USA
BioLegend	Fell, Deutschland
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG,	Oberkochen, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, USA
Clarivate	Philadelphia, USA
EMD Millipore Corporation	Burlington, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gilson	Middleton, USA
Kimberly-Clark Professional	Irving, USA
Liebherr	Bulle, Schweiz
Life Technologies	Paisley, United Kingdom
Microsoft Corporation	Redmond, USA
NeoLab	Heidelberg, Deutschland
PeproTech	Rocky Hill, USA
R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, Deutschland

Labor- u. Medizintechnik	
Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen, Deutschland
SARSTEDT AG&Co.	Nümbrecht, Deutschland
Scotsman	Illinois, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
VWR part of avantor	Darmstadt, Deutschland
Wesemann	Syke, Deutschland
Xylem analytics	Weilheim, Deutschland

2.1.9 Stammzellmedien

Die nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Stammzellmedien auf.

Tabelle 10: Verwendete Stammzellmedien

Medium	Grundmedium und Zusätze	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.
PT	PeproGrow™ Basalmedium 500ml	PeproTech	BM-hESC-500
	Growth Factor Component	PeproTech	GF-hESC-500
FTDA	DMEM F12 GlutaMAX	Gibco	31331-028
	+ 1x HSA	BI	05-720-1B
	+ 1x ITS	Corning	354351
	+ 1x CDL	Gibco	11905-031
	+ 10 ng/ml FGF2	PeproTech	100-18B
	+ 0,5 ng/ml TGFβ	PeproTech	100-21
	+ 5 ng/ml Activin A	PeproTech	120-14E
	+ 0,05 nM Dorsomorphin	Abcam	AB120843

2.1.10 Differenzierungsmedien

Die nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Differenzierungsmedien auf.

Tabelle 11: Verwendete Differenzierungsmedien

Medium	Grundmedium und Zusätze	Endkonzentration	Hersteller	REF-Nr. oder Kat. Nr.

CDM (200ml)	DMEM F12 GlutaMAX	49% (v/v)	Gibco	31331-028
	IMDM GlutaMAX	49% (v/v)	Gibco	31980030
	CDL	1x	Gibco	11905-031
	BSA (25%=250mg/ml)	5mg/ml	VWR	9048-46-8
	Insulin (10mg/ml)	7µg/ml	Merck	11061-68-0
	Transferrin (20mg/ml)	15µg/ml	Sigma- Aldrich	T8158
	1-Tioglycerol (11,5M)	460µM	Sigma- Aldrich	M1753
	Antibiotikum- Antimykotikum	1x	Gibco	15240062
OMM (100ml)	DMEM F12	49% (v/v)	Gibco	31331-028
	Neurobasal	49% (v/v)	Gibco	21103049
	N2 Supplement	0,5x	Thermo Fisher	17502048
	B27-Vitamin A	0,5x	Thermo Fisher	12587010
	GlutaMAX	1x	Gibco	35050061
	Antibiotikum- Antimykotikum	1x	Gibco	15240062
	β-MercaptoetOH (50mM)	0,1mM	Sigma- Aldrich	M6250

2.2 Methoden

2.2.1 Differenzierung der Innenohr-Organoiden

Die verwendeten Innenohr-Organoiden stammen von humanen Keratinozyten, welche durch Lentiviren zu induzierten pluripotenten Stammzellen reprogrammiert wurden. Keratinozyten wurden ausgewählt, da sie vergleichsweise einfach gewonnen werden können, hierzu ist lediglich die Entnahme ein paar weniger Haare eines Spenders notwendig. Reprogrammierung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Keratinozyten durch Überexpression ausgewählter Faktoren (*OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC* und *KLF4*) in einen pluripotenten Stammzellzustand zurückversetzt werden. Die gewonnenen Stammzellen wurden in zwei verschiedenen Medien kultiviert (siehe Tabelle 2.1.8). Es wurde das Differenzierungsprotokoll von (Koehler et al., 2017) verwendet. Als Differenzierungsmedien kamen Chemically Defined Medium (CDM) und OMM zum Einsatz (siehe Tabelle 2.1.9). Im Anschluss wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für Immunologische- und RNA Analysen entnommen.

2.2.1.1 Organoiden einbetten

Um die dreidimensionalen Organoiden später schneiden, auf Objektträger aufbringen und färben zu können, müssen Sie zunächst mittels eines geeigneten Mediums eingebettet werden. Hierfür werden diese zunächst für 30 min mit 4% PFA fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Unter dem Stereomikroskop werden die fixierten Organoiden in einer Probenform mit Tissue Tek O.C.T. eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

2.2.1.2 Schnittpräparate der Organoiden erstellen

Die gefrorene Probe wird auf der Präparatehalterung des Microm HM560 Cryostates mittels Tissue Tek O.C.T. Compound befestigt. Drei Schnittpräparate werden mittels SuperFrost plus Objektträgern aufgezogen und zunächst für 24 Stunden bei 4°C, anschließend zur Langzeitlagerung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung gehört zu den häufig angewandten Verfahren, um den Nachweis von Proteinen zu ermöglichen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz binden die Primärantikörper an das zu detektierende Protein in den jeweiligen Zellen der Organoide. Die Sekundärantikörper, welche an unterschiedliche Fluorophore gekoppelt sind, binden anschließend an den Primärantikörper und machen es somit möglich ein Signal zu detektieren. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes kann ermittelt werden, ob und wo das zu untersuchende Protein vorliegt.

2.2.2.1 Vorbereitung für die Primärantikörper-Behandlung

Bevor man mit der Färbung startet, müssen die Objektträger für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur auftauen. Danach folgt die Rehydrierung für 5 min in PBS, gefolgt von einem Ethanol-Gradient zunächst von 70%, über 90% zu 100% aufsteigend und danach in derselben Reihenfolge absteigend für jeweils 30 Sekunden. Anschließend werden die Objektträger wieder in PBS gewaschen. Nach vorsichtigem kurzen Abklopfen der überschüssigen Flüssigkeit, werden die noch feuchten Schnittpräparate mit dem Dako Pen umkreist. Nach Überführen der Objektträger in die vorbereitete feuchte Kammer wird jedes Schnittpräparat mit ca. 20µl der aufgetauten Blockierlösung benetzt. Die Blockierlösung besteht aus 10% NDS, 1,25% BSA, 4% Magermilchpulver-Lösung und 0,1% Triton-X. Zur Inkubation wird die feuchte Kammer geschlossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.2.2.2 Herstellung der Primärantikörperlösungen und Auftragen

Die Primärantikörper werden in der Blockierlösung angesetzt (Tabelle 2). Sobald die Inkubationszeit abgelaufen ist, werden die Objektträger kurz wieder abgeklopft, dann zurück in die feuchte Kammer gelegt und die Schnittpräparate werden mit dem jeweiligen Antikörper benetzt. Daraufhin wird die feuchte Kammer wieder geschlossen und über Nacht bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Herstellung der Sekundärantikörperlösungen und Auftragen

Sind die Sekundärantikörperlösungen vorbereitet (Tabelle 3), durchlaufen die Objektträger drei Küvetten mit PBS um die nicht gebundenen Primärantikörper und die Blockierlösung abzuwaschen. Die Sekundärantikörperlösungen werden auf die jeweiligen Schnittpräparate pipettiert, die Kammer wird geschlossen und zur Inkubation bei Raumtemperatur ohne Licht für 45 Minuten stehen gelassen. Nach der Inkubation durchlaufen die Objektträger erneut den Waschvorgang mittels der drei Küvetten. Hier wird sichergestellt, dass alle nicht an die Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörper sowie die Reste der Magermilchpulverlösung abgewaschen werden.

2.2.2.4 Dauerpräparate herstellen

Nach dem letzten Waschvorgang werden die Objektträger nochmals kurz abgeklopft und das Einschlussmittel Mowiol wird aufgetragen, welches zuvor aufgetaut wurde. Anschließend wird ein Deckglas (24x50mm) vorsichtig und langsam über die Schnittpräparate gelegt, sodass keine Luftblasen entstehen. Die nun auf den Objektträgern platzierten Deckgläser verbleiben zum Trocknen über den Schnittpräparaten.

2.2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Schnittpräparate können unter dem Fluoreszenzmikroskop nach den jeweiligen zu färbenden Proteinen untersucht werden. Dazu wird Licht durch einen Anregungsfilter so gefiltert, dass nur die entsprechende Wellenlänge, die das jeweilige Fluorophor absorbiert, hindurchtritt. Das Fluorophor emittiert daraufhin Licht einer längeren Wellenlänge. Dieses Licht gelangt durch einen weiteren Filter, den sogenannten Emissionsfilter und kann dann durch die Okulare wahrgenommen werden. Ist das zu färbende Protein also in den jeweiligen Zellen der Organoide vorhanden, dann wird dies durch die jeweilige Farbe, die durch den Sekundärantikörper festgelegt wurde, sichtbar (Tabelle 3).

2.2.3 RNA-Analyse

2.2.3.1 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse der Genexpression wurde die messenger-RNA (mRNA) aus den entsprechenden Zellproben isoliert und mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die qRT-PCR erfolgte anschließend zur quantitativen Bestimmung der Zielgen-Transkripte.

Für die cDNA-Synthese und ggf. Präamplifikation wurden jeweils 20 ng RNA in einem Ein-Schritt-Verfahren mit dem SuperScript One-Step RT-PCR System mit Platinum Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) durchgeführt. Die Reaktionen liefen in einem StepOne Plus Thermocycler (Thermo Fisher). Die anschließende Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem GE 96.96 Dynamic Array System (Fluidigm) unter Verwendung von TaqMan Assays (Thermo Fisher), TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Applied Biosystems) und GE Sample Loading Reagent (Fluidigm).

Die Detektion der mRNA erfolgte jeweils in zwei technischen Replikaten pro Probe. Die relative Genexpression wurde als Verhältnis des Zielgens zum Housekeeping-Gen *GAPDH* berechnet. Die Genexpression in den undifferenzierten hiPS-Zellen wurde dabei als Referenzwert auf 1 normiert. Die Veränderung der Genexpression wird als sogenannte Fold Induction (relative Induktion im Vergleich zur Ausgangsexpression) dargestellt.

3. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse einer otischen Differenzierung dargestellt, bei der aus primären humanen Keratinozyten über das Reprogrammierungsstadium zu hiPS-Zellen Organoide erzeugt wurden. Diese hiPSZ wurden in zwei unterschiedlichen Kulturmedien kultiviert und anschließend in Richtung otische Plakode differenziert. Dabei handelt es sich um das kommerziell erhältliche PeproGrow™ von PeproTech (PT) und das selbst hergestellte FTDA. Untersucht wurde, basierend auf dem übernommenen Differenzierungsprotokoll nach Koehler et al. (2017), ob sich eine erfolgreiche otische Entwicklung nachweisen lässt und inwiefern das jeweils verwendete Medium die Expression otischer Marker auf RNA- und Proteinebene beeinflusst. Die Untersuchung liefert wertvolle Hinweise darauf, wie unterschiedliche Kulturbedingungen den Verlauf und die Qualität der otischen Differenzierung beeinflussen. Dies ist ein wichtiger Aspekt, der sowohl für das Verständnis der Innenohrentwicklung, als auch für zukünftige Anwendungen in der regenerativen Medizin von Bedeutung ist. Teile der im gesamten Ergebnisteil dargestellten Daten wurden bereits in einer Publikation veröffentlicht, an der der Autor dieser Arbeit als Koautor beteiligt war (Klingenstein et al., 2026).

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Lassen sich in den Organoiden zu frühen Differenzierungszeitpunkten typische Markerproteine der frühen otischen Entwicklung nachweisen?
2. Gibt es einen Unterschied zwischen den beiden verwendeten Stammzellmedien im Hinblick auf
 - a. Morphologie der frühen Organoide
 - b. Protein Expression
 - c. RNA Expression
3. Lassen sich publizierte Vertreter der Annexin Familie in den frühen otischen Organoiden nachweisen?

3.1 Expression von frühen otischen Marker-Proteinen

Organoide, die aus hiPSZ-Zellkolonien reprogrammierter humaner Keratinozyten hervorgingen, wurden an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20 auf Proteine untersucht, die typischerweise während der Entwicklung der otischen Plakode exprimiert werden. Die Analysen wurden an Organoiden durchgeführt, die aus hiPSZ hervorgingen, welche entweder im kommerziell erhältlichen Stammzellmedium PT oder im selbst hergestellten Stammzellmedium FTDA kultiviert worden waren. Dazu wurden Schnittpräparate angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Um die untersuchten Proteine sichtbar zu machen, kam die hochauflösende Immunfluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Ziel des Experiments war es, die frühe otische Entwicklung anhand des *in vitro* Modells zu simulieren und die für die frühe otische Entwicklung wichtigen Markerproteine nachzuweisen. Somit war es möglich einen direkten Vergleich zwischen den beiden verwendeten Medien zu erhalten.

Die im Rahmen dieses Experiments erhobenen Expressionsdaten der Markerproteine lassen sich nicht nur zeitlich, sondern auch entwicklungs- und morphologisch einordnen. Im Verlauf der frühen Differenzierung des Ektoderms zu otischen Vorläuferstrukturen durchlaufen die Zellen charakteristische Stadien. Dabei kommt es erst zur Entwicklung des nicht-neuronalen Ektoderms (NNE), anschließend bildet sich die präplakodale Region (PPR) und schließlich bildet sich die otische Plakode, aus der sich im weiteren Verlauf der Entwicklung das Innenohr entwickelt.

3.1.1 Markerexpression der NNE und PPR

Als Marker des neuronalen Ektoderms wurde PAX6 untersucht. Zu den analysierten Markerproteinen des NNE zählte TFAP2 α . Als Markerproteine der PPR wurden EYA2, SIX1 und SIX4 untersucht.

Wie in der Abbildung 8 zu erkennen ist, ließ sich in den im PT-Medium kultivierten Organoiden an Tag 6 der Transkriptionsfaktor PAX6 in wenigen Zellen nachweisen. Auch in der Abbildung 9 ist zu erkennen, dass sich in den im FTDA-Medium kultivierten Organoiden an Tag 6 der Transkriptionsfaktor PAX6 ebenfalls in wenigen Zellen nachweisen ließ.

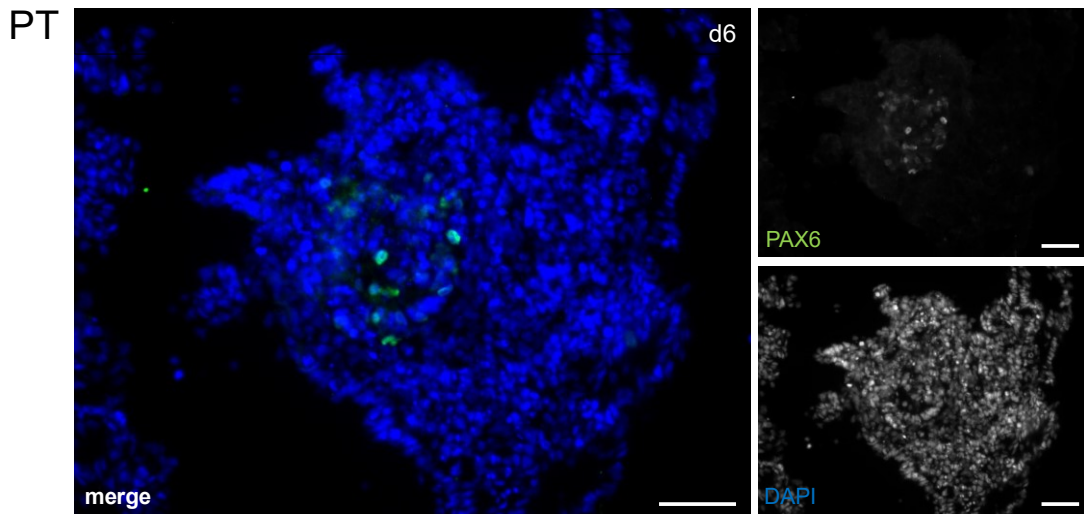


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX6 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 6 der Differenzierung. PAX6 (grün) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m.

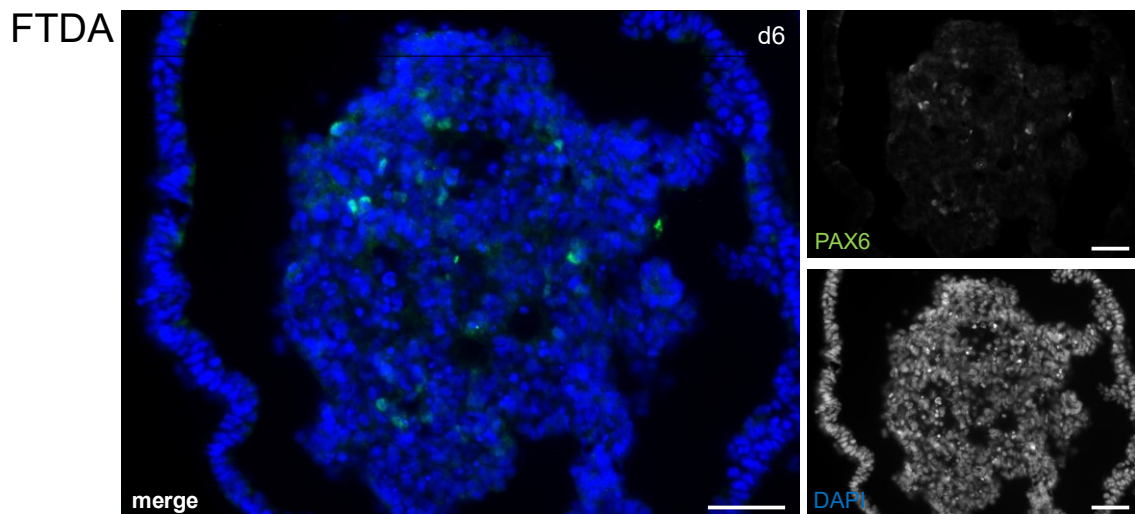


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX6 in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 6 der Differenzierung. PAX6 (grün) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Expression von TFAP2 α an Tag 6 in beiden Medien. In den im PT-Medium differenzierten Organoiden fanden sich zusätzlich einzelne Zellen in denen SIX4 detektiert werden konnte. Vereinzelt dieser SIX4-positiven Zellen zeigten in ihrer unmittelbaren Umgebung eine

Expression von TFAP2 α . In den im FTDA-Medium kultivierten Organoiden war hingegen kein eindeutiger Nachweis von SIX4-positiven Zellen möglich.

