

Die Regulation und Stimulation des Neuritenwachstums im
Spiralganglion der Mauscochlea durch neurotrophe
Faktoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Kramer, Benedikt Marcus Richard Ferdinand Leo

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Löwenheim

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ueffing

„Nicht sehen können heißt, die Menschen von den Dingen trennen, nicht hören können heißt, die Menschen von den Menschen trennen.“

- Immanuel Kant (1724 – 1804) -

INHALTSVERZEICHNIS

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 Gehörlosigkeit und Cochlea-Implantate	1
1.2 Stand der Forschung.....	2
1.2.1 Aufbau und Funktion eines Cochlea-Implantats	2
1.2.2 Entwicklung der CI-Technologie bis heute	4
1.2.3 Technische Grenzen von Cochlea-Implantaten.....	5
1.2.4 Mögliche Lösungsansätze für die Weiterentwicklung der bestehenden CI- Technologie.....	8
1.3 Neurotrophine und neurotrophe Rezeptoren in der Cochlea.....	11
1.3.1 Neurotrophe Rezeptoren	13
1.3.2 Die Familie der Trk-Rezeptoren.....	13
1.4 Ziel der Arbeit.....	21
1.4.1 Regulation des Neuritenwachstums	21
1.4.2 Inhibitorisches Umfeld	23
1.4.3 Stimulation des Neuritenwachstums.....	23
2 Methoden.....	26
2.1 Zur Organentnahme verwendete Tiere	26
2.2 Anatomische Präparation des Ganglion spirale	26
2.2.1 Explantation der Cochleae	26
2.2.2 Feinpräparation des Ganglion spirale.....	27
2.3 Organtypische Spiralganglionzellkultur	28
2.4 Fixierung der Organkulturen	28
2.5 Immunfluoreszenzfärbung der Explantate.....	29
2.6 Mikroskopie.....	30
2.7 Auswertung der Neuritenlänge.....	31
2.7.1 Bildbearbeitung mit ImageJ	32

INHALTSVERZEICHNIS

2.7.2 Adaptierte Sholl-Analyse	33
2.8 Statistische Auswertung.....	36
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Allgemeines Wachstumsverhalten und Morphologie.....	38
3.2 Wachstumsverhalten unter Stimulation mit BDNF	39
3.2.1 BDNF Zeitabhängigkeit	39
3.2.2 BDNF Dosisabhängigkeit	40
3.2.3 Vergleich des Neuritenwachstums in unterschiedlichen Windungen des Spiralganglions	41
3.3.1 Tyrosinkinaseinhibitor K252a	43
3.3.2 PKA-Inhibitor H-89.....	45
3.3.3 PKA-Inhibitor KT5720.....	46
3.3.4 PI3K-Inhibitor LY294002	47
3.3.5 PI3K-Inhibitor Wortmannin	48
3.4 Der selektive TrkB-Agonist 7,8-DHF	49
3.5 7,8-DHF und K252a	51
3.6 Inhibitorisches Umfeld.....	53
3.7 Einfluss von MAG auf die Wirkung von 7,8-DHF.....	56
3.8 Der ROCK-Inhibitor Y27632.....	58
3.9 Y27632 im inhibitorischen Umfeld.....	60
3.10 Kombination aus Y27632 mit 7,8-DHF	62
3.11 Kombination aus Y27632 mit 7,8-DHF im inhibitorischen Umfeld.....	63
4 Diskussion	66
4.1 Modelle zur Untersuchung des Neuritenwachstums von SGN.....	66
4.2 Interaktion der beteiligten Rezeptoren	68
4.3 MAG induziert ein inhibitorisches Umfeld.....	69
4.4 7,8-DHF – ein selektiver TrkB-Agonist.....	71
4.5 Y27632 greift in die p75 ^{NTR} -Signalkaskade ein	74
4.6 Selektive p75 ^{NTR} -Inhibition im inhibitorischen Umfeld	76
4.7 Kombination aus selektiver TrkB-Stimulation und selektiver p75 ^{NTR} -Inhibition	79
4.8 Mögliche Anwendungsgebiete	80

INHALTSVERZEICHNIS

4.9 Schlussfolgerungen.....	82
5 Zusammenfassung	84
6 Abstract	86
7 Literaturverzeichnis	88
8 Anhang	106
8.1 Verzeichnis der Materialien	106
8.2 Verzeichnis der verwendeten Protokolle	110
8.3 Abbildungsverzeichnis	112
8.4 Tabellenverzeichnis	114
9 Publikationen	115
9.1 Vorträge	115
9.2 Posterpräsentationen	116
10 Selbstständigkeitserklärung:.....	118
11 Danksagung	119

ABKÜRZUNGEN

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Temperatur (in Grad Celsius)		Staaten von Amerika (US food and drug administration)
%	Prozent		
µg	Mikrogramm	FITC	Fluoresceinthiocyanat
µL	Mikroliter	GAB1	zytosolisches Adapterprotein (GRB-associated binder 1)
µm	Mikrometer		
µM	Mikromol	GDP	Guanosindiphosphat
7,8-DHF	7,8-Dihydroxyflavon	GFAP	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
Abb.	Abbildung		
ACE	Prozessierungsstrategie eines Cochlea-Implantats (advanced combination encoder)	GRB2	zytosolisches Adapterprotein (growth factor receptor-bound protein 2)
AKT	Proteinkinase B	GTP	Guanosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat	h	Stunden (hours)
ATP	Adenosintriphosphat	H-89	Proteinkinase A-Inhibitor
B27	B27 Supplement	HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (hank's balanced salt solution)
BB	Blockpuffer		
BDNF	ein vom Gehirn abstammender neurotropher Wachstumsfaktor (brain derived neurotrophic factor)	HiRes	Prozessierungsstrategie eines Cochlea-Implantats (HiResolution)
BGBI	Bundesgesetzblatt des Deutschen Bundes	HNO	Hals-Nasen-Ohren
BSA	Bovines Serumalbumin (bovine serum albumin)	Hz	Hertz
bzw.	beziehungsweise	IHC	Innere Haarzelle (inner hair cell)
C3	Clostridium botulinum Toxin 3	In situ	an der ursprünglichen Umgebung
Ca ²⁺	Calcium	in vitro	in künstlicher, nicht natürlicher Umgebung
Ca ²⁺ /CaMK	Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase	in vivo	im lebendigen Organismus
CaM	Calmodulin	Ins(1,4,5)P ₃	Inositoltriphosphat
cAMP	zyklisches Adenonismonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)	JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
CDC42	Zellzyklusregulationsprotein 42 (cell division control protein 42 homolog)	k252a	Tyrosinkinaseinhibitor
CI	Cochlea-Implantat	kHz	Kilohertz
CIS	Prozessierungsstrategie eines Cochlea-Implantats (Continuos Interleaved Sampling)	KT5720	Proteinkinase A-Inhibitor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	L-1152	Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase
DAG	Diacylglycerin	L-GLN	L-Glutamin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	LY294002	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Inhibitor
EC50	mittlere effektive Konzentration	MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein (myelin-associated glycoprotein)
ERK	extracellular-signal regulated kinase	MAG-Fc	Fc-Chimer des myelin-assoziierten Glykoproteins
EtOH	Ethanol (Alkohol)	MAP	Mitogen-aktiviertes Protein (mitogen-activated protein)
Fc	Antikörperperfragment	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (mitogen-activated protein kinase)
FDA	Zulassungsbehörde für Arzneimittel der Vereinigten	mg	Milligramm
		min	Minuten
		ml	Milliliter

ABKÜRZUNGEN

MLC	Myosin leichte Ketten (myosin light chain)	Rho-GDI	Ras-homologue guanine dissociation inhibitor
MLCP	Myosin leichte Ketten Phosphatase (myosin light chain phosphatase)	ROCK I	Rho-assoziierte Proteinkinase 1 (rho-activated kinase I)
MLCK	Myosin leichte Ketten-Kinase (myosin light chain kinase)	ROCK II	Rho-assoziierte Proteinkinase 2 (rho activated kinase II)
mm	Millimeter	s.	siehe
Mod	Modiolus	Shc	zytosolisches Adapterprotein (Src homologous and collagen-like adaptor protein)
n	Anzahl	SGN	Spiralganglionneuron
ng	Nanogramm	SOS	zytosolisches Adapterprotein (son of sevenless)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)	SM	Scala media
NK	Negativkontrolle	ST	Scala tympani
NMRI	Mausstamm (Naval Medical Research Institute)	SV	Scala vestibuli
NOGO	Wachstumsinhibitor (neurite outgrowth inhibitor)	TMP	Transmembranprotein
NF-200	Neurofilament 200	TNF	Tumornekrosefaktor
NgR	Nogo-66-Rezeptor	TR	Texas red
Ngr2	Nogo-66-Rezeptor 2	Trk	Tropomyosin-verwandter Tyrosinkinase-Rezeptor (tropomyosin-related kinase receptor tyrosine-related kinase)
NT-3	Neurotrophin-3	TrkA	Tyrosin-verwandte Kinase A - Neurotrophinrezeptor (tyrosine-related kinase A)
NT-4/5	Neurotrophin-4/5	TrkB	Tyrosin-verwandte Kinase B - Neurotrophinrezeptor (tyrosine-related kinase B)
NTR	Neurotrophinrezeptor	TrkC	Tyrosin-verwandte Kinase C - Neurotrophinrezeptor (tyrosine-related kinase C)
OHC	äußere Haarzelle (outer hair cell)	WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organisation)
OMgp	ein von Mylein abgeleitetes Protein (oligodendrocyte myelin glycoprotein)	Wortmannin	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Inhibitor
P4-6	Postnataler Tag 4 bis 6	Y27632	Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase zum Beispiel
p75 ^{NTR}	Pan-Neurotrophinrezeptor 75 (pan-neurotrophin receptor)	z.B.	
PB	Permeabilisierungspuffer		
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)		
PFA	Paraformaldehyd		
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase		
PirB	funktionaler Rezeptor der Myelininhibitoren (Immunglobulin-like receptor B)		
PK	Positivkontrolle		
PKA	Proteinkinase A		
PKC	Proteinkinase C		
PLC _γ 1	Phospholipase gamma 1		
PRK2	Protein C-abhängige Protein Kinase		
Rac	Unterart der RhoGTPase Familie (Ras related C3 botulinum toxin substrate)		
Ras	Proto-Onkogen (Rat sarcoma)		
RB	Reaktionspuffer		
Rho	Ras homologue		
RhoA	Ras-homologue member A		

EINLEITUNG

1 Einleitung

1.1 Gehörlosigkeit und Cochlea-Implantate

Als elektrische Innenohrprothese stellt das Cochlea Implantat (CI) eine der wichtigsten Entwicklungen in der Kommunikation für gehörlose und hochgradig schwerhörige Menschen dar. Laut Berichten der Weltgesundheitsorganisation WHO waren im Jahr 2005 insgesamt 278 Millionen Menschen weltweit von einer mittel- bis hochgradigen Schwerhörigkeit betroffen (World Health Organisation, 2005). Außerdem werden pro Jahr etwa ein bis sechs auf 1000 Neugeborene mit einem signifikanten Hörverlust, meist kongenitaler Genese, geboren (Cunningham und Cox, 2003, Volkenstein et al., 2012). In vielen Fällen lässt sich eine solche Hörminderung auf den Verlust oder Funktionsausfall der Haarsinneszellen zurückführen, die sich im Corti'schen Organ befinden und für die Aufnahme und Weiterleitung akustischer Signale von zentraler Bedeutung sind. Sie reagieren äußerst empfindlich auf äußere Einflüsse wie Lärm, verschiedene Medikamente oder Alterungsprozesse (Aran et al., 1999, Lefebvre et al., 2002, Bao und Ohlemiller, 2010). Auch durch genetische Faktoren können die Haarsinneszellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sein (Petit et al., 2001).

Die äußeren Haarzellen (OHC) dienen dabei als Signalverstärker und spielen eine entscheidende Rolle für die Sensitivität und Frequenzselektivität, durch die ein differenzierter Höreindruck überhaupt erst möglich wird (Gold, 1948). Die inneren Haarsinneszellen (IHC) sind für die afferente Weiterleitung des ankommenden Schallsignals über die Neurone des Spiralganglions (SGN) an das Gehirn verantwortlich (Pettingill et al., 2007). Wenn Verluste der Haarsinneszellen auftreten, können sie sich nach heutigem Kenntnisstand nicht mehr regenerieren, sodass ein Funktionsverlust dieser Haarsinneszellen oder ein Haarzellverlust zu einem irreversiblen Hörverlust bis hin zur Gehörlosigkeit führen kann (Oshima et al., 2010). Nach derzeitigem Wissensstand ist es

EINLEITUNG

bislang nicht möglich, diesen Krankheitszustand kausal medikamentös oder interventionell zu therapieren.