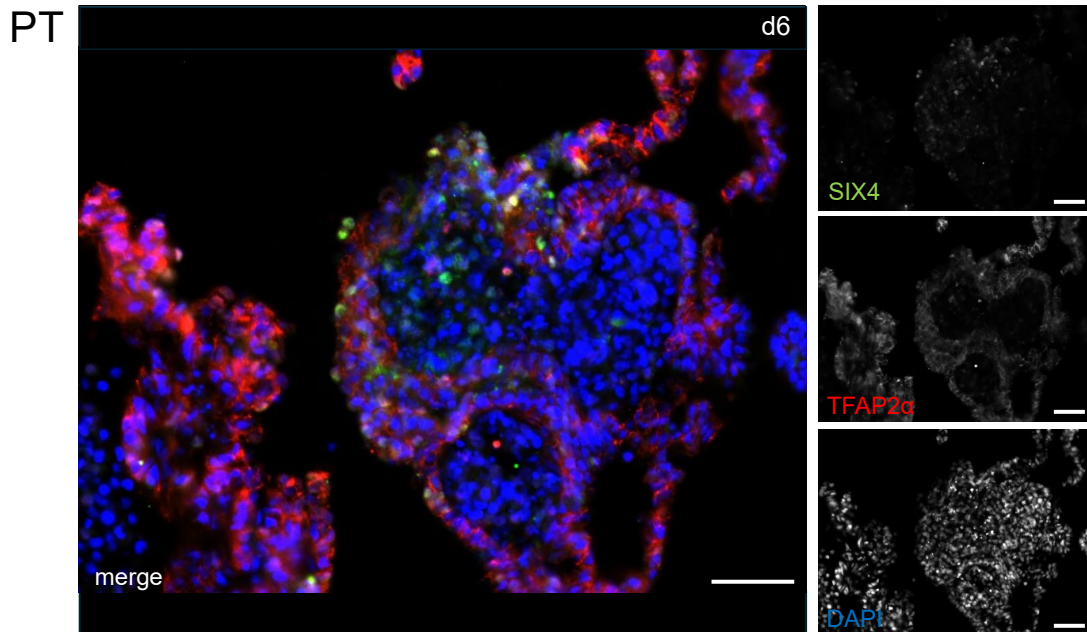


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX4 und TFAP2 α in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 6 der Differenzierung. SIX4 (grün), TFAP2 α (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m.

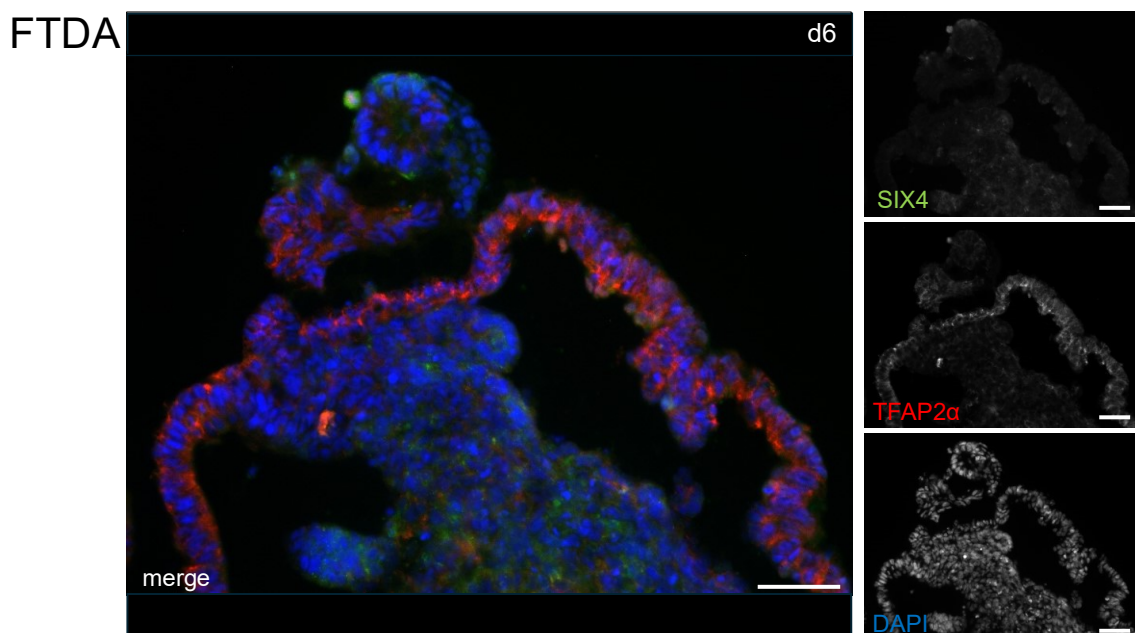


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX4 und TFAP2 α in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 6 der Differenzierung. SIX4 (grün), TFAP2 α (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

Die untersuchten Ausschnitte der Abbildungen 12 und 13 zeigen ECAD-positive epitheliale Einwölbungen innerhalb der Organoide an Tag 6. Dieses Phänomen ließ sich sowohl in aus hiPSZ im FTDA-Medium als auch im PT-Medium differenzierten Organoiden beobachten.

In Bezug auf die Expression von EYA2 war in vereinzelt Zellen ein positiver Nachweis erkennbar, wobei sich bei diesen Zellen kein direkter Bezug zu den Zellen mit ECAD-positiver Expression erkennen ließ.

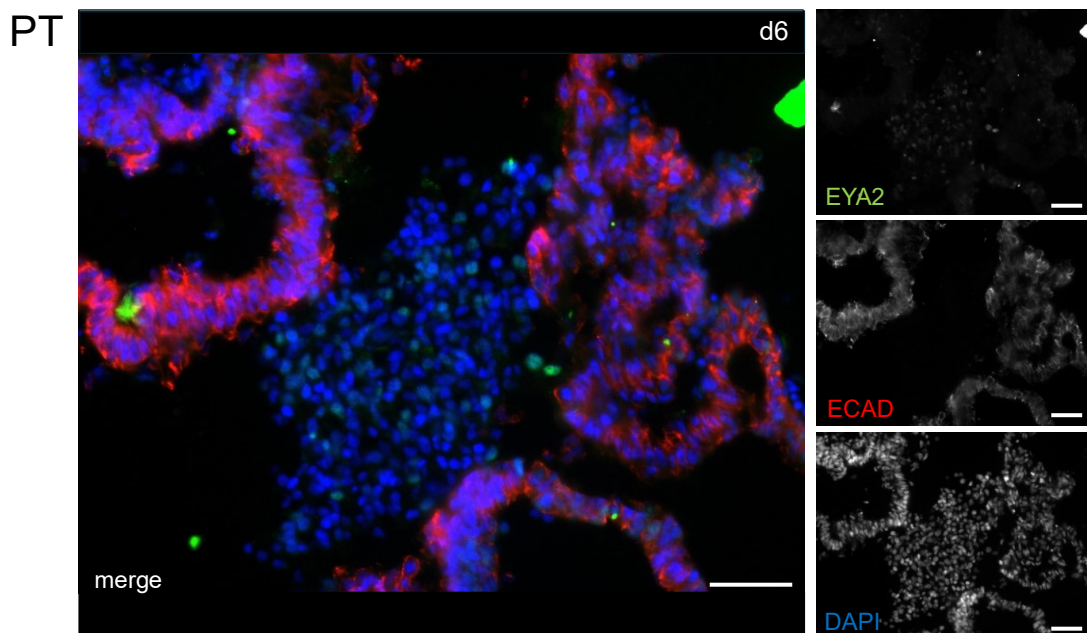


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung gegen EYA2 und ECAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 6 der Differenzierung. EYA2 (grün), ECAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m.

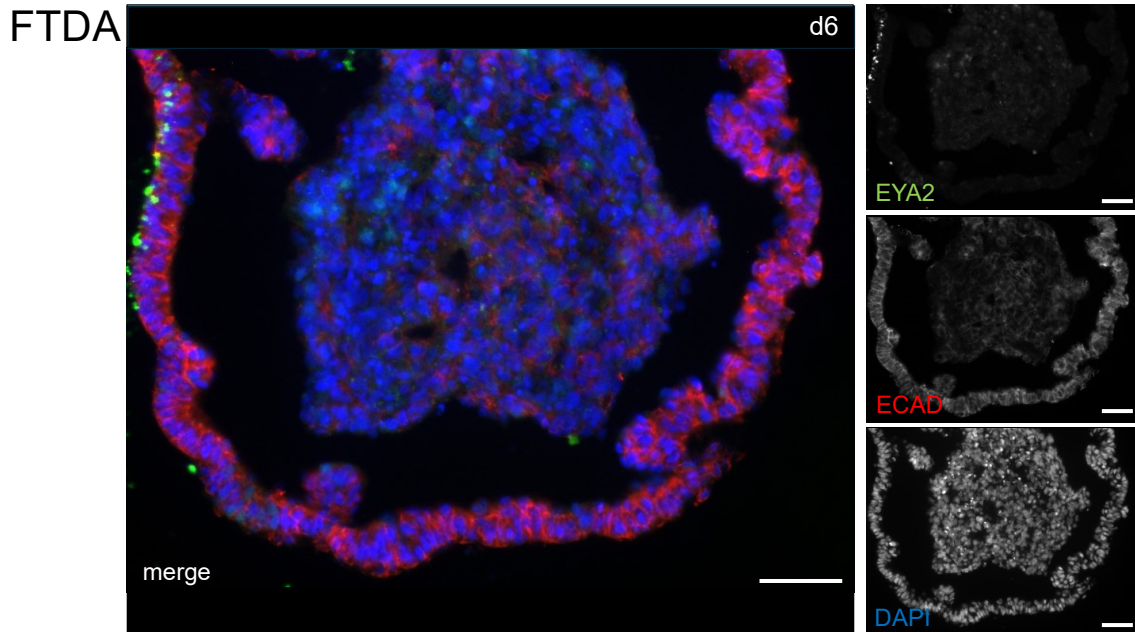


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung gegen EYA2 und ECAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 6 der Differenzierung. EYA2 (grün), ECAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μm . Übernommen aus Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

In den Abbildungen 14 und 15 ist erkennbar, dass am Tag 12 in beiden Medien SIX1-Proteine in einem Teil der untersuchten Zellen nachweisbar waren. Die Expression erschien nicht homogen, sondern zeigte eine clusterartige Anordnung mit überwiegend zentraler Lokalisation der SIX1-positiven Zellen innerhalb der Zellaggregate. Zudem war das SIX1-Signal überwiegend zellkernassoziiert und überlagerte sich mit der DAPI-Färbung.

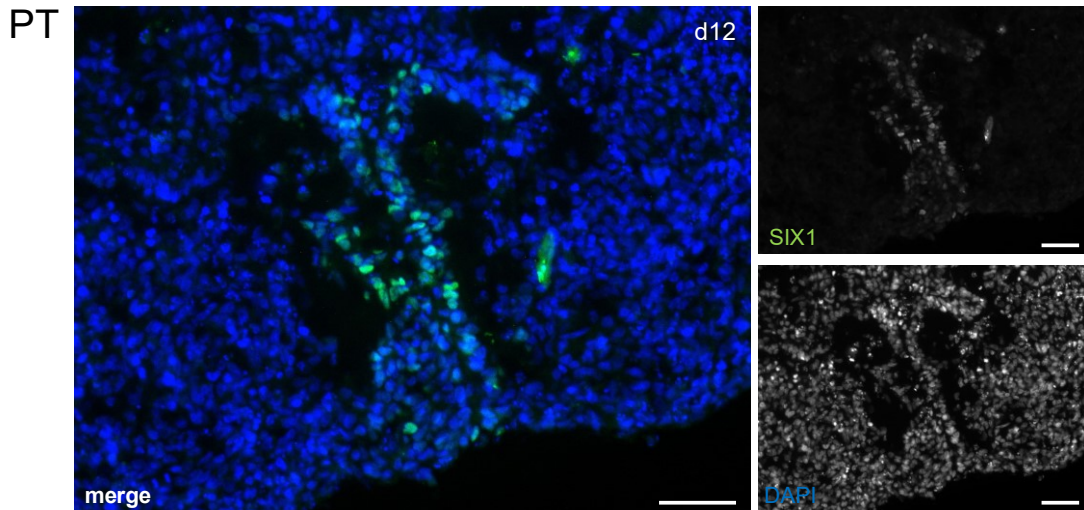


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX1 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 12 der Differenzierung. SIX1 (grün) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 µm. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

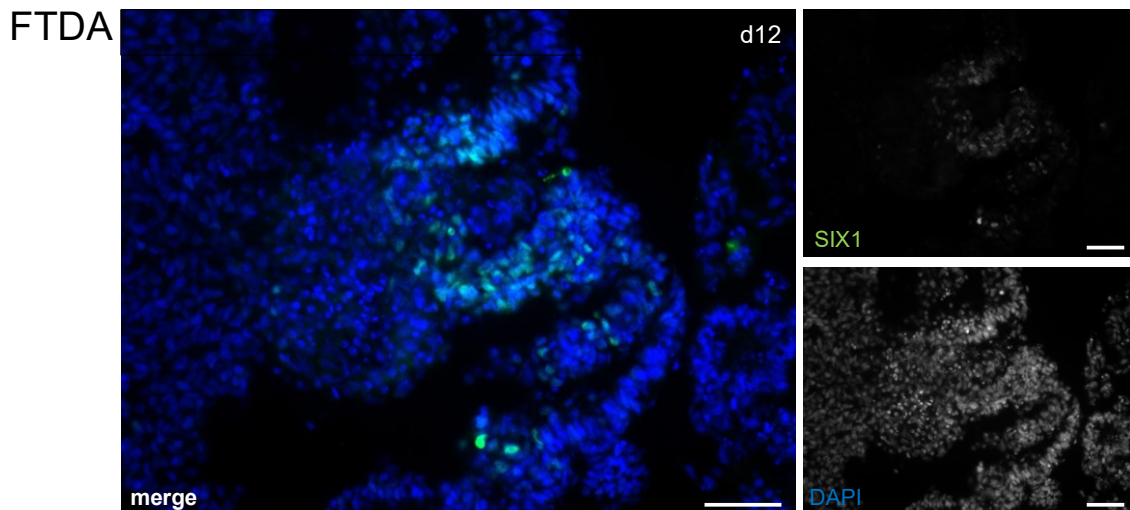


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung gegen SIX1 in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 12 der Differenzierung. SIX1 (grün) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 µm. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

3.1.2 Markerexpression der otischen Plakode

Die untersuchten Markerproteine der otischen Plakode umfassten ECAD, PAX8, SOX2 und SOX9.

Die Abbildungen 16 und 17 lassen erkennen, dass am Tag 12 in beiden Medien einige Zellen PAX8 exprimierten. Das PAX8-Signal zeigte sich, soweit beurteilbar, überwiegend zellkernassoziiert. Abbildung 17 lässt eine deutliche räumliche Distanz zwischen PAX8-positiven und ECAD-positiven Zellen erkennen. In Abbildung 16 ist diese Distanz zwischen PAX8-positiven und ECAD-positiven Zellen hingegen nur partiell ersichtlich.

ECAD wurde auch an Tag 12 weiterhin exprimiert, was sich an den ECAD-positiven epithelialen Einwölbungen innerhalb der Organoide darstellte.

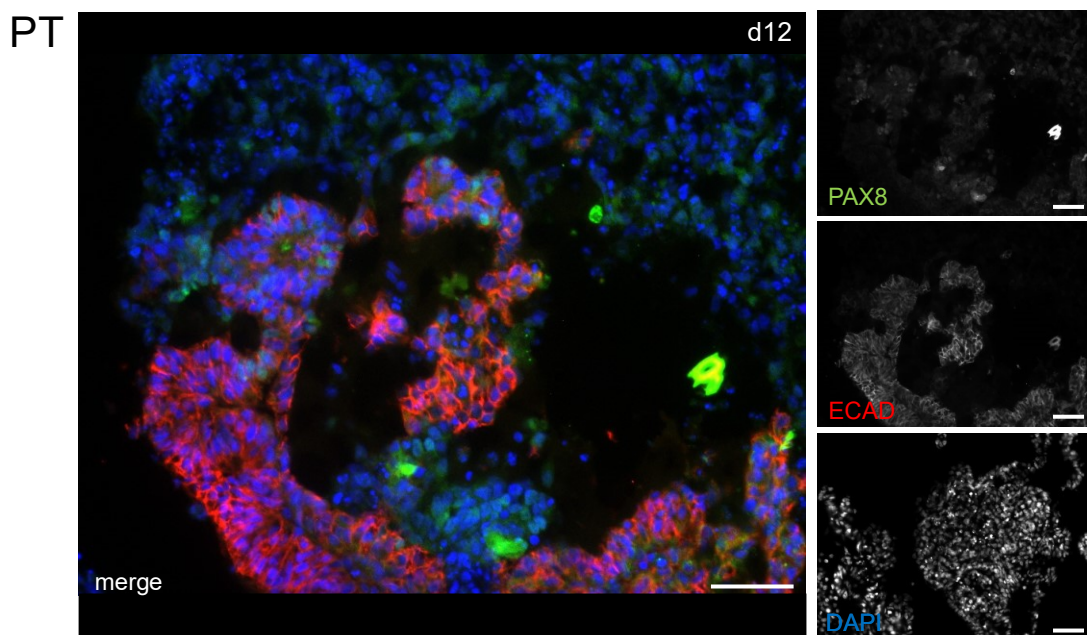


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX8 und ECAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 12 der Differenzierung. PAX8 (grün), ECAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

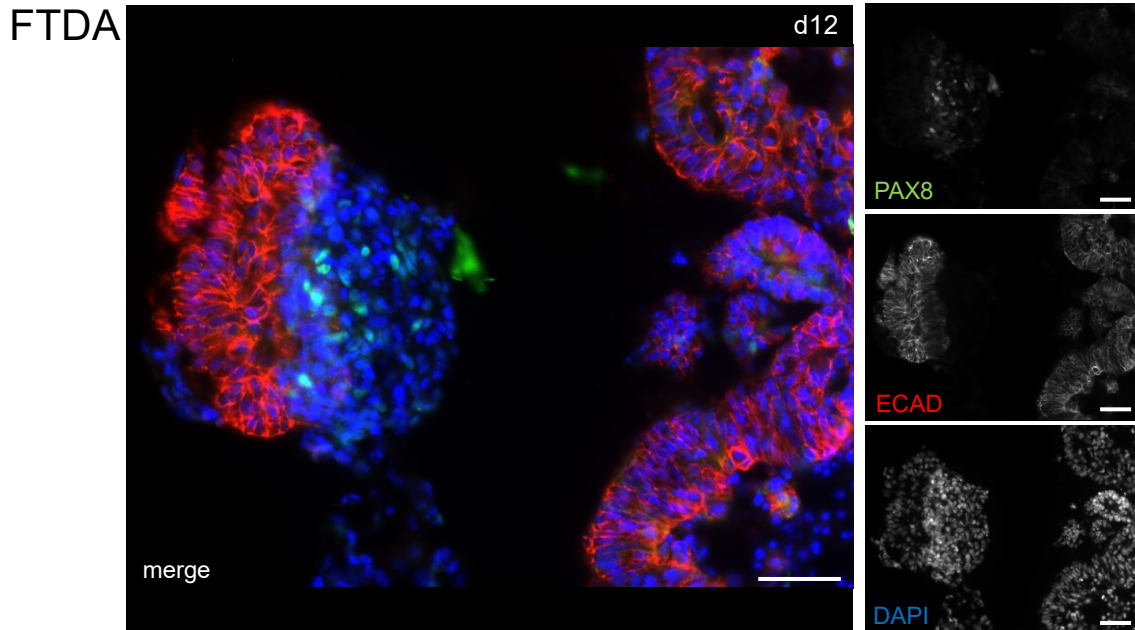


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung gegen PAX8 und ECAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 12 der Differenzierung. PAX8 (grün), ECAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μm . Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

An Tag 20 der Differenzierung ließen sich spezifische Markerproteine der otischen Plakode nachweisen (Abbildung 18, 19, 20 und 21). Es ließen sich, wie in Abbildung 18 und 19 erkennbar ist, einige SOX9 positive Zellen nachweisen. Die Lokalisation der SOX9-Expression erschien dabei überwiegend zellkernassoziiert. NCAD zeigte eine ausgeprägte Expression in vermutlich epithelial organisierten Zellverbänden, wobei die Verteilung nicht homogen, sondern teilweise diffus und netzartig erschien. Zusätzlich ist erkennbar, dass SOX9-positive Zellen teilweise in räumlicher Nähe zu den NCAD-exprimierenden Zellverbänden auftraten.