Wenn die Möglichkeiten herkömmlicher signalverstärkender Hörgeräte ausgeschöpft sind oder keine, bzw. nur wenige funktionstüchtige IHC im Innenohr vorhanden sind, ist der Einsatz eines CIs indiziert. Die Besonderheit dieser elektrischen Innenohrprothese liegt darin, dass der Hörnerv direkt durch Elektroden stimuliert wird und somit die Funktion der Signaltransduktion durch die Haarsinneszellen umgangen werden kann. Bislang wurden weltweit mehr als 220.000 Menschen erfolgreich mit dieser Innenohrprothese behandelt (FDA, 2010).

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Aufbau und Funktion eines Cochlea-Implantats

Ein Cochlea-Implantat besteht aus extra- und intrakraniellen Bestandteilen. Die Aufnahme akustischer Signale aus der Umwelt erfolgt mithilfe eines Mikrofons, das wie ein konventionelles Hörgerät am Ohr platziert wird. Die Stromversorgung der Hörprothese erfolgt über spezielle Hörgerätebatterien, die ebenfalls hier angebracht werden. Über einen außerhalb des Schädels befindlichen Sprachprozessor findet eine Umwandlung dieser akustischen Signale in elektrische Impulse statt. Dabei werden die Frequenz und das Zeitmuster der Schallereignisse analysiert und in mehreren, der Reizfrequenz entsprechenden Kanälen kodiert. Dieser Prozessor analysiert die für das Verständnis von Sprache bedeutenden Komponenten des Schallereignisses und führt die generierten Pulsmuster einer magnetischen Sendespule außerhalb des Schädels zu. Eine transkutane Übertragung der Impulse erfolgt über ein Magnetfeld zwischen der Sendespule und einer an der Schädelinnenseite subkutan implantierten Empfängerspule. Die Reize werden durch die Empfängerspule dekodiert und in elektrische Signale umgewandelt. Diese Signale werden durch einen im Felsenbein befindlichen Elektrodenträger

EINLEITUNG

in eine Elektrode, die in der Scala tympani der Cochlea liegt, weitergeleitet. Dort werden die Neurone des Spiralganglions durch die verschiedenen Elektrodenkanäle stimuliert. Die im Hörnerv generierten Aktionspotentiale werden in der aufsteigenden Hörbahn zum auditiven Cortex im Bereich der Großhirnrinde weitergeleitet, wo sie als physiologisches Hörerlebnis verarbeitet werden.

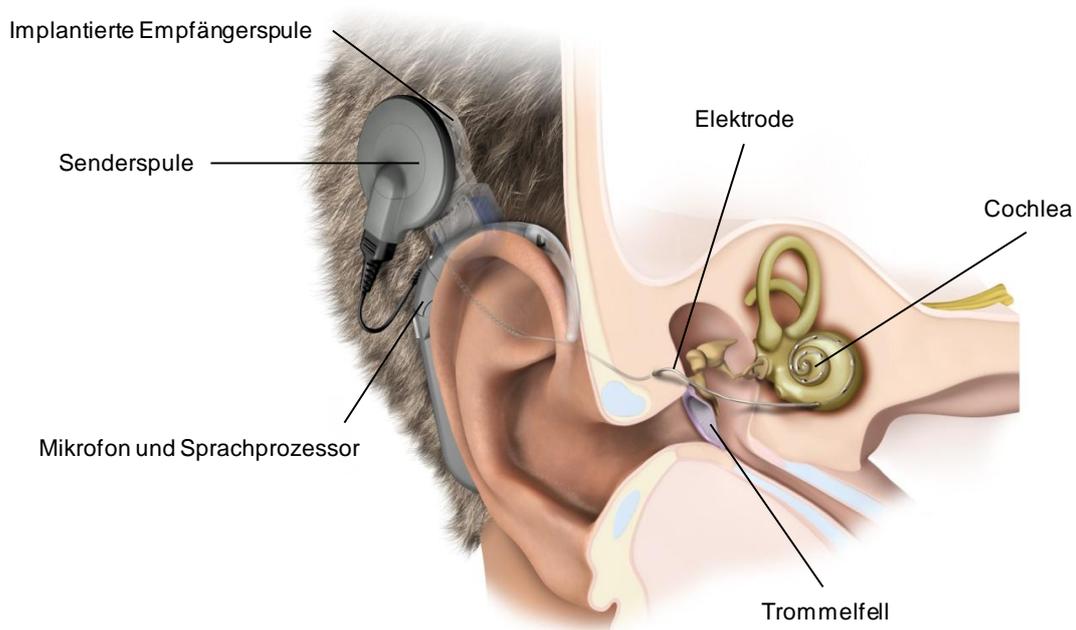


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Cochlea-Implantats und dessen Position *in situ*

Die ankommenden Schallsignale werden über ein extrakraniell platziertes Mikrofon aufgenommen und über den ebenfalls außerhalb des Schädels getragenen Sprachprozessor in elektrische Impulse umgewandelt. Die für das Sprachverständnis generierten Pulsmuster werden transkutan über eine magnetische Sendespule an eine intrakranielle Empfängerspule übertragen. Dort werden die Pulsmuster dekodiert und als elektrisches Signal an die CI-Elektrode in die Scala tympani der Cochlea weitergeleitet, wo die Neurone des Spiralganglions elektrisch stimuliert werden.

Quelle: MED-EL® (<http://www.medel.com>)

EINLEITUNG

1.2.2 Entwicklung der CI-Technologie bis heute

Die erste durchgeführte Implantation zur Stimulation eines Hörnervs erfolgte 1957 mithilfe eines Einzelkanalstimulators durch Djourno und Eyries in Paris (Djourno und Eyries, 1957, Finn, 1998). Damals gelang es erstmals, einen objektiv ertaubten Patienten durch diese Methode Geräusche in Form von Umgebungsgeräuschen wahrnehmen zu lassen. Von diesem Zeitpunkt an begann eine Erfolgsgeschichte, von der mittlerweile mehr als 220.000 implantierte Menschen weltweit profitiert haben (FDA, 2010). Der heutige Standard eines Cochlea-Implantats beinhaltet Geräte mit bis zu 22 Stimulationskanälen (Friesen et al., 2001, Tang et al., 2011), sowie hochkomplexen Prozessierungsstrategien wie CIS (**C**ontinuous **I**nterleaved **S**ampling), HiRes (**H**i**R**esolution) oder ACE (**a**dvanced **c**ombination **e**ncoder) (Kiefer et al., 2001, Koch et al., 2004). Des Weiteren reichen bei einigen Patienten schon ca. 10% funktionell erhaltener Spiralganglionneurone aus, um ein ausreichendes Sprachverständnis zu erhalten und somit die Funktionalität eines CIs zu gewährleisten (Nadol et al., 2001, Fayad und Linthicum, 2006, Linthicum und Fayad, 2009). Allerdings variieren die Hörergebnisse innerhalb der Gruppe von CI-Trägern trotz ähnlicher Ätiologie des Hörverlustes stark (Helms et al., 1997, Wilson und Dorman, 2008a). Ein Grund dafür liegt im Ausmaß der cochleären Schädigung. CI-Patienten, die einen hohen Anteil an funktionell geschädigten Haarzellen aufweisen, benötigen stärkere elektrische Reize für eine erfolgreiche Stimulation und sie besitzen dadurch eine herabgesetzte dynamische Bandbreite (Pfungst und Sutton, 1983, Kawano et al., 1998, Kang et al., 2010). Ein entscheidender Faktor für das spätere Hörergebnis ist der Zeitpunkt einer CI-Implantation und die funktionelle Adaptationsfähigkeit des Gehirns an die Anforderungen eines CIs. Die Plastizität des Gehirns ist vor Abschluss des dritten bis vierten Lebensjahres deutlich höher, als zu einem späteren Zeitpunkt, was als Erklärung dafür dienen könnte, dass Kinder, die vor dem Abschluss des dritten Lebensjahres implantiert wurden, deutliche bessere Resultate in Bezug auf die erzielten Hörergebnisse erreichen als Kinder, die nach Abschluss ihres fünften

EINLEITUNG

Lebensjahres implantiert wurden (Lee et al., 2001, Sharma et al., 2002). Die besten Resultate erzielten Kinder mit prälingualer Ertaubung, die vor dem 2. Lebensjahr implantiert wurden (Miyamoto et al., 2008, Kral und O'Donoghue, 2010). Diese Patientengruppe hat eine gute Chance, eine im Vergleich zu normalhörenden Kindern annähernd normale Sprach- und Hörentwicklung zu nehmen (Svirsky et al., 2004, Nicholas und Geers, 2007, Hayes et al., 2009).

1.2.3 Technische Grenzen von Cochlea-Implantaten

Über eine Cochleostomie am runden Fenster wird der Elektrodenträger eines CIs in die Scala tympani der Cochlea eingebracht. Dort wird die Elektrode in der Regel nahe der lateralen Wand platziert (Takahashi und Sando, 1990, Gstoettner et al., 1999). Jedoch befinden sich die zu erreichenden Zielstrukturen, die Neurone des Spiralganglions, im Modiolus, der nach innen zugewandten Seite der cochleären Wandbegrenzung. Die Erfolgsquote eines Cochlea-Implantates hängt von mehreren Faktoren ab:

1) Als Zielstruktur der elektrischen Stimulation besitzen die Neurone des Spiralganglions für die Signalverarbeitung eine essentielle Funktion. Jedoch spielt, wie bereits erwähnt, die Anzahl funktionell erhaltener Neurone eine untergeordnete Rolle. Es konnte in histopathologischen Studien an menschlichen Felsenbeinen gezeigt werden, dass nur ein geringer Zusammenhang zwischen der Anzahl erhaltener Neurone und dem Sprachverständnis von CI-Trägern besteht (Nadol et al., 2001, Khan et al., 2005a, Khan et al., 2005b, Fayad und Linthicum, 2006).

2) Der funktionelle Zustand der implantierten Cochlea, der sich unter anderem durch die postoperative cochleäre Ossifikation sowie die Fibrosierung um das Implantat herum verändert, muss ebenfalls beachtet werden (Wilson und Dorman, 2008a).

EINLEITUNG

3) Eine zentrale Rolle für das Hörergebnis implantierter Patienten spielt in diesem Zusammenhang eine möglichst definierte Interaktion zwischen Nervengewebe und Elektrode, die durch den räumlichen Abstand zwischen Nerv und Elektrode definiert ist. Je größer dieser Abstand wird, desto unspezifischer erfolgt eine Stimulation der Spiralganglionneurone (O'Leary et al., 2009). Der Querdurchmesser der Scala tympani beträgt bei Erwachsenen etwa 1,5 mm (Hatsushika et al., 1990, Wysoki, 1999). Dadurch, dass der Durchmesser eines CI-Elektrodenbündels maximal 0,8 mm und an der Spitze 0,5 mm beträgt, ergibt sich durch laterale Lage des CIs in der Scala tympani ein Abstand von etwa ein bis zwei Millimetern zu den Spiralganglionneuronen. Dieser Abstand führt zu einer räumlich unspezifischen Stimulation der SGN. Um eine für den Höreindruck notwendige Stimulation zu erreichen, ist der Energieverbrauch mit den derzeit verfügbaren Geräten so hoch, dass ein Batteriewechsel alle zwei bis drei Tage notwendig ist. Dies stellt eine wesentliche Limitation für die Entwicklung vollimplantierbarer Cochlea-Implantate dar (Briggs et al., 2008).

Die natürliche afferente Übertragungsqualität der SGN in der Cochlea kann bei CI-Implantierten im Vergleich zu normalhörenden Personen nicht erreicht werden. Die Übertragung der notwendigen, für einen differenzierten Höreindruck unterschiedlichen Frequenzen, folgt beim Menschen einem tonotopen Muster, wobei die hohen Frequenzen an der Basis der Cochlea, die tiefen Frequenzen im apikalen Bereich der Cochlea repräsentiert sind (Békésy, 1960). Eine innere Haarzelle wird beim Menschen von maximal 15 afferenten Nervenfasern innerviert (Spoendlin und Schrott, 1989). Ein Cochlea-Implantat mit, je nach Hersteller, bis zu 22 Einzelelektroden verfügt über vier bis acht effektive Stimulationskanäle (Kiefer et al., 2000, Friesen et al., 2001, Garnham et al., 2002, Wilson und Dorman, 2008b). Diese stimulieren im Bereich mehrerer Millimeter entlang der Basilarmembran somit über 1000 Neurone gleichzeitig. Das führt zu einer Signalinterferenz der einzelnen Kanäle und stellt einen wesentlichen Faktor für eine im Vergleich zu Normalhörenden limitierte Hörwahrnehmung dar (Kawano et al., 1998). Jedoch kann eine für das

EINLEITUNG

elementare Sprachverständnis in ruhiger Umgebung ausreichende Frequenzselektivität mit den derzeit verfügbaren Geräten erzielt werden (Dorman et al., 1998).