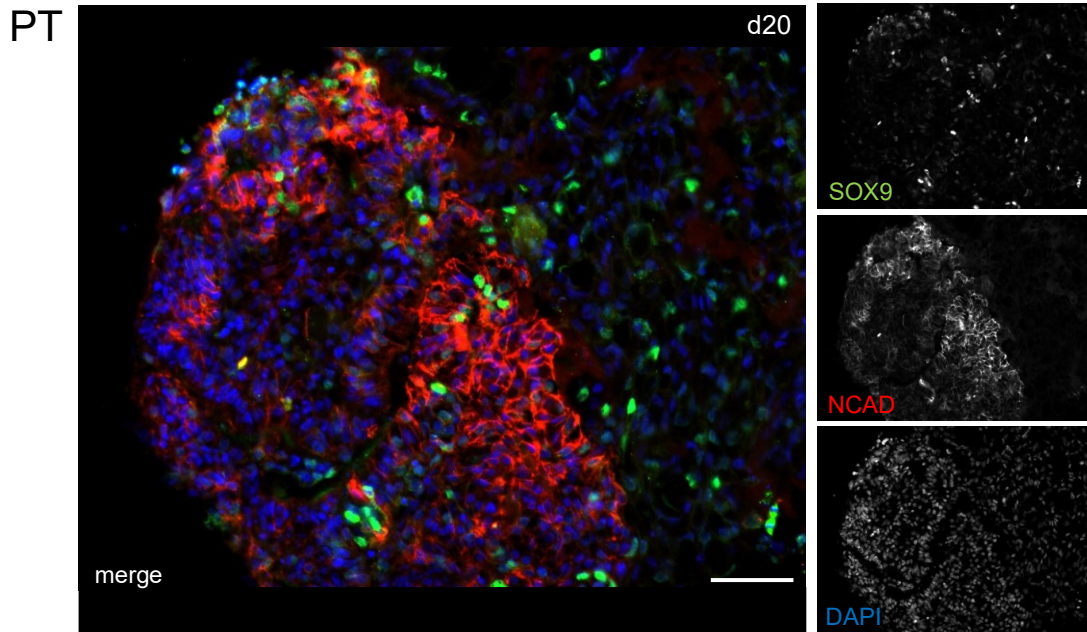


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX9 und NCAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. SOX9 (grün), NCAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μm . Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

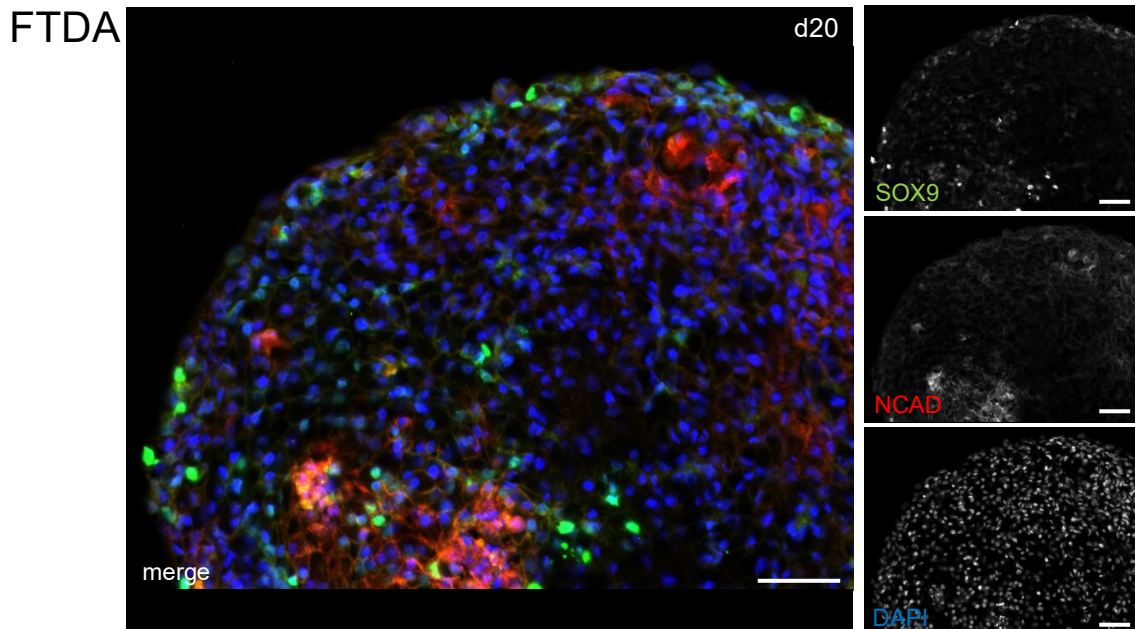


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX9 und NCAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. SOX9 (grün), NCAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μm .

Die Abbildungen 20 und 21 lassen erkennen, dass auch an Tag 20 in den Organoiden aus beiden untersuchten Stammzellmedien weiterhin die Expression von ECAD, mit den bereits beschriebenen epithelialen Einwölbungen innerhalb der Organoide, bestand. Die Expression erschien hier jedoch nochmals deutlich ausgeprägter als zu den Zeitpunkten an Tag 6 und Tag 12. Darüber hinaus war erkennbar, dass einige Zellen SOX2 exprimierten. Die Expression von SOX2 war dabei zellkernassoziiert. In Abbildung 20 traten die SOX2-positiven Zellen innerhalb der identifizierten epithelialen Strukturen auf, während sie in Abbildung 21 sowohl innerhalb dieser Strukturen als auch in deren unmittelbarer Umgebung lokalisiert waren.

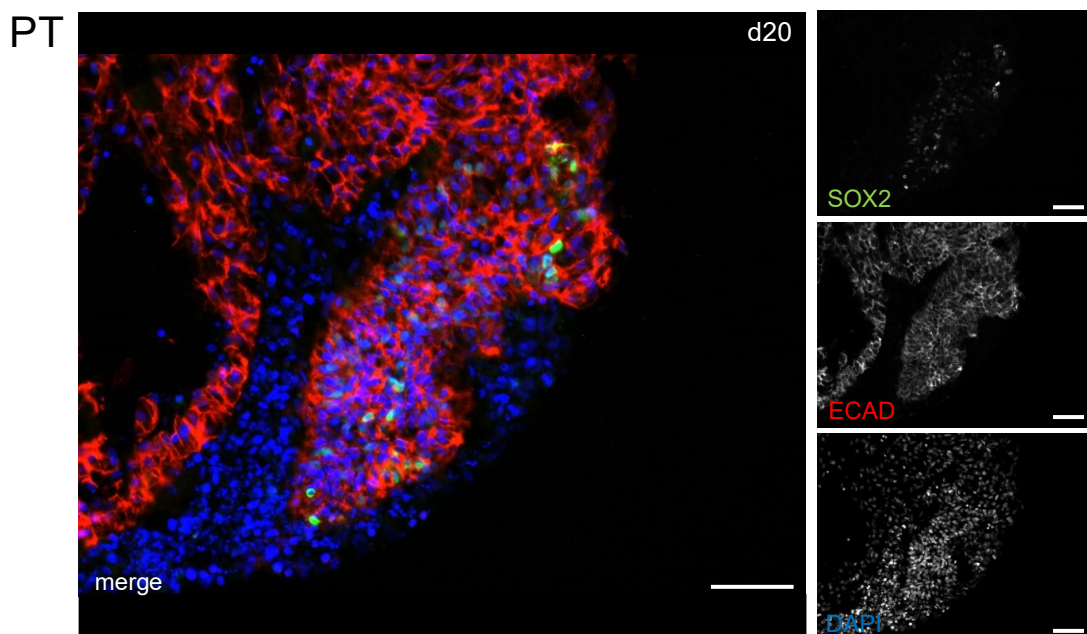


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX2 und ECAD in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. SOX2 (grün), ECAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 μ m.

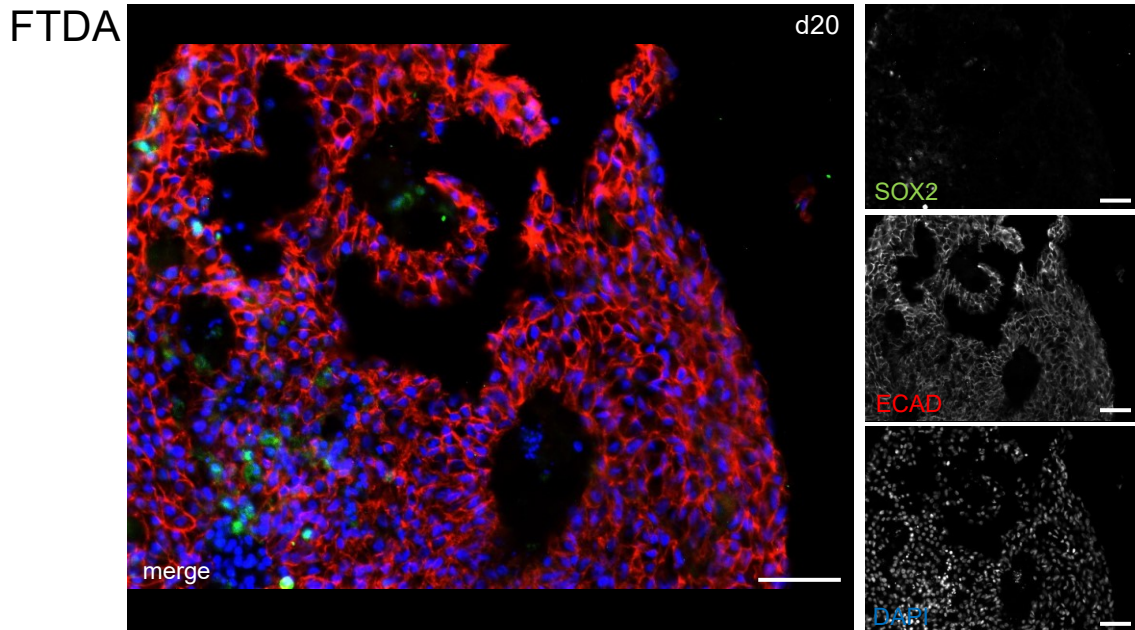


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung gegen SOX2 und ECAD in FTDA-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im FTDA-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. SOX2 (grün), ECAD (rot) und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab: 100 µm.

Zusammenfassend lässt sich zu den Ergebnissen der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung zur frühen otischen Entwicklung sagen, dass NNR, PPR und otische Markerproteine festgestellt werden konnten.

Tabelle 12: Expression verschiedener Marker-Proteine

Die Tabelle zeigt ob die untersuchten Proteine exprimiert wurden (grünes *) oder nicht (rotes *).

Protein	PAX6	TFAP2α	SIX4	SIX1	EYA2	PAX8	ECAD	NCAD	SOX9	SOX2
PT	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FTDA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

3.2 RNA-Expression an verschiedenen Differenzierungstagen in den verwendeten Stammzellmedien

Die hiPSZ wurden in zwei verschiedenen Stammzellmedien, einmal PeproGrow™ (PT) der Firma PeproTech und im selbst hergestellten FTDA, kultiviert. Zunächst ist festzuhalten, dass eine Kultivierung der hiPSZ in beiden Medien, sowohl im erworbenen Medium PeproGrow™ (PT) von PeproTech und im selbst hergestellten FTDA, möglich war. Eine Kultivierung erfolgte bis zur Differenzierung zu den frühen otischen Plakoden. Die untersuchten Differenzierungszeitpunkte waren Tag 6, Tag 12 und Tag 20. Die dargestellten Genexpressionsdaten wurden mittels qRT-PCR erhoben, auf *GAPDH* normalisiert und relativ zur Expression in hiPSZ (Referenzwert = 1) ausgewertet (Fold Inuction).

3.2.1 RNA-Expression von *EYA2*

Die Abbildung 22 zeigt die relative RNA-Expression von *EYA2* in Organoiden, die in den beiden Stammzellmedien FTDA und PT kultiviert wurden, an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20.

An Tag 6 zeigte sich in beiden Medien eine deutliche Hochregulation der Expression von *EYA2* im Vergleich zu den hiPSZ, wobei in FTDA die Expression etwa um das 8-fache und in PT etwa um das 5-fache gegenüber den hiPSZ erhöht war. An Tag 12 nahm die Expression in beiden Medien im Vergleich zu Tag 6 ab. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine signifikant höhere Expression von *EYA2* in FTDA im Vergleich zu PT ($P \leq 0,05$: *). An Tag 20 war erneut eine Zunahme der Expression von *EYA2* in beiden Medien erkennbar, wobei die Expression in FTDA etwa um das 2-fache und in PT um nahezu das 4-fache erhöht war.

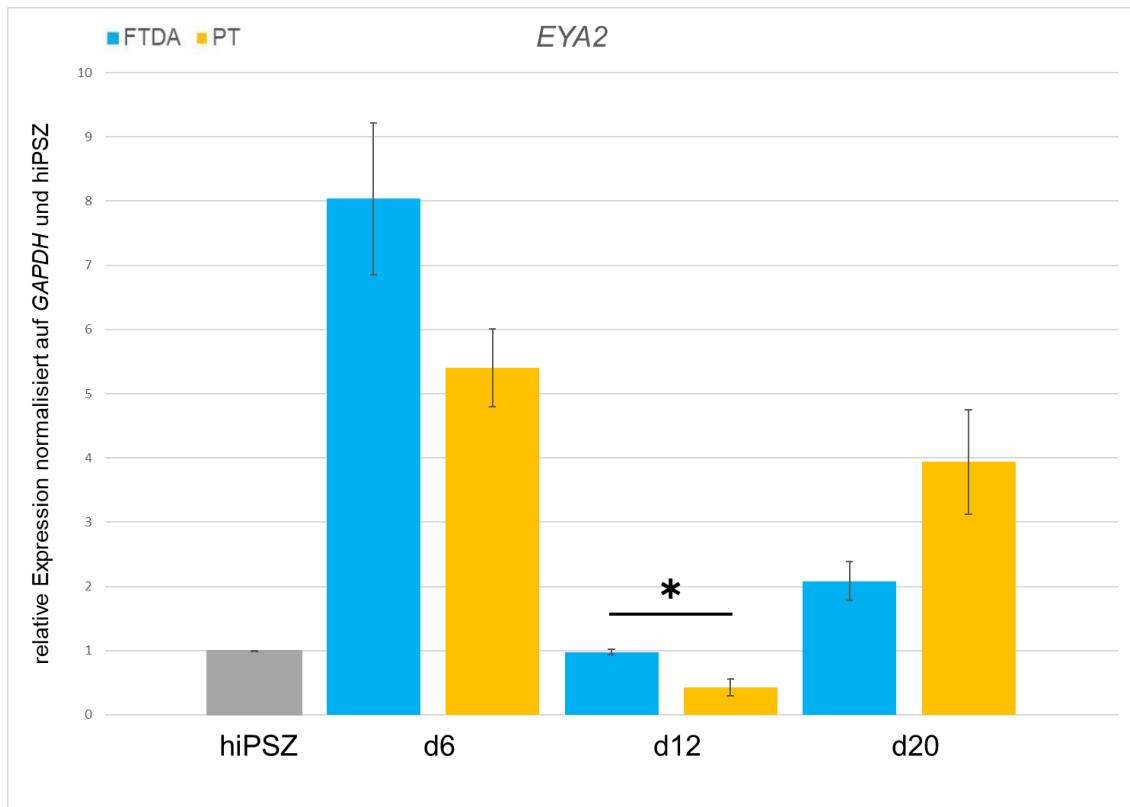


Abbildung 22: *EYA2* - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von *EYA2* in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in FTDA (blau) und PT (gelb) an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf *GAPDH* und hiPSZ (grau). Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

3.2.2 RNA-Expression von *ECAD*

Die Abbildung 23 zeigt die relative RNA-Expression des epithelialen Zelladhäsionsmarkers *ECAD* in Organoiden, die in den Stammzellmedien FTDA und PT kultiviert wurden, an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20.

Im Vergleich zu den hiPSZ war die *ECAD*-Expression zu allen untersuchten Differenzierungszeitpunkten in beiden Kulturbedingungen reduziert. An Tag 6 lagen die Expressionswerte unterhalb des Niveaus der hiPSZ. An Tag 12 zeigten beide Medien niedrigere Expressionswerte als an Tag 6. Zum späteren Differenzierungszeitpunkt an Tag 20 waren im Vergleich zu Tag 12 in beiden Medien wieder höhere Expressionswerte zu beobachten, wobei die Expression weiterhin unterhalb des Niveaus der hiPSZ lag.

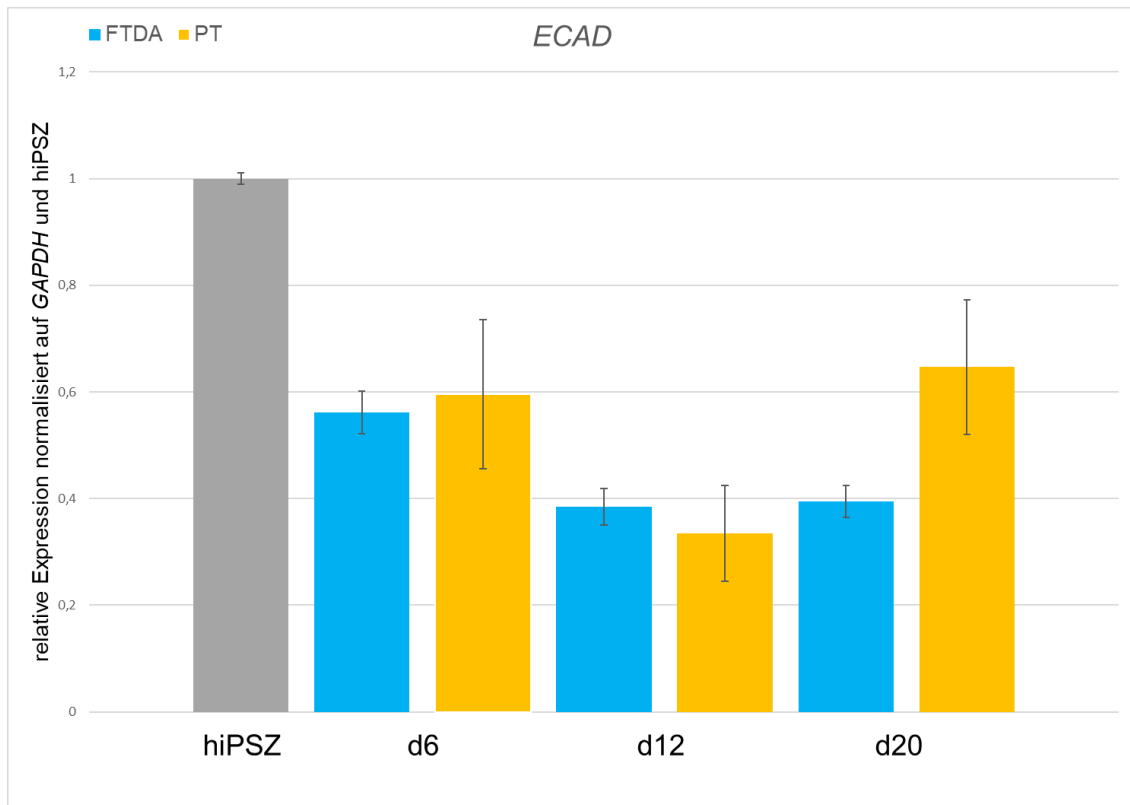


Abbildung 23: *ECAD* - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von *ECAD* in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in FTDA (blau) und PT (gelb) an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf *GAPDH* und hiPSZ (grau). Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

3.2.3 RNA-Expression von *SIX1*

Die Abbildung 24 zeigt die relative RNA-Expression von *SIX1* in Organoiden, die in den beiden verwendeten Stammzellmedien FTDA und PT kultiviert wurden, an den Tagen 6, 12 und 20.