Die Anzahl der effektiv stimulierenden Kanäle hat, wie bereits erwähnt, einen entscheidenden Einfluss auf die Erfolgsquote eines CIs. Dabei sind solche Kanäle gemeint, die unabhängig voneinander mehrere Elektroden gleichzeitig, ohne sich gegenseitig überlappende Signalfelder zu erzeugen, stimulieren. Implantierte Patienten mit einem geringen Sprachverständnis, Vergleichsgrundlage sind hier der Freiburger Sprachverständlichkeitstest (Wilson und Dorman, 2008a) sowie der Satztest nach Hochmaier-Schultz-Moser (Wilson und Dorman, 2008a, b), können in der Regel nicht mehr als vier Kanäle effektiv nutzen. Patienten mit einem deutlich besseren Sprachverständnis können bis zu sieben bis acht effektive Kanäle nutzen (Dorman et al., 1998, Friesen et al., 2001, O'Leary et al., 2009). Im Vergleich dazu nutzen Normalhörende etwa 39 größtenteils unabhängige Frequenzfilter, um die gesamte Bandbreite der Frequenzen von 50 Hz (Hertz) bis 15 kHz (Kilohertz) abzudecken. Dabei benötigt der gesamte Sprachbereich von 500 Hz bis 4 kHz bei Normalhörenden etwa 28 unabhängige Frequenzfilter (Glasberg und Moore, 1990, Moore, 2003). Eine durchaus plausible Erklärung für die limitierte Anzahl an nutzbaren Kanälen in einem CI stellt, wie bereits erwähnt, die Überlappung der elektrischen Felder durch die gleichzeitige Stimulation unterschiedlicher Kanäle dar, wodurch eine unabhängige Stimulation eines einzelnen Bereichs des Spiralganglions nur schwer erreicht werden kann (Fu und Nogaki, 2005). Wenn man bedenkt, dass CI-Patienten zwar einfache Alltagskommunikation wie das Telefonieren oder eine Unterhaltung in ruhiger Umgebung bewältigen können, jedoch komplexe Klangfolgen wie beispielsweise Tonhöhenwahrnehmung innerhalb eines Musikstückes nicht erfassen können (McDermott, 2004), ergeben sich daraus Möglichkeiten zur Verbesserung von CIs. Für das Hören und Verstehen von Musik im Zusammenhang würden theoretisch 32 unabhängige Kanäle benötigt (Kong et al., 2004). Daher lässt sich erahnen, dass die angestrebte Erhöhung der Anzahl unabhängig stimulierender Kanäle, die jeweils einen noch spezifischeren

EINLEITUNG

Bereich der SGN-Population abdecken, einen zentralen Ansatz in der CI-Forschung darstellt.

Tabelle 1: Grenzen eines Cochlea-Implantats. Eingeschränkte Interaktion zwischen Stimulationselektrode und Nervengewebe

zentrale Fragestellung	Anzahl stimulierbarer Neurone	Distanz zwischen Nerv und Elektrode
resultierende Limitierung	fehlendes Target	interferierende Signale
		wenig effektiv nutzbare Kanäle (4-8)
	begrenzte Verfügbarkeit funktionell erhaltener SGN	unspezifische Stimulation von SGN
		hoher Energieverbrauch

1.2.4 Mögliche Lösungsansätze für die Weiterentwicklung der bestehenden CI-Technologie

Für die Verringerung der räumlichen Distanz zwischen Elektrode und Nervenzellfortsätzen wurden bereits unterschiedliche Lösungsansätze untersucht. Ein Lösungskonzept beschäftigt sich mit der räumlichen Distanzreduktion der Strecke von Nerv zu Elektrode, die zu einer besser definierten Interaktion führen soll, welche die Leistung von CIs nachweislich optimieren könnte (Wilson und Dorman, 2008b, Rothschild, 2010). Die Grundidee beruht auf der Annahme, dass der Stromdichtebereich in Abhängigkeit von der Entfernung als Exponentialfunktion dargestellt werden kann (Black et al., 1981, Black et al., 1983) und somit der Stromverbrauch bei geringerer Entfernung zwischen Elektrode und zu stimulierendem neuronalen Gewebe kleiner wird. Daraus lässt sich folgern, dass die Interferenz der einzelnen elektrischen Felder ebenfalls geringer wird und somit Potenzial für eine größere Anzahl von unabhängigen Stimulationskanälen mit größerer neuronaler Selektivität geschaffen werden kann.

EINLEITUNG

1.2.4.1 Position des Cochlea-Implantats

Ein Erklärungsmodell für die hohe Ergebnisvariabilität eines CIs berücksichtigte die stark variierenden Positionen des Elektrodenbündels in der Cochlea bei den einzelnen CI-Trägern (Finley et al., 2008). Ein erster Ansatz bestand darin, die Stimulationselektrode von Cochlea-Implantaten so zu entwickeln, dass sie in eine anatomische Position möglichst nahe der medialen Wand innerhalb der Scala tympani platziert werden sollte. Die Idee dieser perimodiolaren Position beruhte darauf, den Abstand zum Modiolus und damit zu den Neuronen im Spiralganglion zu verringern, um somit eine selektivere Stimulation einzelner neuronaler Abschnitte innerhalb des Spiralganglions zu erreichen (Tykocinski et al., 2000, Frijns et al., 2001). Es wurden daher spezielle Modelle der Firmen Cochlear® (Richter et al., 2001) sowie AdvancedBionics® (Zwolan et al., 2001) entwickelt, die mit einem Positionierungssystem für die Elektrode ausgestattet waren. Die Ergebnisse in Bezug auf das Sprachverständnis dieser mechanischen Annäherung fielen jedoch negativer als zuvor erwartet aus (Fitzgerald et al., 2007). Dafür gab es unterschiedliche Erklärungsansätze, die unter anderem auch eine longitudinale Stromausbreitung entlang der Cochlea durch die Perilymphe mit der daraus resultierenden diffusen Verteilung des applizierten Stromes innerhalb der gesamten Cochlea für die unspezifische Aktivierung von SGN verantwortlich machten (Snyder et al., 2008). Ein weiteres Problem dieses Ansatzes war die erschwerte chirurgische Implantation und die sich daraus ableitende stärkere Traumatisierung des sensorischen Endothels, des Spiralganglions und weiterer angrenzender Strukturen (Tykocinski et al., 2000). Des Weiteren wurden erhöhte Komplikationsraten für Meningitiden beobachtet (Reefhuis et al., 2003, Cohen et al., 2004), was dazu führte, dass eines dieser CI-Systeme mit Positionierungssystem eines Herstellers vom Markt genommen werden musste. Die anatomischen und chirurgischen Möglichkeiten zur Annäherung von Elektrode und Neuronen sind daher auf diesem Wege begrenzt.