An Tag 6 zeigte sich in FTDA die höchste Expression von *SIX1* im untersuchten Zeitraum, wobei die Expression in FTDA etwa 40-fach gegenüber den hiPSZ erhöht war, während in PT eine etwa 8-fache Erhöhung beobachtet wurde. An Tag 12 war die Expression von *SIX1* in beiden Medien im Vergleich zu den übrigen Zeitpunkten am niedrigsten, allerdings lag die Expression sowohl in FTDA als auch in PT weiterhin mehr als 2-fach über dem Niveau der hiPSZ. An Tag 20 nahm die Expression von *SIX1* in beiden Medien erneut zu. In FTDA war

die Expression an Tag 20 etwa 7-fach und in PT nahezu 14-fach gegenüber den hiPSZ erhöht.

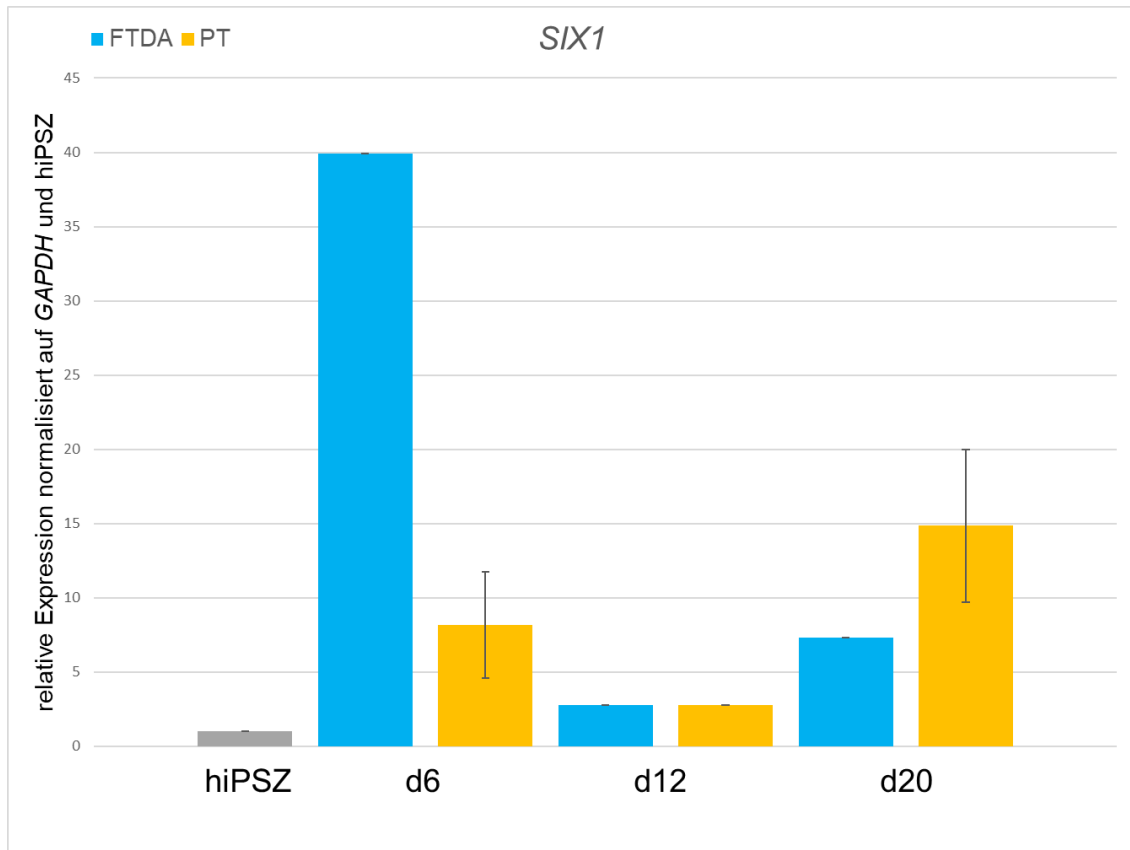


Abbildung 24: *SIX1* - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von *SIX1* in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in FTDA (blau) und PT (gelb) an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf *GAPDH* und hiPSZ (grau). Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

3.2.4 RNA-Expression von *PAX8*

Die Abbildung 25 zeigt die relative RNA-Expression von *PAX8* in Organoiden, die in den beiden verwendeten Stammzellmedien FTDA und PT kultiviert wurden, an den Tagen 6, 12 und 20.

An Tag 6 zeigte sich in FTDA die höchste Expression zu den untersuchten Zeitpunkten, wobei hier die Expression in FTDA etwa 6 950-fach gegenüber den hiPSZ erhöht war, während in PT eine etwa 10-fache Erhöhung beobachtet wurde. An Tag 12 lag die Expression in FTDA bei etwa 1 212-fach und in PT bei etwa 2-fach über dem Niveau der hiPSZ. Zum späteren

Differenzierungszeitpunkt an Tag 20 war in FTDA eine etwa 50-fache Erhöhung der Expression gegenüber den hiPSZ zu beobachten. In PT zeigte sich zu diesem Zeitpunkt die niedrigste Expression, welche hier etwa 0,25-fach unterhalb des Niveaus der hiPSZ lag.

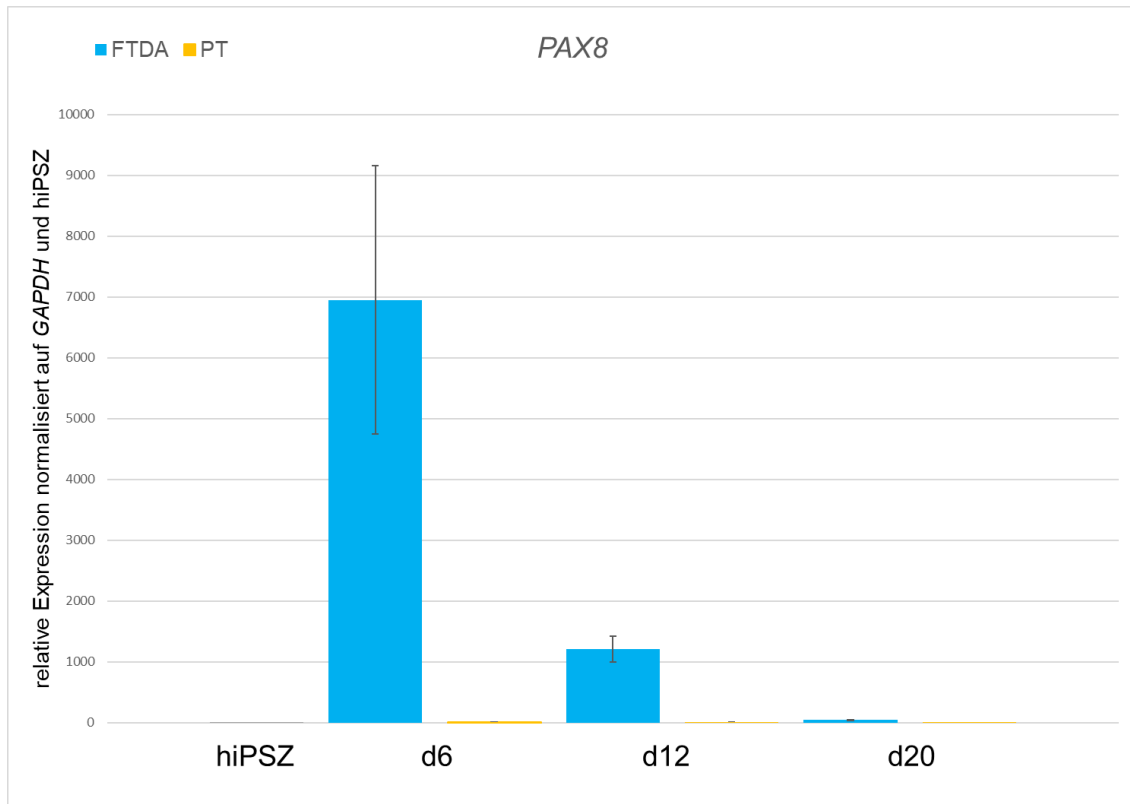


Abbildung 25: PAX8 - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von PAX8 in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in FTDA (blau) und PT (gelb) an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf GAPDH und hiPSZ (grau). Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

3.2.5 RNA-Expression von SOX9

Die Abbildung 26 zeigt die relative RNA-Expression von SOX9 in Organoiden, die in den beiden verwendeten Stammzellmedien FTDA und PT kultiviert wurden, an den Tagen 6, 12 und 20.

An Tag 6 war die Expression in FTDA auf etwa 0,1-fach im Vergleich zu den hiPSZ reduziert, während in PT eine mehr als 2-fache Expression gegenüber den hiPSZ beobachtet wurde. An Tag 12 zeigte sich in beiden Medien die niedrigste

Expression, wobei in FTDA die Expression weiterhin bei etwa 0,1-fach des Niveaus der hiPSZ lag, während in PT etwa 0,5-fach der Expression der hiPSZ erreichte wurde. Am Differenzierungstag 20 nahm die Expression in beiden Medien erneut zu und erreichte die höchsten Werte im untersuchten Zeitraum. Dabei war zu beobachten, dass die Expression in FTDA bei etwa 0,25-fach des Niveaus der hiPSZ lag, während in PT eine etwa 4-fache Erhöhung der Expression gegenüber den hiPSZ beobachtet wurde.

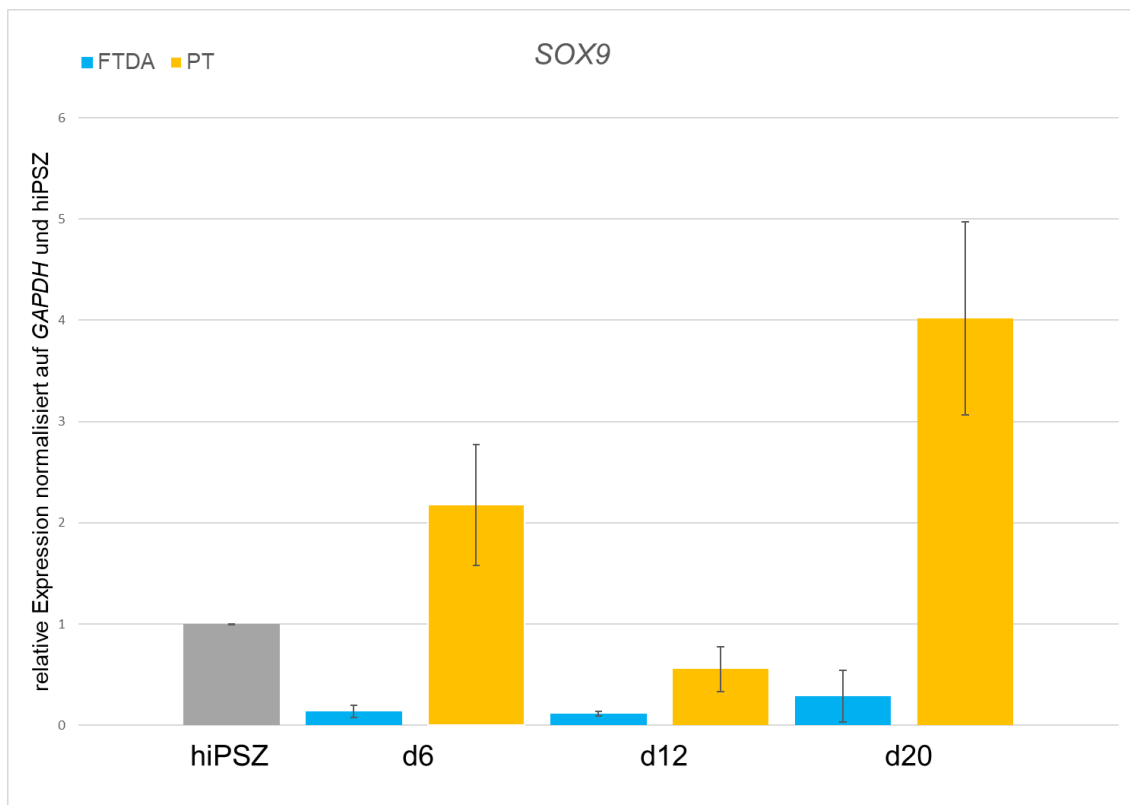


Abbildung 26: SOX9 - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von SOX9 in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in FTDA (blau) und PT (gelb) an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf GAPDH und hiPSZ (grau). Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

3.2.6 RNA-Expression von SOX2

Die Abbildung 27 zeigt die relative RNA-Expression von SOX2 in Organoiden, die in den beiden verwendeten Stammzellmedien FTDA und PT kultiviert wurden, an den Tagen 6, 12 und 20.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten war die Expression in beiden Kulturbedingungen niedriger als in den hiPSZ. An Tag 6 zeigten beide Medien die höchsten Expressionswerte zu den untersuchten Zeitpunkten, wobei die Expression sowohl in FTDA als auch in PT bei etwa 0,1-fach des Niveaus der hiPSZ lag. Am Differenzierungstag 12 war die Expression in beiden Medien am niedrigsten und lag in FTDA wie auch in PT bei etwa 0,01-fach im Vergleich zu den hiPSZ. Zu Tag 20 nahm die Expression in beiden Medien erneut zu, wobei sie in FTDA bei etwa 0,02-fach lag, während sie in PT etwa 0,1-fach des Niveaus der hiPSZ erreicht wurde.

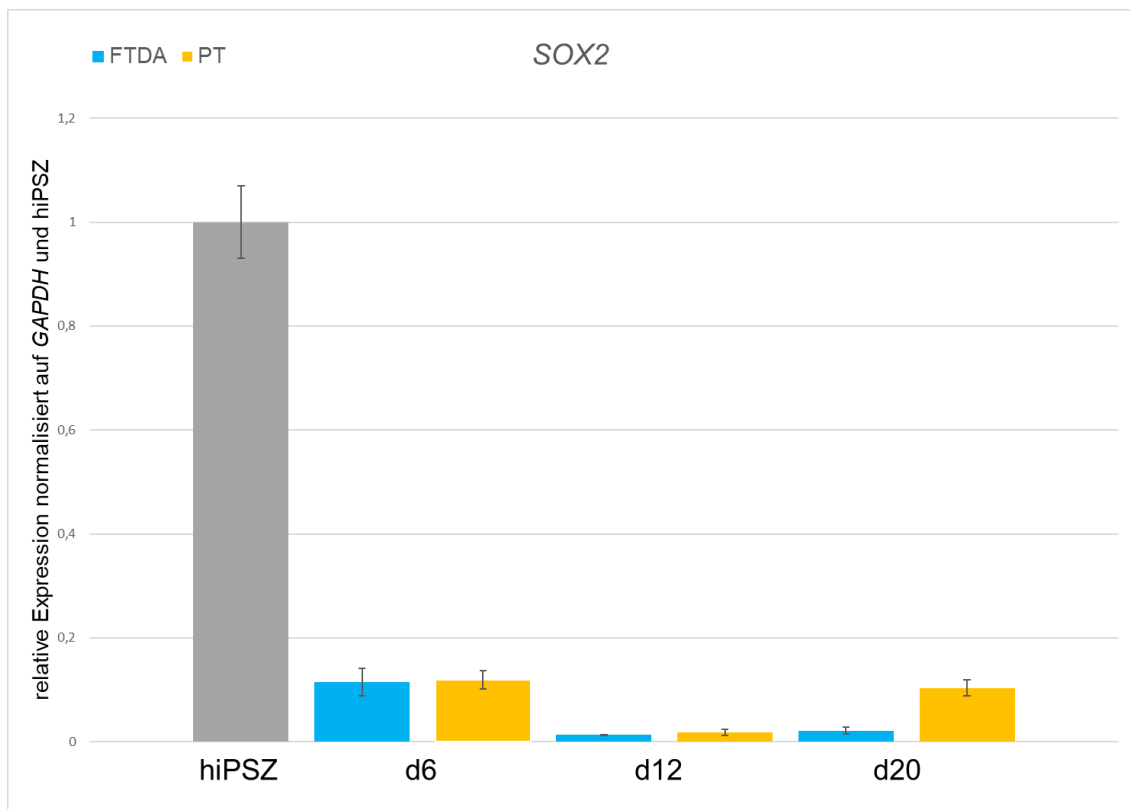


Abbildung 27: SOX2 - Expression der in FTDA und PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von SOX2 in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in FTDA (blau) und PT (gelb) an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf GAPDH und hiPSZ (grau). Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001. Modifiziert nach Klingenstein et al., 2026, Cells Tissues Organs.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur am Tag 12 die Expression von EYA2 im FTDA-Medium statistisch signifikant erhöht war.

Tabelle 13: Expression verschiedener Gene

Die Tabelle zeigt, in welchem der beiden Stammzellmedien die Genexpression zu den jeweiligen Zeitpunkten signifikant höher war. Ein „gleich hoch“ markiert keinen statistisch signifikanten Unterschied, ein roter ↑ steht für eine signifikant höhere Expression im FTDA-Medium gegenüber dem PT-Medium ($P \leq 0,05$).

	<i>SIX1</i>	<i>EYA2</i>	<i>PAX8</i>	<i>ECAD</i>	<i>SOX9</i>	<i>SOX2</i>
Tag 6	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch
Tag 12	gleich hoch	↑	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch
Tag 20	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch	gleich hoch

3.2.7 RNA-Expression der Annexine 1, 2, 4 und 5

Die Abbildung 28 zeigt die Genexpression von *ANXA1*, 2, 4 und 5 in dem verwendeten Stammzellmedium PT an den Tagen 6, 12 und 20. *ANXA2* zeigte an allen Tagen die höchste Expression. *ANXA1* zeigte an allen Tagen die zweithöchste Expression. *ANXA4* zeigte an Tag 12 die niedrigste Expression und *ANXA5* zeigte an Tag 6 und Tag 20 die niedrigste Expression.