EINLEITUNG

1.2.4.2 Stimulation des Neuritenwachstums

Eine biologische Strategie zur Verbesserung der Reizübertragung zwischen Elektrode und SGN besteht darin, die Zellen des Spiralganglions zu einem Neuritenwachstum in Richtung der Elektrode anzuregen und auf diesem Wege die Distanz zwischen CI-Elektrode und neuronalem Gewebe zu verringern (O'Leary et al., 2009, Shibata et al., 2011).

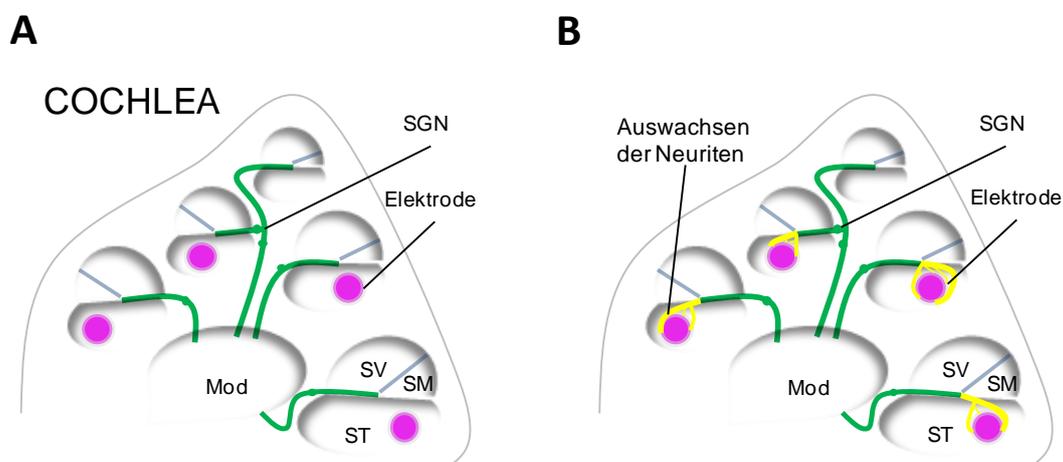


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Spiralganglions und dessen Nervenfortsätzen in einer mit einem CI versorgten Cochlea

Die typische laterale Lage der Stimulationselektrode (rot) in der Scala tympani (ST) und der Nervenfasern des Spiralganglions (grün) in der Cochlea sind dargestellt (A). Durch Zugabe von neurotrophen Faktoren soll ein Auswachsen der Neuriten des Spiralganglions in Richtung der Elektrode erfolgen (gelb), um die Distanz zwischen Stimulationselektrode und neuronalem Zielgewebe zu verringern (B). Weiter dargestellt: Modiolus (Mod), Scala vestibuli (SV), Scala media (SM).

In einer experimentellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die elektrische Stimulation einzelner Neuriten mit dem dazugehörigen Neuron bei direktem Kontakt mit entsprechenden Elektrodenarrays prinzipiell möglich ist (Maher et al., 1999). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Kontakt zwischen den peripheren Fortsätzen eines Neurons und einer Stimulationselektrode zur Überwindung des Reizschwellenpotenzials des

EINLEITUNG

neuronalen Gewebes in der menschlichen Cochlea ausreicht, was diesen biologischen Ansatz noch weiter unterstützt (Briaire und Frijns, 2006). Allerdings degenerieren die Neuriten des Spiralganglions in der ertaubten Cochlea in Richtung des Spiralganglions, was die Reizschwelle, die für die Stimulation eines Neurons benötigt wird, entsprechend erhöht (Shepherd und Javel, 1997). Daher müsste eine Strategie zur Erhaltung übrig gebliebener Neuriten sowie einer Stimulation der axonalen Regeneration angestrebt werden. Entsprechend könnte bei Induktion des Wachstums von Spiralganglionneuriten möglichst nahe an die CI-Elektrode heran eine selektive Stimulation von wesentlich kleineren Spiralganglion-Populationen als bisher ermöglicht werden. So könnte eine Annäherung an die natürliche Situation in der menschlichen Cochlea mit mehreren tausend Informationskanälen weiter vorangetrieben werden, da durch ein Auswachsen von Neuriten auf die CI-Elektrode und durch die Herstellung und Aufrechterhaltung eines direkten Kontakts theoretisch mehrere hundert Informationskanäle geschaffen werden könnten.

Zur Verwirklichung dieses Ansatzes müssen mehrere Voraussetzungen geschaffen werden:

- 1) Es müssen geeignete Substanzen zur Anregung des Wachstums von Neuriten des Spiralganglions gefunden werden.
- 2) Des Weiteren muss sichergestellt sein, dass sie in Richtung der CI-Elektrode auswachsen.
- 3) Nicht zuletzt müssen Wege gefunden werden, wie durch eine kontinuierliche Applikation eine stabile Position der Neuriten in die Cochlea erhalten werden kann.

1.3 Neurotrophine und neurotrophe Rezeptoren in der Cochlea

Neurotrophine sind in der Natur vorkommende Proteine, die innerhalb der Cochlea erstmals in Haarzellen nachgewiesen werden konnten (Ylikoski et al.,

EINLEITUNG

1993). Sie werden von Haar- und Stützzellen im Corti'schen Organ freigesetzt und spielen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Differenzierung in der embryonalen Entwicklungsphase sowie postnatal bei der Erhaltung neuronalen Gewebes (Pirvola et al., 1992, Pirvola et al., 1994, Gao et al., 1995, Thoenen, 1995, Pirvola et al., 1997, Farinas et al., 2001). Innerhalb des Spiralganglions sind für das Überleben (Lefebvre et al., 1994, Malgrange et al., 1996, Marzella et al., 1999) und Neuritenwachstum (Wise et al., 2005) insbesondere BDNF (**brain derived neurotrophic factor**) und NT-3 (**neurotrophin-3**) aus der Familie der Neurotrophine von essentieller Bedeutung. Es konnte nachgewiesen werden, dass periphere Dendriten unter Neurotrophinapplikation in die Cochlea das Potenzial zur Regeneration besitzen (Staecker et al., 1996, Miller et al., 1997, Wise et al., 2005). Diese Neuriten enthalten strukturgebende Zytoskelettfilamente und besitzen Wachstumskegel für die neuronale Aussprossung (Li et al., 2010, Atkinson et al., 2011). Weiterhin bestehen räumliche Gradienten entlang der basoapikalen Ausdehnung der Basilarmembran, die sich während der pränatalen Differenzierung verändern (Farinas et al., 2001). Während der embryonalen Entwicklung sind BDNF und NT-3 vor allem im Apex für die cochleäre Differenzierung von Bedeutung (Bianchi et al., 1996, Fritzsche et al., 1997, Fritzsche et al., 1998), wohingegen sich dieser Gradient für BDNF in der funktionell ausgereiften Cochlea umkehrt und die basale Windung unter dem Einfluss von BDNF steht (Aran et al., 1999, Wiechers et al., 1999, Postigo et al., 2002, Schimmang et al., 2003, Ruttiger et al., 2007). Auch für die Neurone des Spiralganglions konnte eine BDNF-Expression entlang eines basoapikalen Gradienten in der postnatalen Cochlea nachgewiesen werden (Schimmang et al., 2003). Cochlea-Implantate werden in die funktionell ausgereifte Cochlea eingesetzt und kommen dort vor allem in der basalen und teilweise in der mittleren Windung zum liegen, weshalb der neurotrophe Wachstumsfaktor BDNF mit therapeutischem Potenzial hier im Vordergrund steht.

EINLEITUNG

1.3.1 Neurotrophe Rezeptoren

Neurotrophine vermitteln ihre Wirkung über neurotrophe Rezeptoren. Die Spiralganglionzellen exprimieren die für neurotrophe Faktoren essentiellen Neurotrophinrezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie, die sogenannten Tropomyosin-verwandten Tyrosinkinase-Rezeptoren (tropomyosin-related kinase receptor family; Trk) und den p75-Neurotrophinrezeptor (neurotrophin receptor; p75^{NTR}), ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie (Ylikoski et al., 1993, Gestwa et al., 1999, Pirvola und Ylikoski, 2003, Ruttiger et al., 2007).

1.3.2 Die Familie der Trk-Rezeptoren

Die Trk-Rezeptoren sind Zelloberflächen-Rezeptoren und charakterisieren sich durch eine präferenzielle Bindung für bestimmte Neurotrophine. Der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor; NGF) bindet bevorzugt an TrkA, BDNF und Neurotrophin 4/5 (neurotrophin; NT-4/5) an TrkB und NT-3 präferentiell an TrkC (Lewin und Barde, 1996, Kaplan und Miller, 2000, Patapoutian und Reichardt, 2001). Es wurde lange angenommen, dass alle Neurotrophine mit einer hohen Affinität an ihre jeweiligen Rezeptoren binden, doch die Bindung von Neurotrophinen wie BDNF an TrkB und NGF an TrkA besitzt beispielsweise nur eine geringe Affinität (Dechant et al., 1993, Mahadeo et al., 1994, Schropel et al., 1995), die allerdings durch Dimerisierung des Rezeptors sowie durch strukturelle Modifikationen und Assoziation mit dem p75^{NTR}-Rezeptor beeinflusst werden kann (Arevalo et al., 2000, Esposito et al., 2001).

1.3.2.1 Der TrkB-Rezeptor

BDNF stimuliert das Neuritenwachstum von SGN bevorzugt über den TrkB-Rezeptor. Neurotrophine binden als homodimere Komplexe an die

EINLEITUNG

extrazelluläre Domäne von TrkB, was die Rezeptordimerisierung des Tyrosinkinase-Rezeptors einleitet (Jing et al., 1992). Diese Rezeptordimerisierung führt zu einer Transautophosphorylierung des Rezeptors und zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (**Abb. 3**). Im Wesentlichen werden durch die Aktivierung von TrkB drei wichtige Signalwege aktiviert: der MAP-Kinase (MAPK)-Signalweg, der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg und der Phospholipase gamma 1 (PLC γ 1)-Signalweg (Kaplan und Miller, 2000).

Über Shc-Adapterproteine (**S**rc homologous and **c**ollagen-like adaptor protein) können weitere zytosolische Adapterproteine wie GRB2 (**g**rowth factor receptor-**b**ound protein **2**) und/ oder SOS (**s**on of **s**evenless) gebunden werden, was die Aktivierung von Ras (**R**at **s**arcoma) zur Folge hat. Durch die Aktivierung von Ras wird der MAPK-Signalweg in Gang gesetzt, woraus eine erhöhte Aktivität von ERK (**e**xtracellular signal-**r**egulated **k**inase) resultiert (Huang und Reichardt, 2003). Der MAPK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle für das neuronale Überleben und für das Neuritenwachstum (Kaplan und Miller, 2000, Markus et al., 2002, Minichiello, 2009). Der PI3K-Signalweg kann nicht direkt aktiviert werden, da PI3K nicht direkt mit TrkB interagiert. Adapterproteine wie z.B. GAB1 (**G**RB-associated **b**inder **1**) vermitteln die Aktivierung des PI3K-Signalwegs über TrkB, was zu einer erhöhten Aktivität von Akt (protein kinase B) führt (Holgado-Madruga et al., 1997). Der PI3K-Signalweg ist wesentlich für das über TrkB vermittelte Neuritenwachstum verantwortlich, allerdings nimmt er auch Einfluss auf das neuronale Überleben (Minichiello, 2009, Mullen et al., 2012). Ein dritter Signalweg über die Phosphorylierung von PLC γ 1 wird durch den aktivierten Rezeptor selbst in Gang gesetzt (Kaplan und Miller, 2000) und spielt eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität und Neurotransmission (Boulle et al., 2012). Dabei konnte der Nachweis, dass dieser Signalweg ausschließlich über TrkB vermittelt wird, noch nicht abschließend erbracht werden (Gartner et al., 2006).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus in diesem Zusammenhang ist die BDNF-vermittelte und durch Ca²⁺ (Kalzium) hervorgerufene Erhöhung der zytoplasmatischen cAMP (**c**yclic **a**denosine **m**onophosphate)- und der PKA

EINLEITUNG

(protein kinase A)-Aktivität, die eine zusätzliche BDNF-Sekretion, den transmembranären Einbau von TrkB durch SGN und die Membrandepolarisation, die einen wichtigen trophischen Reiz für die neurotrophe Unterstützung darstellt, triggert. (Hansen et al., 2001, Cheng et al., 2011). Dadurch wird neuronales Überleben, axonale Differenzierung und Wachstum gefördert. Des Weiteren wird aktuell diskutiert, ob PI3K möglicherweise auch als Downstream-Effektor von PKA agiert (Xu et al., 2012).