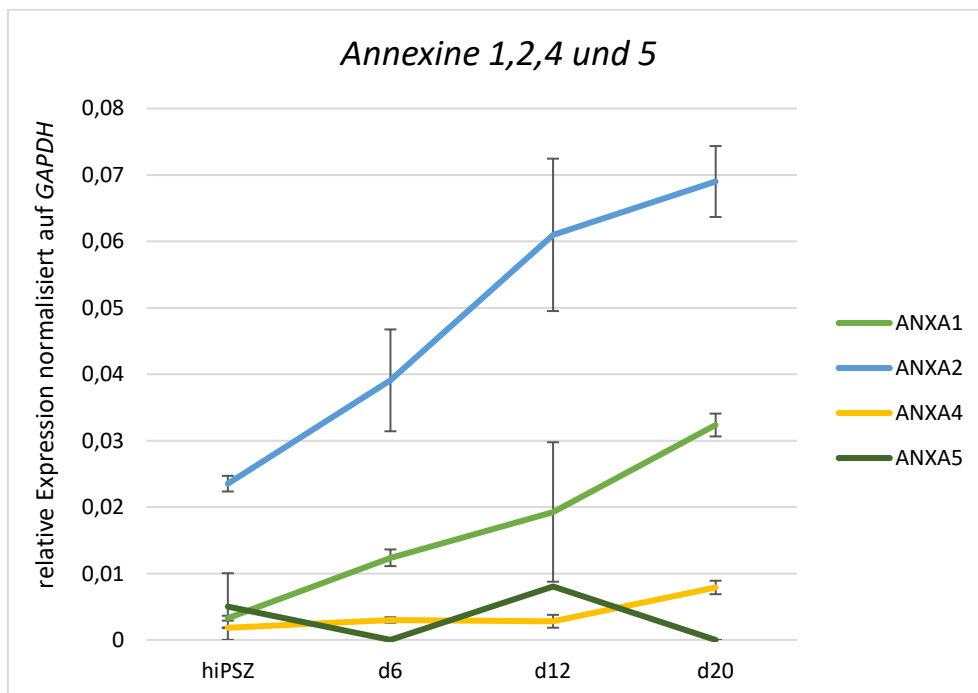


Abbildung 28: *ANXA1,2,4 und 5* - Expression der in PT differenzierten Organoide aus hiPSZ-Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung

RNA-Expression von *ANXA1* (hellgrün), 2 (blau), 4 (gelb) und 5 (dunkelgrün) in Organoiden aus hiPS-Zellen, kultiviert in PT an den Differenzierungstagen 6, 12 und 20. Normalisiert auf *GAPDH* und hiPSZ=1. Fehlerbalken: SEM. Signifikanzen: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

3.3 Annexine und ihre Expression in der frühen otischen Entwicklung

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie die Expression der Annexine A1, A2, A4 und A5 während der frühen otischen Entwicklung von hiPSZ zum Beginn der Bildung der otischen Plakode an Tag 20 analysiert. Hierbei wurden nur noch die Organoide untersucht, bei denen das Stammzellmedium PT eingesetzt wurde, da die vorhergehenden RNA-Analysen gezeigt haben, dass es an Tag 20 eine höhere RNA-Expression eines größeren Anteils der untersuchten Gene in PT differenzierten Organoiden gab. Die Ergebnisse zeigen, dass die vier untersuchten Annexine in dem frühen Differenzierungsstadium an Tag 20 im PT-Medium exprimiert wurden.

3.3.1 Expression von ANXA1

Das Annexin A1 wurde, wie in der Abbildung 29 erkennbar, an Tag 20 der Differenzierung exprimiert. Wie die Abbildung 29 visualisiert, war Annexin A1 überwiegend an der Zellmembran lokalisiert.

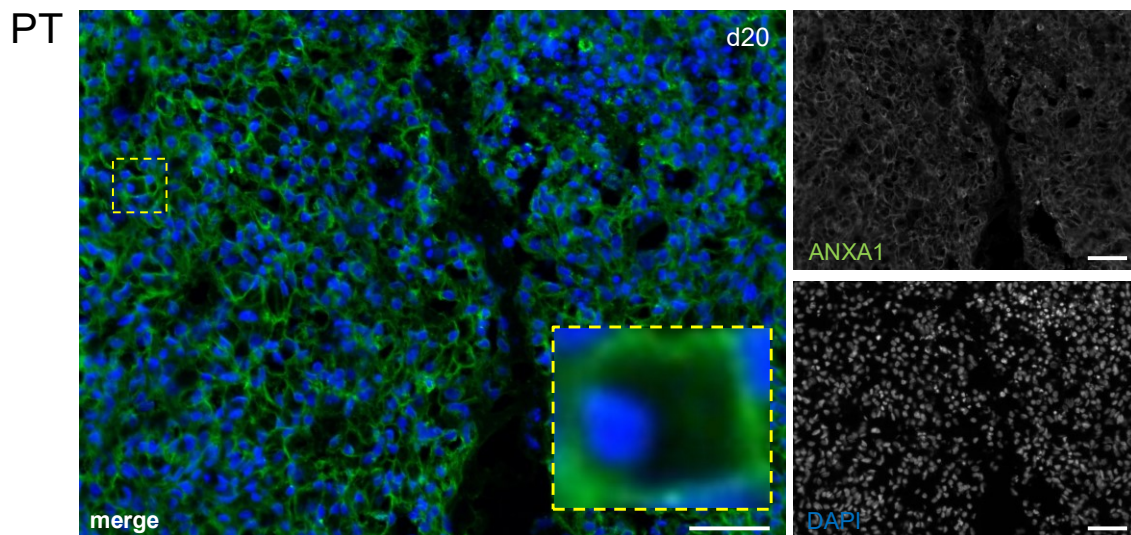


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA1 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. ANXA1 (grün) zeigt eine zellmembranständige

Expression; Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der gelb markierte Bereich wurde digital vergrößert und als Inset dargestellt. Maßstab: 100 µm.

3.3.2 Expression von ANXA2 und ANXA4

Das Annexin A2 zeigte eine Expression an Tag 20, wie in Abbildung 30 ersichtlich ist. Während der Ausbildung der otischen Plakode wies Annexin A2 eine membranständige Lokalisation auf. Weiterhin war eine Expression im Bereich der Zellkontakte erkennbar.

Annexin A4 wurde ebenfalls an Tag 20 exprimiert, zeigte jedoch eine nicht so ausgeprägte Expression wie die Annexine A1, A2 und A5. Die Expression war hier eher im Bereich des Zytoplasmas erkennbar.

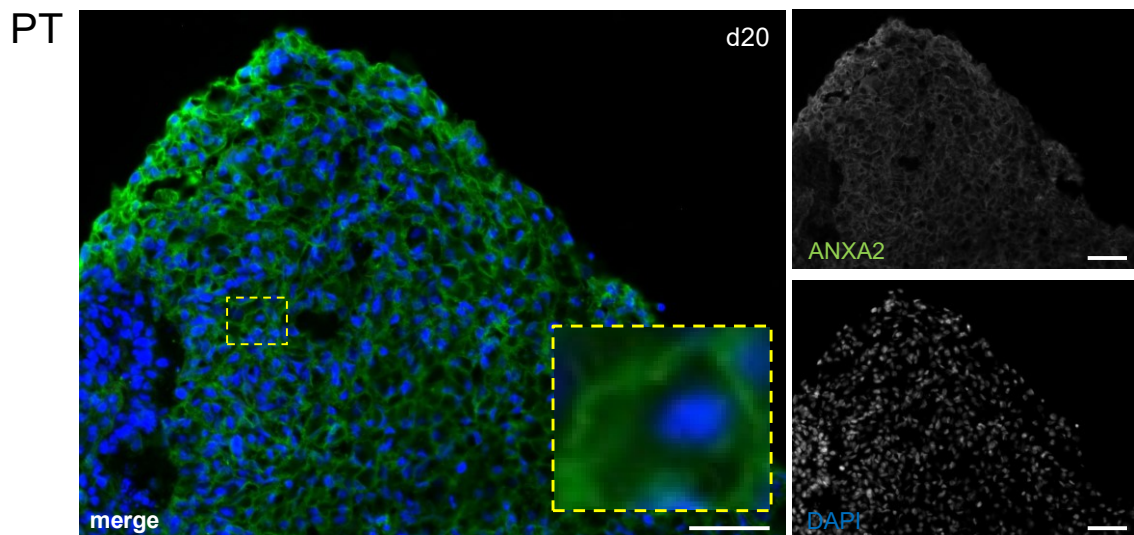


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA2 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. ANXA2 (grün) zeigt eine zellmembranständige Expression; Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der gelb markierte Bereich wurde digital vergrößert und als Inset dargestellt. Maßstab: 100 µm.

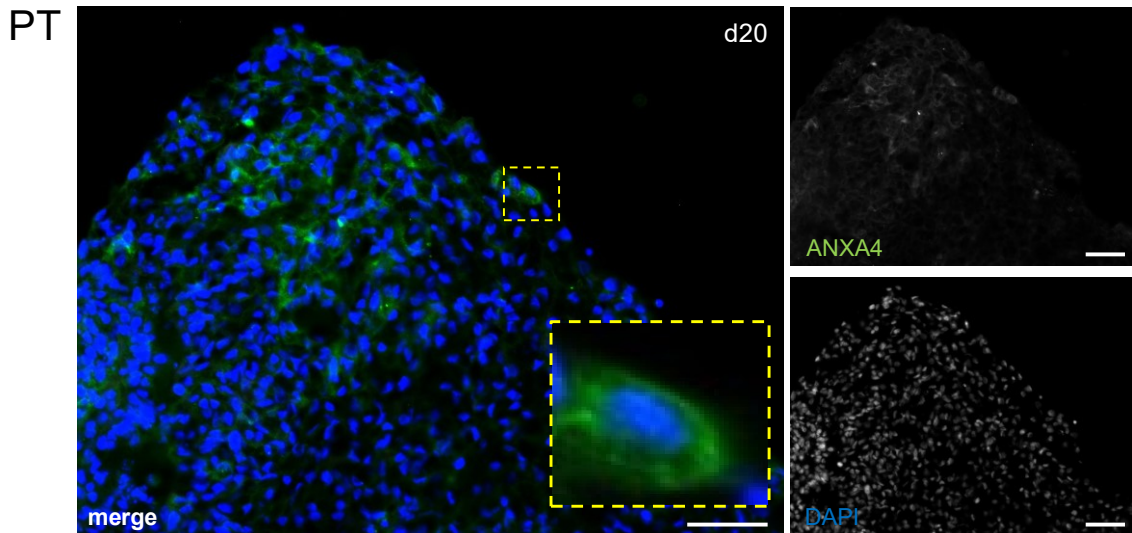


Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA4 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. ANXA4 (grün) zeigt eine Expression im Bereich des Zytoplasmas; Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der gelb markierte Bereich wurde digital vergrößert und als Inset dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

3.3.3 Expression von ANXA5

Zusätzlich zeigte das Annexin A5 an Tag 20 eine Expression wie in Abbildung 32 ersichtlich ist. Wobei die Lokalisation ebenfalls im Bereich des Zytoplasmas erkennbar war.

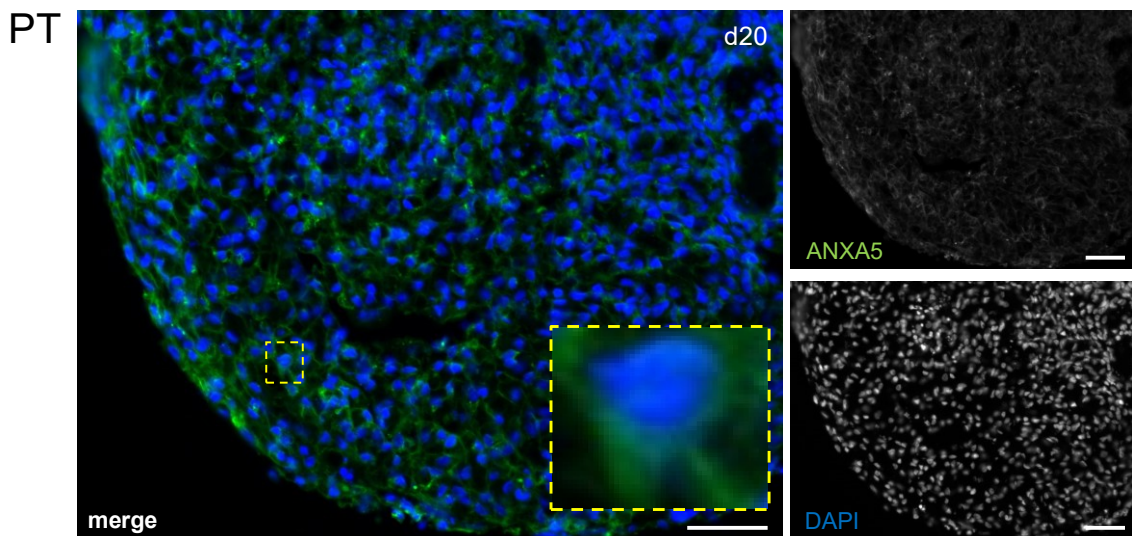


Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung gegen ANXA5 in PT-differenzierten hiPSZ-basierten Organoiden

Immunfluoreszenzfärbung eines otischen Organoids aus hiPS-Zellen, kultiviert im PT-Stammzellmedium. Tag 20 der Differenzierung. ANXA5 (grün) zeigt eine Expression im Bereich des Zytoplasmas; Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der gelb markierte Bereich wurde digital vergrößert und als Inset dargestellt. Maßstab: 100 µm.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie, dass die Annexine A1, A2, A4 und A5 während der frühen otischen Entwicklung exprimiert wurden. Wobei die Lokalisation dabei an Tag 20 der Differenzierung der otischen Organoiden bei den Annexinen A1 und A2 eher im Bereich der Zellmembran und bei den Annexinen A4 und A5 vorwiegend im Bereich des Zytoplasmas lag.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden frühe Zeitpunkte der otischen Entwicklung nach spezifischer Proteinexpression untersucht, wobei zwei unterschiedliche Stammzellmedien hinsichtlich ihrer Eignung zur Kultivierung der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) aus Keratinozyten, sowie deren anschließender Differenzierung in die otische Zelllinie zum Einsatz kamen. Verglichen wurden zwei Medien: das eigens hergestellte Medium FTDA und das kommerziell verfügbare Medium PT der Firma Pepro Tech. Mit beiden Medien war es grundsätzlich möglich die Standardkultivierung durchzuführen.

4.1 Lassen sich in den Organoiden zu frühen Differenzierungszeitpunkten typische Markerproteine der frühen otischen Entwicklung nachweisen?

Die Ergebnisse zeigen, dass beide untersuchten Medien eine gezielte otische Differenzierung ermöglichen, wobei in den Organoiden bereits zu frühen Zeitpunkten Marker wie PAX6 (NE), EYA2/SIX1/SIX4 (PPR) und PAX8/SOX2/SOX9 (otische Plakode) exprimiert wurden. Diese Befunde stehen im Einklang mit aktuellen Studien zur Entwicklung von Innenohr-Organoiden aus humanen pluripotenten Stammzellen, welche ebenfalls eine zeitlich gestaffelte Expression solcher Marker über Differenzierungszeitpunkte hinweg beschreiben (Koehler et al., 2017).

SIX1 ist ein zentraler Transkriptionsfaktor in der PPR. In den Ergebnissen (Abbildung 14 und 15) zeigte sich an Tag 12 in beiden Medien eine Expression von SIX1 in einzelnen Zellen, was auf den Übergang von der PPR zur otischen Plakode hinweist. Auch in der otischen Plakode bleibt SIX1 weiterhin als Marker aktiv. EYA2 ist ein Transkriptions-Koaktivator, welcher in der PPR exprimiert wird (Litsiou et al., 2005b).

Insbesondere SOX2 konnte als früher Indikator für die otische Spezifikation identifiziert werden (van der Valk et al., 2023, Doda et al., 2023, Jeong et al., 2018), sowie auch PAX8 (Doda et al., 2023, Ealy et al., 2016, Lahlou et al., 2018, van der Valk et al., 2025a) was bereits in früheren Arbeiten auch in der Forschung an Mäusen festgestellt werden konnte (Bouchard et al., 2010). SOX2 und PAX8

konnten konsistent während der Ausdifferenzierung in otischen Vesikeln nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass PAX8 im Verlauf der Differenzierung hin zur otischen Plakode verstärkt exprimiert wurde (Doda et al., 2023). Die vorliegenden Ergebnisse (Abbildung 16 und 17) zeigen, dass in beiden untersuchten Medien einige PAX8-positive Zellen gefunden wurden, was hier den Übergang von der PPR zur otischen Plakode bestätigen würde. Insofern bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur bestehende Modelle und frühere Arbeiten, sondern erweitern diese mit vergleichenden Daten zur Medieneffizienz bei der Induktion otischer Vorläufer.

Ein zentraler Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kulturmedien zeigt sich jedoch bei der Expression von SIX4, wobei dieser Marker im PT-Medium eindeutig nachweisbar war, blieb seine Expression im FTDA-Medium hingegen aus. Diese Diskrepanz könnte auf signifikante Unterschiede in den zugrundeliegenden Signalkaskaden der beiden Medien hinweisen, etwa in Bezug auf die Aktivität von FGF-, BMP- oder WNT-Signalen. Diese spielen bekanntermaßen zentrale Rollen in der Induktion der PPR und der otischen Plakode (Nist-Lund et al., 2022). Eine gezielte Analyse der Medienzusammensetzung und ihrer Wirkung auf die relevanten Signalkomponenten wäre daher ein sinnvoller nächster Schritt.

Darüber hinaus untermauern elektrophysiologische Arbeiten an Maus Innenohr-Organoiden, dass eine frühe Markerexpression Korrelationen mit funktional relevanter Entwicklung aufweisen kann, wobei eine Mechanosensitivität in Haarzellen aus Maus Innenohr-Organoiden festgestellt werden konnte, welche jener in Haarzellen postnataler Mäuse entspricht (Liu et al., 2016).

Allerdings bleibt offen, inwieweit die in der frühen Phase exprimierten Marker tatsächlich eine funktionelle Ausreifung otischer Zelltypen einleiten. Die Korrelation zwischen früher Markerexpression und späterer funktioneller Reife ist bisher nicht vollständig geklärt und stellt eine wesentliche Herausforderung in der Organoidforschung dar. In früheren Arbeiten wurden bereits mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik die elektrophysiologischen Eigenschaften der Organoide und der darin enthaltenen Haarzellen getestet (Moore et al., 2023).

Nicht zuletzt ist zu berücksichtigen, dass die hier eingesetzten hiPSZ aus Keratinozyten stammen, was sich auf das Differenzierungspotenzial auswirken kann. Frühere Studien legen nahe, dass der zelluläre Ursprung von hiPS-Zellen epigenetische Prägungen hinterlassen kann (Kim et al., 2010). Diese epigenetische Prägung könnte sich auf die Effizienz und Richtung der Differenzierung auswirken (Kim et al., 2010). Ob und wie stark dies für die otische Differenzierung relevant ist, wäre ein weiterer interessanter Forschungsaspekt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass beide getesteten Medien grundsätzlich zur Induktion einer gerichteten otischen Differenzierung geeignet sind, jedoch Unterschiede in der Expression einzelner Marker aufweisen, die auf medienspezifische Einflüsse hindeuten. Die frühe Expression relevanter Marker belegt den Erfolg der Differenzierung bis zum Plakodenstadium, lässt jedoch noch keine abschließenden Aussagen über die funktionelle Reife der Zellpopulationen zu. Künftige Studien sollten die funktionelle Validierung erweitern und durch gezielte Modulation von Signalkaskaden das Verständnis der Medienwirkung vertiefen.

4.2 Gibt es im Hinblick auf folgende Unterpunkte Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Stammzellmedien?

4.2.1 Morphologie der frühen Organoide

Die Morphologie der frühen Organoide zeigte sich unter beiden Stammzellmedien weitgehend vergleichbar. Bereits an Tag 6 konnten epitheliale Einstülpungen beobachtet werden (Abbildung 12 und 13), die sich bis Tag 20 (Abbildung 20 und 21) fortsetzten. Diese Strukturen deuten morphologisch auf den Beginn der Ohrgrubenbildung hin, einer Vorläuferstruktur des otischen Vesikels (Koehler et al., 2017), aus dem sich in der weiteren Embryonalentwicklung das Innenohr ableitet.

Wie ebenfalls in der Arbeit von Koehler et al. beschrieben, konnten auch in den hier untersuchten Organoiden SOX2-positive Zellen innerhalb dieser Einstülpungen nachgewiesen werden (Abbildung 20 und 21). In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass sich SOX2-positive Zellen im weiteren

Verlauf der Entwicklung hin zu Zellen des Corti Organs entwickeln können (Mak et al., 2009, Mizutari et al., 2013). Diese Ergebnisse lassen sich auch durch weitere frühere Arbeiten stützen, wo ebenfalls ECAD- und SOX2-positive vesikelähnliche Strukturen ersichtlich waren (Jeong et al., 2018). Der Transkriptionsfaktor SOX2 ist ein etablierter Marker für die otische Plakode und spielt eine zentrale Rolle in der weiteren Differenzierung zu Haarzellen und Stützzellen (Steevens et al., 2019, Gou et al., 2018). Das Auftreten SOX2-positiver Zellverbände in den epithelialen Strukturen spricht daher für eine gerichtete otische Differenzierung und bestätigt die Identität der beobachteten Vorläuferstrukturen.

Diese Befunde stützen die Annahme, dass die hier angewandten Differenzierungsprotokolle, sowohl mit dem kommerziellen PT-Medium als auch mit dem selbst hergestellten FTDA-Medium, grundsätzlich geeignet sind um eine morphologisch und molekular nachvollziehbare otische Entwicklung in vitro zu induzieren.

4.2.2 Protein-Expression

In Bezug auf die Expression der untersuchten Markerproteine zeigte sich, dass SIX4 in hiPSZ FTDA nicht detektiert werden konnte (vgl. Tabelle 12), während es in hiPSZ PT gewachsenen Organoiden in vereinzelt Zellen festgestellt werden konnte, welches hier den Beginn der Differenzierung zur PPR markiert (Abbildung 10). Dies könnte auf unterschiedliche Wirkmechanismen der in den Medien enthaltenen Signalfaktoren hinweisen. Auch könnte eine Modulation des WNT-Signalwegs die Expression von SIX4 beeinflussen. Es wurde bereits beschrieben, dass eine Aktivierung des WNT-Signalwegs zu keiner Expression von SIX4 führt und eine Abschwächung eine Expression hervorruft (Litsiou et al., 2005a). Auch frühere Untersuchungen mit Hilfe von Tiermodellen an Mäusen konnten zeigen, dass eine Modulation des WNT-Signalwegs die Differenzierung von Innenohr-Organoiden wesentlich beeinflussen kann (Tang et al., 2023).

Eine stärkere Expression von SOX9 und NCAD wurde ausschließlich an Tag 20 in den hiPSZ PT kultivierten Organoiden beobachtet. Die gemeinsame Expression von SOX9 und NCAD weist hier auf entscheidende otische

Entwicklungsprozesse hin, wobei sich SOX9 positive Zellen im weiteren Verlauf der Entwicklung hin zu Zellen des Corti Organs entwickeln können, wie zum Beispiel Stützzellen. Sie wurden aber auch in der Epithelschicht der Reissner-Membran nachgewiesen (Mak et al., 2009). Die in den Abbildungen 18 und 19 dargestellten Schnittbilder der Organoiden lassen visuelle Unterschiede in der Expression von SOX9 und NCAD zwischen den beiden Stammzellmedien erkennen. In den im PT-Medium kultivierten Organoiden erschien die Expression von SOX9 und NCAD im Vergleich zu den im FTDA-Medium kultivierten Organoiden ausgeprägter. SOX9-positive Zellen traten in räumlicher Nähe zu den NCAD-exprimierenden epithelialen Zellverbänden auf, was auf unterschiedliche, aber benachbarte Zellpopulationen innerhalb der Organoiden hinweist. Da es sich hierbei um einzelne Schnittbilder der Organoiden handelt, erlauben diese Beobachtungen jedoch lediglich eine qualitative Einschätzung und keine quantitative Bewertung. Sie könnten dennoch darauf hindeuten, dass das PT-Medium eine beschleunigte Differenzierung und somit die Ausbildung otischer sowie neuroepithelialer Eigenschaften begünstigt.

Die Analyse der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren in den Organoiden erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung, wobei die Schnittpräparate lediglich einen begrenzten Ausschnitt der Organoiden abbilden. Daher konnten nicht alle Schichten der Organoiden untersucht und nicht alle Zellpopulationen erfasst werden. Somit weist diese Methodik Limitationen auf, die die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen können.

Des Weiteren erschweren unter anderem die komplexe dreidimensionale Architektur der Organoiden, sowie die begrenzte Antikörperpenetration eine gleichmäßige Färbung aller Zellschichten. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzmikroskopie limitiert, wodurch eine eindeutige Abgrenzung membranassoziierter Signale von zytoplasmatischen Strukturen nur eingeschränkt möglich ist. Bei der Fluoreszenzmikroskopie stellt die beugungsbedingte Auflösungsgrenze einen wesentlichen limitierenden Faktor dar (Huang et al., 2009), wodurch eine eindeutige räumliche Trennung membranassoziierter Fluoreszenzsignale von angrenzenden zytoplasmatischen Strukturen nicht möglich ist.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Mehrfachfärbung mit zelltypspezifischen Markern verzichtet, sodass eine eindeutige Zuordnung der Expression der Transkriptionsfaktoren zu einzelnen Zellpopulationen innerhalb der dargestellten Ebene in den Organoiden nicht möglich ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Marker oft in unterschiedlichen Zellen exprimiert wurden, sodass primär Aussagen zur generellen Präsenz und Verteilung der Transkriptionsfaktoren, nicht jedoch zur zelltypspezifischen Expression möglich sind. So konnte keine Koexpression von verschiedenen Markern innerhalb derselben Struktur der Organoide, wie sie beispielsweise für PAX2-, PAX8- und ECAD-positive Zellen beschrieben wurde (Koehler et al., 2017), festgestellt werden. Dies ist eine weitere Limitation, sodass eine klare Abgrenzung der Differenzierungsstadien nicht möglich ist. Für zukünftige Forschungsarbeiten sollten daher zusätzliche spezifische Marker für die jeweiligen Differenzierungsstadien eingesetzt werden, um eine klare Abgrenzung zwischen den Entwicklungsstadien zu erhalten.

Auch bieten sich für zukünftige Untersuchungen verbesserte Analysemethoden an, um diese Fragestellungen weiter zu präzisieren. Dazu zählen insbesondere Mehrfachfärbungen mit etablierten Markern zur Identifizierung bestimmter Zelltypen (wie z.B. Myosin VIIa) in Kombination mit optimierten Protokollen zur Antikörperpenetration sowie der Einsatz höher auflösender bildgebender Verfahren, wie beispielsweise die Super-Resolution-Mikroskopie, die die Darstellung feiner Strukturen über die Grenzen konventioneller Fluoreszenzmikroskopie hinaus ermöglicht. Eine solche systematische quantitative Analyse von Zellen mit Hilfe von Mehrfachfärbungen zur Identifizierung und Differenzierung bestimmter Zelltypen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Dadurch kann hierzu keine Aussage getroffen werden, sodass dies eine Limitation darstellt. Diese Methoden könnten dazu beitragen, sowohl die zelluläre als auch die subzelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren in Organoiden genauer zu charakterisieren.

Abgesehen von diesen Differenzen konnten zwischen den beiden Medien jedoch keine relevanten Unterschiede in der Expression weiterer untersuchter Marker festgestellt werden. Da sich alle übrigen Marker in beiden Gruppen vergleichbar

nachweisen ließen, erscheinen sowohl das selbst hergestellte FTDA-Medium als auch das kommerziell erworbene PT-Medium grundsätzlich für die otische Differenzierung von hiPS-Zellen geeignet. Allerdings kann es zu möglichen Unterschieden in der Effizienz spezifischer Signalwege kommen, die durch weiterführende funktionelle Analysen zu überprüfen wären. Eine parallele Analyse mehrerer Marker zur Unterscheidung der Zelltypen stellt einen wertvollen Ansatz für zukünftige Studien dar, um Übergangszustände und gemischte Differenzierungsstadien innerhalb der Organoide, sowie bestimmte Zellpopulationen präziser zu charakterisieren.

4.2.3 RNA-Expression

In Bezug auf die untersuchten RNA-Expressionsdaten konnte an Tag 6 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verwendeten Stammzellmedien festgestellt werden. Auch an Tag 20 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verwendeten Stammzellmedien (vgl. Tabelle 13). An Tag 12 war lediglich in Bezug auf *EYA2* in hiPSZ eine signifikant höhere Expression im FTDA-Medium festzustellen. Vor diesem Hintergrund ist festzuhalten, dass sich mit Ausnahme des genannten Einzelbefundes keine statistisch signifikanten Hinweise auf Unterschiede hinsichtlich der RNA-Expression zwischen den beiden Stammzellmedien ergeben haben. Die im Folgenden diskutierten Expressionsmuster sind daher primär deskriptiv und hypothesengenerierend zu interpretieren.

PAX8 zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine höhere Expression im FTDA-Medium, wobei diese Unterschiede jedoch in keinem Fall eine statistische Signifikanz aufwiesen. *PAX8* ist ein etablierter Marker für die otische Plakode und spielt eine zentrale Rolle in der frühen otischen Spezifikation (Doda et al., 2023, Ealy et al., 2016, Lahlou et al., 2018).

Im Gegensatz dazu waren andere Marker wie *SIX1*, *SOX2* und *SOX9*, die in späteren Phasen der otischen Differenzierung eine wichtige Funktion übernehmen, in den hiPS-Zellen im PT-Medium stärker exprimiert. Da diese Unterschiede jedoch ebenfalls nicht signifikant waren, erlauben sie keine

belastbare Aussage über unterschiedliche Differenzierungseffizienzen der Medien.

Mögliche Ursachen für die beobachteten, jedoch statistisch nicht abgesicherten Expressionsunterschiede könnten in unterschiedlichen zeitlichen Abläufen der otischen Induktion oder in der unterschiedlichen Zusammensetzung der beiden Medien liegen. Diese Überlegungen bleiben jedoch spekulativ, da keine funktionellen Analysen oder quantitativen Bestimmungen der enthaltenen Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden. Zwar ist bekannt, dass Faktoren wie FGF2 eine Schlüsselrolle bei der Induktion der otischen Plakode spielen (Saeki et al., 2022), jedoch lässt sich aus den vorliegenden Daten kein direkter Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Medien und den gemessenen Expressionswerten ableiten.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor könnte die Herstellungsweise der Medien sein. Während das PT-Medium unter industriellen, standardisierten Bedingungen produziert wird und regelmäßigen Qualitätskontrollen unterliegt, erfolgt die Herstellung des FTDA-Mediums manuell im Labor. Hierdurch sind Chargenvariabilität, Konzentrationsschwankungen oder potenzielle Verunreinigungen nicht auszuschließen. Es wäre daher sinnvoll, die tatsächlichen Konzentrationen kritischer Faktoren wie FGF2, BMP oder TGF β in beiden Medien analytisch zu überprüfen, um die Korrelation mit den Expressionsdaten zu untersuchen. Ohne eine entsprechende analytische Überprüfung der tatsächlichen Konzentrationen relevanter Faktoren bleibt dies jedoch hypothetisch.

Zusammenfassend zeigen die RNA-Analysen, dass sich zwischen den beiden Stammzellmedien lediglich im Fall der Expression von *EYA2* ein signifikanter Unterschied feststellen ließ. Die tendenziell höhere Expression später otischer Marker im PT-Medium könnte auf Unterschiede in der Differenzierungsdynamik hindeuten, ist jedoch aufgrund fehlender statistischer Absicherung zurückhaltend zu interpretieren.

Zukünftige Studien sollten größere Stichproben einbeziehen, um mögliche medienabhängige Effekte valide überprüfen zu können. Zudem wäre es von Interesse, durch gezielte Modulation einzelner Signalwege, wie beispielsweise

durch Aktivierung oder Inhibition von FGF2, BMP, TGF β oder WNT, die beobachteten Ergebnisse zu überprüfen und zu validieren.

4.3 Lassen sich publizierte Vertreter der Annexin Familie in den (frühen) otischen Organoiden nachweisen?

4.3.1 Protein-Expression

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Annexine A1, A2, A4 und A5 während der Differenzierung von hiPS-Zellen in Richtung der otischen Plakode exprimiert wurden. Diese Befunde deuten auf eine mögliche funktionelle Beteiligung dieser Proteine in der frühen otischen Entwicklung hin.

Annexin A1 wurde insbesondere an Tag 20, dem Zeitpunkt der Plakodenbildung, detektiert. Die membranständige Lokalisation von Annexin A1 legt eine Rolle bei der Strukturierung der Plasmamembran und der zellulären Homöostase nahe, welche als Funktion in anderen Geweben bereits beschrieben wurde (Gerke et al., 2024). Da Annexin A1 zudem an antiinflammatorischen Signalwegen beteiligt ist (Kelly et al., 2022), könnte es auch in der Differenzierung stresssensitiver Zelltypen eine Rolle spielen.

Annexin A2 wurde ebenfalls exprimiert und zeigte eine Lokalisation an Zell-Zell-Kontaktstellen, was auf eine Beteiligung an Zelladhäsion und epithelialer Integrität hinweist (Hansen et al., 2002). Diese Eigenschaften sind besonders essenziell für die Organisation von Zellschichten während der Plakodenmorphogenese. Frühere Arbeiten zeigen, dass Annexin A2 mit anderen Proteinen wie z.B. AHNAK Komplexe bildet, bei welchen eine Beteiligung an der Strukturierung und dem Aufbau des Zytoskeletts im Bereich der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Benaud et al., 2004). Die Expression des Proteins ANAHK wurde bereits im Bereich des vaskulären Epithels der Blut-Hirn-Schranke und auch im peripheren Nervensystem vornehmlich in den Schwann-Zellen nachgewiesen (Salim et al., 2009). Ein funktioneller Zusammenhang im otischen Kontext ist denkbar, insbesondere im Hinblick auf die Ausbildung neuronaler oder vaskulärer Strukturen.

Annexin A4 war ebenfalls an Tag 20 nachweisbar und wurde überwiegend im Zytoplasma detektiert. In tierexperimentellen Studien war Annexin A4 hingegen

sowohl in der Zellmembran als auch in den Stereozilien von Haarzellen lokalisiert (Li et al., 2021).

Auch Annexin A5 konnte zum selben Differenzierungszeitpunkt nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, wie bereits bei Annexin A4, eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung. Frühere Arbeiten identifizieren Annexin A5 als das dominierende membranständige Protein in den Haarbündeln der Haarzellen sowohl in Maus- als auch in Hühnermodellen (Krey et al., 2016).

Da für die Annexine A4 und A5 keine eindeutige membranständige Lokalisation beobachtet werden konnte, unterscheiden sich die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit von den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Dies deutet darauf hin, dass die Differenzierung zum untersuchten Zeitpunkt noch nicht weit fortgeschritten war. Zur Darstellung der Stereozilien von Haarzellen wäre eine spezifische Fluoreszenzfärbung erforderlich, beispielsweise mittels Phalloidin für die Bindung an F-Aktin zur Darstellung der Stereozilien, mit Espin (ESPN) als spezifischem Marker ebenfalls für die Darstellung der Stereozilien und mit Myosin VIIA (MYO7A) als zytoplasmatischem Marker für die Haarzellen notwendig. Die zuvor genannten Marker wurden bereits in vergangenen Publikationen, beispielsweise bei Koehler et al. (2017), zur Identifikation von Haarzellen eingesetzt. In der Literatur wird unter anderem eine Expression von Haarzellmarkern ab Tag 40 beschrieben (Koehler et al., 2017). Um eine Expression im Bereich von Haarzellen darstellen zu können, sollten daher spätere Differenzierungszeitpunkte analysiert werden. Zudem ist eine kombinierte Anwendung der genannten Marker erforderlich, um Haarzellen und deren Stereozilien eindeutig zu identifizieren.

Die beobachteten Expressionsmuster deuten darauf hin, dass Annexine im Rahmen der otischen Differenzierung nicht nur als strukturelle Membranproteine, sondern möglicherweise auch im Kontext von Signaltransduktion und Zytoskelettdynamik wirken. So ist bekannt, dass FGF-Aktivierung und gleichzeitige BMP-Inhibition entscheidende Signale zur Plakodenbildung liefern (Koehler et al., 2017). Ob die Expression der Annexine jedoch durch etablierte Signalwege der otischen Induktion wie FGF-Aktivierung und BMP-Inhibition direkt reguliert wird, ist bislang unklar. Das Vorhandensein der Annexine in der

Zellmembran könnte drauf hinweisen, dass sie einen Beitrag zum Aufbau des Zytoskeletts leisten (Tzima et al., 2000). So ist es also denkbar, dass die den Annexinen nachgeschalteten Effektoren die zuvor genannten Signalwege darstellen und zur mechanischen und funktionellen Ausgestaltung otischer Zelltypen beitragen.

Die Analyse der Expression der untersuchten Annexine A1, A2, A4 und A5 in den Organoiden erfolgte, wie bei den Transkriptionsfaktoren, mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die zugrunde liegenden Schnittpräparate repräsentieren auch hier nur ausgewählte Ebenen der dreidimensionalen Struktur der Organoiden, wodurch hier ebenso nicht sämtliche Schichten der Organoiden erfasst werden konnten. Die erhobenen Daten lassen somit ausschließlich eine Beurteilung der jeweils analysierten Schnittebene zu. Dies stellt, wie bei den untersuchten Transkriptionsfaktoren, eine Limitation der Methodik dar.

Die komplexe dreidimensionale Organisation der Organoiden sowie die potenziell eingeschränkte Penetration der Antikörper können auch hier zu einer heterogenen Signalverteilung führen. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben, ist die Fluoreszenzmikroskopie limitiert, wodurch eine eindeutige Abgrenzung membranassoziierter Signale von zytoplasmatischen Strukturen nur eingeschränkt möglich ist. Neben der bereits beschriebenen beugungsbedingten Auflösungsgrenze, wodurch eine eindeutige räumliche Trennung membranassoziierter Fluoreszenzsignale von angrenzenden zytoplasmatischen Strukturen nicht möglich ist, stellt die Punktspreizfunktion einen weiteren limitierenden Faktor dar, der eine Signalverbreiterung der Fluoreszenzabbildung zur Folge hat und somit zu Überlagerungen räumlich benachbarter Strukturen führt. Dies stellt eine mögliche Erklärung dafür dar, dass die membranständige Lokalisation der Annexine in den vorliegenden Schichtaufnahmen nicht klar abgrenzbar ist.

Da wie bei den Versuchen mit den Transkriptionsfaktoren keine Mehrfachfärbung mit zelltypspezifischen Markern durchgeführt wurde, ist eine definitive Zuordnung der Annexin-Expression zu spezifischen Zellpopulationen innerhalb der dargestellten Schnittebene nicht möglich. Die Ergebnisse beschränken sich

folglich auf Aussagen zur allgemeinen Präsenz und subzellulären Verteilung der Annexine, ohne eine eindeutige zelltypspezifische Charakterisierung zu erlauben.

Für weiterführende Analysen könnten auch hier kombinierte Färbestrategien mit etablierten Zelltypmarkern (z. B. ECAD für epitheliale Zellpopulationen) sowie optimierte Protokolle zur Verbesserung der Antikörperpenetration eingesetzt werden. Ebenso könnte auch hier der Einsatz höher auflösender bildgebender Verfahren, beispielsweise der Super-Resolution-Mikroskopie, eine differenziertere Beurteilung subzellulärer Lokalisationen ermöglichen.

Zusammenfassend legen die Daten nahe, dass die Annexine A1, A2, A4 und A5 durch ihre zytoplasmatische und membranständige Lokalisation, sowie ihre bekannten Interaktionen mit dem Zytoskelett einen Beitrag zur frühen morphologischen Entwicklung otischer Strukturen leisten können, etwa durch die Stabilisierung von Zellgrenzen, die Regulation von Zelladhäsion und die Beeinflussung von Differenzierungsprozessen. Funktionelle Studien wären erforderlich, um ihre Rolle in der otischen Entwicklung weiter aufzuklären.

4.3.2 RNA-Expression

Die hohe Expression von *ANXA2* und *ANXA1* könnte im Zusammenhang mit dem zeitlichen Verlauf der otischen Entwicklung stehen, da die von diesen Genen kodierten Proteine bereits im Bereich der Plasmamembran nachgewiesen wurden. Dies spricht dafür, dass diese *Annexine* bereits in frühen Entwicklungsstadien eine Rolle spielen könnten. Im Gegensatz dazu könnte die geringe Expression von *ANXA4* und *ANXA5* darauf hinweisen, dass die Entwicklung noch nicht so weit fortgeschritten ist, dass in den Organoiden bereits Haarzellen entstanden sind. Beide Gene kodieren Proteine, die in früheren Studien spezifisch in Haarbündeln lokalisiert wurden. Diese treten erst in späteren Stadien der otischen Entwicklung auf.

Derzeit existieren keine vergleichbaren Studien, die die Expression dieser untersuchten *Annexine* im Kontext einer frühen otischen Differenzierung beim Menschen *in vitro* systematisch untersucht haben. Ein direkter Vergleich ist daher momentan nicht möglich. Zukünftige Untersuchungen sollten den potenziellen

Einfluss einzelner *Annexin*-Familienmitglieder auf die otische Zellreifung und Morphogenese näher beleuchten, um ein besseres Verständnis ihrer funktionellen Rolle in der humanen Innenohrentwicklung zu ermöglichen.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat den direkten Vergleich zweier unterschiedlicher Stammzellmedien, nämlich des kommerziell erhältlichen PeproGrow™ von PeproTech (PT) und des nach Frank *et al.* (2012) erstmals beschriebenen selbst hergestellten FTDA, geschaffen. Beide Medien zeigten in den durchgeführten Experimenten das Potenzial, die Kultivierung und Expansion humaner induziert pluripotenter Stammzellen (hiPSZ) unter definierten Bedingungen zu unterstützen. Dennoch offenbarten sich Unterschiede im Verlauf, im Hinblick auf die Protein- und RNA-Expression. Ein besonderer Fokus lag zusätzlich auf der otischen Entwicklung, insbesondere auf der Fähigkeit der Medien, die Differenzierung in Richtung otischer Progenitorzellen und entsprechender Zelllinien zu unterstützen. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die spezifische Zusammensetzung der Medien auch einen maßgeblichen Einfluss auf die Qualität und die Effizienz der otischen Differenzierung ausübt.

Im weiteren Verlauf könnten vertiefende molekulare Analysen, etwa durch Transkriptom- oder Proteom-Profiling, dazu beitragen, die durch die unterschiedlichen Mediumkomponenten ausgelösten zellulären Signalwege detaillierter zu verstehen und durch Variation der Medienkomponenten eine Optimierung der Differenzierung zu erhalten.

Besonders interessant wäre hierbei eine systematische Untersuchung der Langzeiteffekte beider Medien in Bezug auf spätere Zeitpunkte in Richtung der otischen Entwicklung.

Zudem wäre es im Sinne der Standardisierung und Reproduzierbarkeit lohnend, das FTDA-Medium weiter zu optimieren und zu validieren. So können selbst hergestellte Medien unter standardisierten Bedingungen eine kostengünstige und zudem gleichwertige Alternative zu kommerziellen Medien darstellen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die frühe otische Entwicklung gezeigt. Ein mögliches Ziel könnte auch sein, ein kostengünstiges, vollständig

definiertes Medium zu etablieren, welches mit den vorhandenen kommerziell erhältlichen Medien hinsichtlich Effizienz und Verfügbarkeit konkurrieren kann. Dabei könnten Variationen einzelner Komponenten (z. B. Konzentrationen von FGF2, TGF β oder Inhibitoren) gezielt getestet werden, um das Medium an unterschiedliche Zelllinien oder experimentelle Fragestellungen anzupassen. Dies wäre vor allem für akademische Forschungseinrichtungen mit geringem Budget und begrenzten Ressourcen vor Ort von Vorteil.

Langfristig könnte die Kombination der beiden Ansätze, also die Verwendung eines standardisierten, kommerziell erhältlichen Basismediums und die Individualisierung mit Hilfe der Variation einzelner modifizierbarer Komponenten neue Wege in der Stammzell-Kultivierung eröffnen. Das könnte auch zu einer Reduktion der Variabilität zwischen den verschiedenen Forschungseinrichtungen führen. So wäre dies nicht nur unter wissenschaftlichen, sondern auch unter translationalen Gesichtspunkten von Bedeutung, etwa im Hinblick auf Good Manufacturing Practice (GMP) konforme Zellkulturen für zukünftige therapeutische Anwendungen. Im Hinblick auf die Erstellung von Krankheitsmodellen ist in Bezug auf die hiPSZ allerdings zu beachten, dass Teile des somatischen Gedächtnisses in den reprogrammierten Zellen persistieren können, was zu einer Beeinflussung führen kann (Avior et al., 2016).

Da in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die frühe otische Entwicklung festgestellt werden konnte, dass beide verwendeten Stammzellmedien für die Kultivierung funktional sind, können auch grundsätzlich beide Stammzellmedien für kommende Forschungsarbeiten Verwendung finden.

Perspektivisch könnten mit Hilfe korrekt abgestimmter Medien standardisierte Protokolle für die optimale Erzeugung von patientenspezifischen otischen Zelltypen entstehen, die sowohl in der Krankheitsmodellierung als auch in zellbasierten Therapieansätzen bei sensorischem Hörverlust Anwendung finden können.

5. Zusammenfassung

Das Ohr vereint das Hör- und Gleichgewichtsorgan, wodurch es zu einem der wichtigsten Sinnesorgane des Körpers zählt. Das Gehör ist dabei von essenzieller Bedeutung für die Sprachentwicklung des Menschen. Des Weiteren ist das Gleichgewichtsorgan verantwortlich für die Aufnahme von Bewegungsreizen und zur Orientierung der Lage des Kopfes im Raum. Die Innenohrschwerhörigkeit zählt weltweit zu dem am häufigsten auftretenden Sinnesverlust. Ursächlich ist dabei, dass die Haarzellen im Corti Organ nicht regenerationsfähig sind und ihre Anzahl begrenzt ist. Zurzeit sind die Behandlungsmöglichkeiten der Innenohrschwerhörigkeit noch begrenzt. Zu den Therapiemöglichkeiten, welche bereits bestehen, gehört unter anderem die Anlage eines Cochleaimplantates. Um die Forschung auf diesem Gebiet voranzubringen, können *in vitro*-Modelle von großem Nutzen sein. Hierfür sind hiPSZ eine bereits etablierte Alternative, wobei ihre Kultivierung mit Hilfe spezialisierter Medien von zentraler Bedeutung ist. Aus hiPSZ können im *in vitro*-Modell organähnliche 3D Organoide erzeugt werden, wodurch ein definierter Zeitraum der Embryonalentwicklung nachempfunden werden kann. So lassen sich hierdurch auch *in vivo*-Studien an Tiermodellen vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle zweier definierter Kulturmedien für Stammzellen und deren Einfluss auf die Kultivierung, sowie den weiteren Verlauf der frühen otischen Entwicklung, genauer untersucht. Die Stammzellmedien werden unter anderem benötigt, damit keine ungerichtete Differenzierung abläuft. Um die Entwicklung darzustellen, wurde ein etabliertes Differenzierungsprotokoll verwendet, womit 3D Organoide erzeugt werden konnten. Zur Generierung der 3D Organoide wurden hiPSZ aus Keratinozyten erzeugt und in zwei verschiedenen Stammzellmedien kultiviert. Hierbei handelt es sich zum einen um das kommerziell erhältliche PeptoGrow™ Medium von PeptoTech und das von Frank *et al.*, 2012 entwickelte, sowie selbst hergestellte FTDA-Medium.

Im Verlauf wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung (Tag 6, 12 und 20) Proben für Immunologische- und RNA-Analysen entnommen. Die Organoide wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung und

Fluoreszenzmikroskopie auf spezifische Proteine der otischen Entwicklung hin untersucht. Die RNA- Analyse erfolgte zur Erfassung der Genexpression.

Ziel der Arbeit war es, zu evaluieren, ob und inwiefern die gezielte Differenzierung in otische Zelllinien durch das jeweilige Stammzellmedium unterstützt und beeinflusst werden kann, inwieweit sich dabei Unterschiede zwischen den Bedingungen zeigen und ob eines der beiden Medien, gegenüber dem anderen, für die otische Differenzierung besser geeignet ist. Beide Medien ermöglichten grundsätzlich die Kultivierung von hiPSZ unter feederfreien Bedingungen. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Progression der otischen Entwicklung. Dabei wurde insbesondere das Expressionsprofil spezifischer Marker analysiert, die für die otische Entwicklung charakteristisch sind (u. a. PAX8, SOX2 und SOX9).

Die Resultate deuten darauf hin, dass die spezifische Zusammensetzung des Mediums einen Einfluss auf die Qualität, sowie auf die Richtung der Differenzierung ausübt. Beide Stammzellmedien zeigten unter optimierten Bedingungen vergleichbare RNA-Expressionswerte und auch vergleichbare morphologische Muster in Bezug auf die Proteinexpression zu den frühen Zeitpunkten an Tag 6, 12 und 20. Lediglich an Tag 12 wurde eine signifikant höhere Expression von *EYA2* im FTDA-Medium festgestellt, wodurch sich hier kein Vorteil eines der Medien gegenüber dem anderen ableiten ließ. Hinsichtlich der Optimierung und Modifizierung bereits bestehender Formulierungen von selbst hergestellten Stammzellmedien, wie z.B. FTDA, kann jedoch ein großes Potenzial für die gezielte Erforschung spezifischer Differenzierungsprozesse, wie z.B. der otischen Differenzierung bestehen.

So liefern diese Ergebnisse wertvolle Hinweise für die Weiterentwicklung kosteneffizienter, leistungsfähiger und optimal abgestimmter Stammzell- und Kulturmedien für die otische Differenzierung.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Verwendete Bücher

Duale Reihe Anatomie. S. 1075 - 1093. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2017.

Taschenlehrbuch Histologie. S. 682 - 686. Lüllmann-Rauch / Asan. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2019.

Physiologie des Menschen. S. 316. Schmidt, Lang, Heckmann. Springer, Würzburg/ Tübingen 2017.

6.2 Verwendete Publikationen

AKOPIAN, V., ANDREWS, P. W., BEIL, S., BENVENISTY, N., BREHM, J., CHRISTIE, M., FORD, A., FOX, V., GOKHALE, P. J., HEALY, L., HOLM, F., HOVATTA, O., KNOWLES, B. B., LUDWIG, T. E., MCKAY, R. D., MIYAZAKI, T., NAKATSUJI, N., OH, S. K., PERA, M. F., ROSSANT, J., STACEY, G. N. & SUEMORI, H. 2010. Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46, 247-58.

ANTHWAL, N., JOSHI, L. & TUCKER, A. S. 2013. Evolution of the mammalian middle ear and jaw: adaptations and novel structures. *J Anat*, 222, 147-60.

ANTHWAL, N. & THOMPSON, H. 2016. The development of the mammalian outer and middle ear. *J Anat*, 228, 217-32.

ASHMORE, J. 2008. Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Physiological Reviews*, 88, 173-210.

AVIOR, Y., SAGI, I. & BENVENISTY, N. 2016. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 170-182.

BAILEY, A. P. & STREIT, A. 2005. Sensory Organs: Making and Breaking the Pre-Placodal Region. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press.

BAKER, C. V. H. & BRONNER-FRASER, M. 2001. Vertebrate Cranial Placodes I. Embryonic Induction. *Developmental Biology*, 232, 1-61.

BENAUD, C., GENTIL, B. J., ASSARD, N., COURT, M., GARIN, J., DELPHIN, C. & BAUDIER, J. 2004. AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol*, 164, 133-44.

- BOUCHARD, M., DE CAPRONA, D., BUSSLINGER, M., XU, P. & FRITZSCH, B. 2010. Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev Biol*, 10, 89.
- CHATTERJEE, S., KRAUS, P. & LUFKIN, T. 2010. A symphony of inner ear developmental control genes. *BMC Genet*, 11, 68.
- CHRISTOPHOROU, N. A., MENDE, M., LLERAS-FORERO, L., GROCCOTT, T. & STREIT, A. 2010. Pax2 coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear. *Dev Biol*, 345, 180-90.
- DE PAEPE, C., KRIVEGA, M., CAUFFMAN, G., GEENS, M. & VAN DE VELDE, H. 2014. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Molecular Human Reproduction*, 20, 599-618.
- DE ROBERTIS, E. M. & KURODA, H. 2004. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 285-308.
- DILLARD, L. K., PINTO, A., MUELLER, K. D., SCHUBERT, C. R., PAULSEN, A. J., MERTEN, N., FISCHER, M. E., TWEED, T. S. & CRUICKSHANKS, K. J. 2023. Associations of Hearing Loss and Hearing Aid Use With Cognition, Health-Related Quality of Life, and Depressive Symptoms. *J Aging Health*, 35, 455-465.
- DODA, D., ALONSO JIMENEZ, S., REHRAUER, H., CARREÑO, J. F., VALSAMIDES, V., DI SANTO, S., WIDMER, H. R., EDGE, A., LOCHER, H., VAN DER VALK, W. H., ZHANG, J., KOEHLER, K. R. & ROCCIO, M. 2023. Human pluripotent stem cell-derived inner ear organoids recapitulate otic development in vitro. *Development*, 150.
- EALY, M., ELLWANGER, D. C., KOSARIC, N., STAPPER, A. P. & HELLER, S. 2016. Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 8508-8513.
- FEKETE, D. M. 2009. Cochlear Development. In: SQUIRE, L. R. (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press.
- FONG, H., HOHENSTEIN, K. A. & DONOVAN, P. J. 2008. Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26, 1931-1938.
- FRANK, S., ZHANG, M., SCHÖLER, H. R. & GREBER, B. 2012. Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PLoS One*, 7, e41958.
- GADHVI, M. & WASEEM, M. 2020. Physiology, Sensory System. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
StatPearls Publishing LLC.
- GANS, C. & NORTHCUTT, R. G. 1983. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science*, 220, 268-73.
- GÉLÉOC, G. S. & HOLT, J. R. 2014. Sound strategies for hearing restoration. *Science*, 344, 1241062.
- GERKE, V., GAVINS, F. N. E., GEISOW, M., GREWAL, T., JAISWAL, J. K., NYLANDSTED, J. & RESCHER, U. 2024. Annexins—a family of proteins with distinctive tastes for cell signaling and membrane dynamics. *Nature Communications*, 15, 1574.

- GOU, Y., VEMARAJU, S., SWEET, E. M., KWON, H.-J. & RILEY, B. B. 2018. *sox2* and *sox3* Play unique roles in development of hair cells and neurons in the zebrafish inner ear. *Developmental Biology*, 435, 73-83.
- GRAYDON, K., WATERWORTH, C., MILLER, H. & GUNASEKERA, H. 2019. Global burden of hearing impairment and ear disease. *The Journal of Laryngology & Otology*, 133, 18-25.
- GROVES, A. K. & LABONNE, C. 2014. Setting appropriate boundaries: Fate, patterning and competence at the neural plate border. *Developmental Biology*, 389, 2-12.
- HAILE, L. M., KAMENOV, K., BRIANT, P. S., ORJI, A. U., STEINMETZ, J. D., ABDOLI, A., ABDOLLAHI, M., ABU-GHARBIEH, E., AFSHIN, A., AHMED, H., AHMED RASHID, T., AKALU, Y., ALAHDAB, F., ALANEZI, F. M., ALANZI, T. M., AL HAMAD, H., ALI, L., ALIPOUR, V., AL-RADDADI, R. M., AMU, H., ARABLOO, J., ARAB-ZOZANI, M., ARULAPPAN, J., ASHBAUGH, C., ATNAFU, D. D., BABAR, Z.-U.-D., BAIG, A. A., BANIK, P. C., BÄRNIGHAUSEN, T. W., BARROW, A., BENDER, R. G., BHAGAVATHULA, A. S., BHARDWAJ, N., BHARDWAJ, P., BIBI, S., BIJANI, A., BURKART, K., CEDERROTH, C. R., CHARAN, J., CHOUDHARI, S. G., CHU, D.-T., COUTO, R. A. S., DAGNEW, A. B., DAGNEW, B., DAHLAWI, S. M. A., DAI, X., DANDONA, L., DANDONA, R., DESALEW, A., DHAMNETIYA, D., DHIMAL, M. L., DHIMAL, M., DOYLE, K. E., DUNCAN, B. B., EKHOLUENETALE, M., FILIP, I., FISCHER, F., FRANKLIN, R. C., GAIDHANE, A. M., GAIDHANE, S., GALLUS, S., GHAMARI, F., GHASHGHAE, A., GHOZALI, G., GILANI, S. A., GLAVAN, I.-R., GOLECHHA, M., GOULART, B. N. G., GUPTA, V. B., GUPTA, V. K., HAMIDI, S., HAMMOND, B. R., HAY, S. I., HAYAT, K., HEIDARI, G., HOFFMAN, H. J., HOPF, K. P., HOSSEINZADEH, M., HOUSEH, M., HUSSAIN, R., HWANG, B.-F., IAVICOLI, I., IBITOYE, S. E., ILESANMI, O. S., IRVANI, S. S. N., ISLAM, S. M. S., IWAGAMI, M., JACOB, L., JAYAPAL, S. K., JHA, R. P., JONAS, J. B., KALHOR, R., KAMERAN AL-SALIHI, N., KANDEL, H., KASA, A. S., KAYODE, G. A., KHALILOV, R., KHAN, E. A., KHATIB, M. N., KOSEN, S., et al. 2021. Hearing loss prevalence and years lived with disability, 1990–2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 397, 996-1009.
- HANSEN, M. D., EHRLICH, J. S. & NELSON, W. J. 2002. Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *J Biol Chem*, 277, 45371-6.
- HAYES, M. J., RESCHER, U., GERKE, V. & MOSS, S. E. 2004. Annexin-actin interactions. *Traffic*, 5, 571-6.
- HEPPER, P. G. & SHAHIDULLAH, B. S. 1994. Development of fetal hearing. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 71, F81-7.
- HU, J., CHEN, L., RUAN, J. & CHEN, X. 2024. The role of the annexin A protein family at the maternal-fetal interface. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 15, 1314214.
- HUANG, B., BATES, M. & ZHUANG, X. 2009. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem*, 78, 993-1016.

- ISHIUCHI, T. & TORRES-PADILLA, M. E. 2013. Towards an understanding of the regulatory mechanisms of totipotency. *Curr Opin Genet Dev*, 23, 512-8.
- ITO, K. & SUDA, T. 2014. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 243-256.
- JACOBSON, A. G. 1966. Inductive Processes in Embryonic Development. *Science*, 152, 25-34.
- JAENISCH, R. 2004. Human Cloning — The Science and Ethics of Nuclear Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 351, 2787-2791.
- JEONG, M., O'REILLY, M., KIRKWOOD, N. K., AL-AAMA, J., LAKO, M., KROS, C. J. & ARMSTRONG, L. 2018. Generating inner ear organoids containing putative cochlear hair cells from human pluripotent stem cells. *Cell Death & Disease*, 9, 922.
- KALINEC, F., WEBSTER, P., MARICLE, A., GUERRERO, D., CHAKRAVARTI, D. N., CHAKRAVARTI, B., GELLIBOLIAN, R. & KALINEC, G. 2009. Glucocorticoid-stimulated, transcription-independent release of annexin A1 by cochlear Hensen cells. *Br J Pharmacol*, 158, 1820-34.
- KELLY, L., MCGRATH, S., RODGERS, L., MCCALL, K., TULUNAY VIRLAN, A., DEMPSEY, F., CRICHTON, S. & GOODYEAR, C. S. 2022. Annexin-A1: The culprit or the solution? *Immunology*, 166, 2-16.
- KIM, K., DOI, A., WEN, B., NG, K., ZHAO, R., CAHAN, P., KIM, J., ARYEE, M. J., JI, H., EHRLICH, L. I. R., YABUUCHI, A., TAKEUCHI, A., CUNNIFF, K. C., HONGGUANG, H., MCKINNEY-FREEMAN, S., NAVEIRAS, O., YOON, T. J., IRIZARRY, R. A., JUNG, N., SEITA, J., HANNA, J., MURAKAMI, P., JAENISCH, R., WEISSLEDER, R., ORKIN, S. H., WEISSMAN, I. L., FEINBERG, A. P. & DALEY, G. Q. 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467, 285-290.
- KLINGENSTEIN, S., HOLLWEG, N., LIEBAU, S. & KLINGENSTEIN, M. 2026. Media Comparisons for the Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into the Otic Lineage. *Cells Tissues Organs*, 1-17.
- KLINGENSTEIN, S., KLINGENSTEIN, M., LIEBAU, S. & LINTA, L. 2014. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem cells international*, 2014, 768391.
- KOEHLER, K. R. & HASHINO, E. 2014. 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids. *Nat Protoc*, 9, 1229-44.
- KOEHLER, K. R., NIE, J., LONGWORTH-MILLS, E., LIU, X. P., LEE, J., HOLT, J. R. & HASHINO, E. 2017. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 35, 583-589.
- KOTBY, M. N., TAWFIK, S., AZIZ, A. & TAHA, H. 2008. Public Health Impact of Hearing Impairment and Disability. *Folia Phoniatrica et Logopaedica*, 60, 58-63.
- KREY, J. F., DRUMMOND, M., FOSTER, S., PORSOV, E., VIJAYAKUMAR, S., CHOI, D., FRIDERICI, K., JONES, S. M., NUTTALL, A. L. & BARR-GILLESPIE, P. G. 2016. Annexin A5 is the Most Abundant Membrane-Associated Protein in Stereocilia but is Dispensable for Hair-Bundle Development and Function. *Sci Rep*, 6, 27221.

- KURIHARA, S., FUJIOKA, M., HIRABAYASHI, M., YOSHIDA, T., HOSOYA, M., NAGASE, M., KATO, F., OGAWA, K., OKANO, H., KOJIMA, H. & OKANO, H. J. 2022. Otic Organoids Containing Spiral Ganglion Neuron-like Cells Derived from Human-induced Pluripotent Stem Cells as a Model of Drug-induced Neuropathy. *Stem Cells Transl Med*, 11, 282-296.
- LAHLOU, H., LOPEZ-JUAREZ, A., FONTBONNE, A., NIVET, E. & ZINE, A. 2018. Modeling human early otic sensory cell development with induced pluripotent stem cells. *PLOS ONE*, 13, e0198954.
- LI, N., XI, Y., DU, H., ZHOU, H. & XU, Z. 2021. Annexin A4 Is Dispensable for Hair Cell Development and Function. *Front Cell Dev Biol*, 9, 680155.
- LITSIOU, A., HANSON, S. & STREIT, A. 2005a. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development*, 132, 4051-62.
- LITSIOU, A., HANSON, S. & STREIT, A. 2005b. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development*, 132, 4051-4062.
- LIU, X.-P., KOEHLER, K. R., MIKOSZ, A. M., HASHINO, E. & HOLT, J. R. 2016. Functional development of mechanosensitive hair cells in stem cell-derived organoids parallels native vestibular hair cells. *Nature Communications*, 7, 11508.
- MAK, A. C., SZETO, I. Y., FRITZSCH, B. & CHEAH, K. S. 2009. Differential and overlapping expression pattern of SOX2 and SOX9 in inner ear development. *Gene Expr Patterns*, 9, 444-53.
- MATSUO-TAKASAKI, M., MATSUMURA, M. & SASAI, Y. 2005. An essential role of *Xenopus* Foxi1a for ventral specification of the cephalic ectoderm during gastrulation. *Development*, 132, 3885-3894.
- MATTEI, C., LIM, R., DRURY, H., NASR, B., LI, Z., TADROS, M. A., D'ABACO, G. M., STOK, K. S., NAYAGAM, B. A. & DOTTORI, M. 2019. Generation of Vestibular Tissue-Like Organoids From Human Pluripotent Stem Cells Using the Rotary Cell Culture System. *Front Cell Dev Biol*, 7, 25.
- MAYANI, H. 2003. A Glance into Somatic Stem Cell Biology: Basic Principles, New Concepts, and Clinical Relevance. *Archives of Medical Research*, 34, 3-15.
- MIETH, D. 2000. Going to the roots of the stem cell debate. The ethical problems of using embryos for research. *EMBO Rep*, 1, 4-6.
- MIZUTARI, K., FUJIOKA, M., HOSOYA, M., BRAMHALL, N., OKANO, H. J., OKANO, H. & EDGE, A. S. 2013. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron*, 77, 58-69.
- MOODY, S. A. & LAMANTIA, A. S. 2015. Transcriptional regulation of cranial sensory placode development. *Curr Top Dev Biol*, 111, 301-50.
- MOORE, S. T., NAKAMURA, T., NIE, J., SOLIVALS, A. J., ARISTIZÁBAL-RAMÍREZ, I., UEDA, Y., MANIKANDAN, M., REDDY, V. S., ROMANO, D. R., HOFFMAN, J. R., PERRIN, B. J., NELSON, R. F., FROLENKOV, G. I., CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. & HASHINO, E. 2023. Generating high-fidelity cochlear organoids from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 30, 950-961.e7.

- NAPLES, J. G. & RUCKENSTEIN, M. J. 2020. Cochlear Implant. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 53, 87-102.
- 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.
- NIST-LUND, C., KIM, J. & KOEHLER, K. R. 2022. Advancements in inner ear development, regeneration, and repair through otic organoids. *Curr Opin Genet Dev*, 76, 101954.
- OHNISHI, H., SKERLEVA, D., KITAJIRI, S.-I., SAKAMOTO, T., YAMAMOTO, N., ITO, J. & NAKAGAWA, T. 2015. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neuroscience Letters*, 599, 49-54.
- OHYAMA, T., GROVES, A. K. & MARTIN, K. 2007. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int J Dev Biol*, 51, 463-72.
- OLUSANYA, B. O., NEUMANN, K. J. & SAUNDERS, J. E. 2014. The global burden of disabling hearing impairment: a call to action. *Bull World Health Organ*, 92, 367-73.
- PAGEL, M. 2017. Q&A: What is human language, when did it evolve and why should we care? *BMC Biol*, 15, 64.
- PANDUR, P. D. & MOODY, S. A. 2000. Xenopus Six1 gene is expressed in neurogenic cranial placodes and maintained in the differentiating lateral lines. *Mechanisms of Development*, 96, 253-257.
- PARK, I.-H., ARORA, N., HUO, H., MAHERALI, N., AHFELDT, T., SHIMAMURA, A., LENSCH, M. W., COWAN, C., HOCHEDLINGER, K. & DALEY, G. Q. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 134, 877-886.
- PASSIER, R. & MUMMERY, C. 2003. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research*, 58, 324-335.
- PATRICK, A. N., CABRERA, J. H., SMITH, A. L., CHEN, X. S., FORD, H. L. & ZHAO, R. 2013. Structure-function analyses of the human SIX1-EYA2 complex reveal insights into metastasis and BOR syndrome. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 447-53.
- PEPROTECH, S. G. 2017. *PeproTech Cell Culture Media PeproGrow* [Online]. SubioScience GmbH / PeproTech Available: https://www.lubio.ch/assets/PDFs/Peprotech_PeproGrow_media_brochure.pdf [Accessed 22.06.2025].
- PEPROTECH, T. A.-I. 2016. *Animal-Free Products* [Online]. TriChem ApS - interkemi / PeproTech. Available: https://trichem.dk/CustomData/Files/Folders/7-pdf/67_animal-free.pdf [Accessed 25.06.2025].
- QUERLEU, D., RENARD, X., VERSYP, F., PARIS-DELRUE, L. & CRÈPIN, G. 1988. Fetal hearing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 28, 191-212.
- RESCHER, U. & GERKE, V. 2004. Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of Cell Science*, 117, 2631-2639.

- REUBINOFF, B. E., PERA, M. F., FONG, C.-Y., TROUNSON, A. & BONGSO, A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, 18, 399-404.
- RIDDIFORD, N. & SCHLOSSER, G. 2017. Six1 and Eya1 both promote and arrest neuronal differentiation by activating multiple Notch pathway genes. *Developmental Biology*, 431, 152-167.
- SAEKI, T., YOSHIMATSU, S., ISHIKAWA, M., HON, C. C., KOYA, I., SHIBATA, S., HOSOYA, M., SAEGUSA, C., OGAWA, K., SHIN, J. W., FUJIOKA, M. & OKANO, H. 2022. Critical roles of FGF, RA, and WNT signalling in the development of the human otic placode and subsequent lineages in a dish. *Regen Ther*, 20, 165-186.
- SAINT-JEANNET, J. P. & MOODY, S. A. 2014. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Dev Biol*, 389, 13-27.
- SALIM, C., BOXBERG, Y. V., ALTERIO, J., FÉRÉOL, S. & NOTHIAS, F. 2009. The giant protein AHNAK involved in morphogenesis and laminin substrate adhesion of myelinating Schwann cells. *Glia*, 57, 535-49.
- SCHLOSSER, G. 2010. Making sense development of vertebrate cranial placodes. *Int Rev Cell Mol Biol*, 283, 129-234.
- SHEIKH, M. H. & SOLITO, E. 2018. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *Int J Mol Sci*, 19.
- SMITH-CORTINEZ, N., TAN, A. K., STOKROOS, R. J., VERSNEL, H. & STRAATMAN, L. V. 2023. Regeneration of Hair Cells from Endogenous Otic Progenitors in the Adult Mammalian Cochlea: Understanding Its Origins and Future Directions. *Int J Mol Sci*, 24.
- STEEVENS, A. R., GLATZER, J. C., KELLOGG, C. C., LOW, W. C., SANTI, P. A. & KIERNAN, A. E. 2019. SOX2 is required for inner ear growth and cochlear nonsensory formation before sensory development. *Development*, 146.
- STERN, C. D. 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development*, 132, 2007-2021.
- STREIT, A. 2002. Extensive cell movements accompany formation of the otic placode. *Dev Biol*, 249, 237-54.
- STREIT, A. 2004. Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Developmental Biology*, 276, 1-15.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007a. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007b. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131, 861-872.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126, 663-676.
- TANG, P. C., CHEN, L., SINGH, S., GROVES, A. K., KOEHLER, K. R., LIU, X. Z. & NELSON, R. F. 2023. Early Wnt Signaling Activation Promotes

- Inner Ear Differentiation via Cell Caudalization in Mouse Stem Cell-Derived Organoids. *Stem Cells*, 41, 26-38.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- TORRES, M. & GIRÁLDEZ, F. 1998. The development of the vertebrate inner ear. *Mechanisms of Development*, 71, 5-21.
- TZIMA, E., TROTTER, P. J., ORCHARD, M. A. & WALKER, J. H. 2000. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4720-4730.
- VAN DER VALK, W. H., NIST-LUND, C., ZHANG, J., PEREA, C., JIN, J., GIM, K. Y., STEINHART, M. R., LEE, J. & KOEHLER, K. R. 2025a. Generation and characterization of vestibular inner ear organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*.
- VAN DER VALK, W. H., NIST-LUND, C., ZHANG, J., PEREA, C., JIN, J., GIM, K. Y., STEINHART, M. R., LEE, J. & KOEHLER, K. R. 2025b. Generation and characterization of vestibular inner ear organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*.
- VAN DER VALK, W. H., VAN BEELEN, E. S. A., STEINHART, M. R., NIST-LUND, C., OSORIO, D., DE GROOT, J., SUN, L., VAN BENTHEM, P. P. G., KOEHLER, K. R. & LOCHER, H. 2023. A single-cell level comparison of human inner ear organoids with the human cochlea and vestibular organs. *Cell Rep*, 42, 112623.
- VON KUPFFER, C. 1891. The development of the cranial nerves of vertebrates. *Journal of Comparative Neurology*, 1, 246-264.
- WEBB, J. F. & NODEN, D. M. 1993. Ectodermal Placodes: Contributions to the Development of the Vertebrate Head. *American Zoologist*, 33, 434-447.
- WERT, G. D. & MUMMERY, C. 2003. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Human Reproduction*, 18, 672-682.
- WHO. 2025. *Deafness and hearing loss* [Online]. <https://www.who.int/>: World Health Organization. Available: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss?utm_source=chatgpt.com [Accessed 13.02.2026].
- YU, J., VODYANIK, M. A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J. L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G. A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, II & THOMSON, J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- ZHANG, X., HUANG, C. T., CHEN, J., PANKRATZ, M. T., XI, J., LI, J., YANG, Y., LAVAUTE, T. M., LI, X. J., AYALA, M., BONDARENKO, G. I., DU, Z. W., JIN, Y., GOLOS, T. G. & ZHANG, S. C. 2010. Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell*, 7, 90-100.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die zur Promotion eingereichte Dissertation mit folgendem Titel:

„Otsche Differenzierung humaner iPS-Zellen: Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf Markerexpression und Entwicklung“

selbständig verfasst und keine anderen angegebenen Hilfsmittel, sowie nur die angegebenen Quellen verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Liebau als Doktorvater und Frau Dr. Klingenstein als Betreuerin im Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Klingenstein von mir persönlich durchgeführt. Die qRT-PCR-Experimente am Fluidigm-System wurden von der technischen Mitarbeiterin Frau Conrad durchgeführt, die Datenanalyse erfolgte durch Frau Dr. Klingenstein und die abschließende Auswertung, sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte durch mich persönlich. Des Weiteren wurde die Abbildung 1. mit dem Programm BioRender erstellt. Zur Überprüfung von Rechtschreibung und Grammatik kam das Programm ChatGPT Version 4o zur Anwendung. Ich versichere, dass ich den Output des KI-Tools ChatGPT sorgfältig geprüft und angepasst habe, bevor ich vorgeschlagene Änderungen in das Manuskript aufgenommen habe.

Teile der in dieser Dissertation dargestellten Datensätze wurden in der Publikation Klingenstein et al., 2026 (Cells Tissues Organs) veröffentlicht, an der ich als Koautor beteiligt war. Es wurden keine Textpassagen aus dieser Publikation wörtlich übernommen. Einzelne Abbildungen und Tabellen dieser Arbeit entsprechen inhaltlich Darstellungen aus der genannten Publikation oder wurden daraus modifiziert übernommen. Die Verwendung erfolgt mit entsprechender Quellenangabe in den jeweiligen Legenden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen, Auswertungen und Interpretationen wurden eigenständig im Rahmen des Promotionsprojektes erarbeitet.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben der Wahrheit entsprechen und dass ich nichts verschwiegen habe. Weiterhin versichere ich, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem Promotionsverfahren eingereicht habe und in keinem anderen, sowie dass diesem Promotionsverfahren keine gescheiterten Verfahren vorausgegangen sind.

Tübingen, den 28.02.2026

Nils Hollweg

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. Stefan Liebau aussprechen, welcher mir als Doktorvater die Möglichkeit gegeben hat, am Institut für Neuroanatomie & Entwicklungsbiologie zu promovieren. Er war jederzeit für einen wissenschaftlichen Diskurs erreichbar und hat mich trotz meiner länger andauernden Forschungszeit immer hervorragend unterstützt.

Zudem geht ein großer Dank an Frau Dr. Stefanie Klingenstein, die mich während der gesamten Forschungszeit im Institut als Betreuerin begleitet und stets bestens betreut hat. Sie war jederzeit erreichbar, ich konnte Ihr alle Fragen stellen und auch jegliche Probleme mit Ihr besprechen.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Ellen Reisinger, die sich als zweite Berichterstatteerin angeboten hat, um die Dissertation zu bewerten.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe und des Instituts, mit denen ich Zeit bei den Forschungsarbeiten und Besprechungen verbracht habe. Zudem möchte ich Frau Sabine Conrad meinen Dank aussprechen, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir allzeit den Rücken freigehalten haben, sodass ich die Zeit zum wissenschaftlichen Arbeiten und zur Vollendung dieser Dissertation nutzen konnte.

Abschließend möchte ich allen danken, durch die ich unterstützt wurde und die mir immer Kraft und Mut zugesprochen haben.