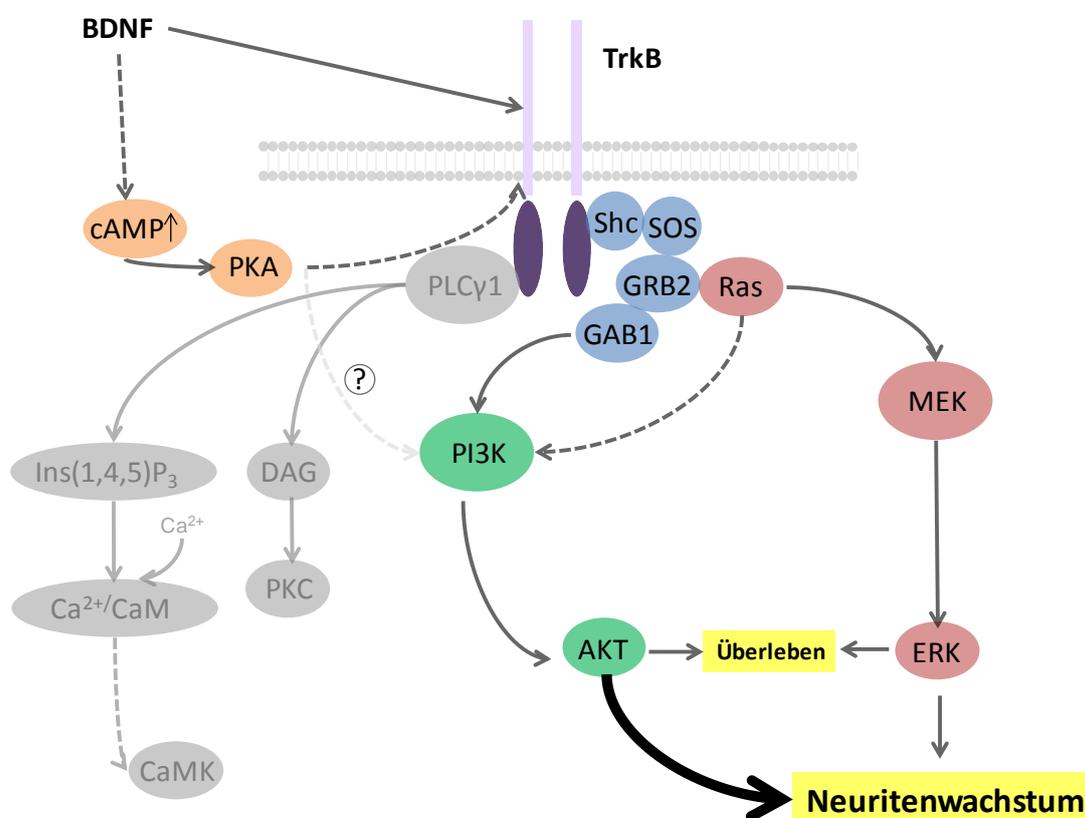


Abbildung 3: TrkB-Signalweg (modifiziert nach Minichiello et al. 2009)

Durch Bindung von Neurotrophinen wie BDNF werden im Wesentlichen drei wichtige Signalkaskaden aktiviert. Über Shc (Src homologous and collagen-like adaptor protein)-Adapterproteine wird SOS (son of sevenless) gebunden, das wiederum GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) aktiviert. Dadurch wird der MAPK-Signalweg über Ras (rat sarcoma), MEK (mitogen-activated protein kinase) und ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktiviert, der für neuronale Differenzierung, Wachstum und neuronales Überleben verantwortlich ist. GAB1 (GRB-associated binder 1) wird durch Bindung von GRB2 aktiviert und setzt den PI3K-Signalweg in Gang, der über AKT (protein kinase B) eine Rolle im Zusammenhang mit neuronalem Überleben spielt, jedoch vor allem Einfluss auf das Neuritenwachstum

EINLEITUNG

nimmt. Durch den aktivierten Rezeptor kommt es zur direkten Phosphorylierung von PLC γ 1 (Phospholipase C gamma 1). Es kommt zur Hydratisierung von Ins(1,4,5)P $_3$ (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerin). Ins(1,4,5)P $_3$ fördert den Ca $^{2+}$ (Calcium)-Ausstrom aus intrazellulären Ca $^{2+}$ -Speichern, was zu einer Aktivierung von Ca $^{2+}$ /CaM (Calmodulin)-abhängigen Kinasen (CaMK) führt und letztendlich wichtig für die synaptische Plastizität ist. DAG stimuliert DAG-abhängige Proteinkinase C-Isoformen. Durch die Anwesenheit von Neurotrophinen erhöht sich die Aktivität von zytoplasmatischem cAMP (cyclic adenosinmonophosphate) und der PKA (protein kinase A), was zu einer zusätzlichen BDNF-Sekretion und zu gesteigertem transmembranären Einbau von TrkB führt.

1.3.3 Der p75^{NTR}-Rezeptor

Der p75^{NTR}-Rezeptor spielt eine deutlich komplexere Rolle im Zusammenspiel der Neurotrophine. p75^{NTR} gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren (Chen et al., 2009). Das Expressionsmuster von p75^{NTR} ist während der embryonalen Entwicklungsphase sehr hoch, während es im Erwachsenenalter deutlich abfällt (Wang et al., 2002a). Erstaunlicherweise erhöht sich dieses Expressionsmuster beim Zelluntergang wieder erheblich, was darauf hinweist, dass p75^{NTR} sowohl auf das Überleben einer Zelle als auch auf die Induktion der Apoptose Einfluss nimmt (Wang et al., 2002a). Zu Beginn der Erforschung von p75^{NTR} wurde davon ausgegangen, dass p75^{NTR} nur als Korezeptor der Trk-Rezeptorfamilie diene, die im Zusammenspiel die Überlebenswahrscheinlichkeit einer neuronalen Zelle erhöhen (Lad et al., 2003). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass p75^{NTR} durch die Bindung von Neurotrophinen die Affinität und Spezifität der Trk-Rezeptoren für Neurotrophine moduliert (Hempstead, 2002, Huang und Reichardt, 2003, He und Garcia, 2004). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass Neurotrophine auch unabhängig von Trk-Rezeptoren an p75^{NTR} binden und somit proapoptotisch wirken und weitere Mechanismen in der Modulation neuronalen Überlebens in Gang setzen können (Frade et al., 1996). In diesem Zusammenhang spielt die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) aus der Familie der MAP-Kinasen eine wichtige Rolle (Harrington et al., 2002, Bhakar et al., 2003, Kenchappa et al., 2010). Bezüglich des Neuritenwachstums konnte nachgewiesen werden, dass eine ligandenvermittelte Bindung von Neurotrophinen an p75^{NTR} die durch Trk-Rezeptoren vermittelte Stimulation des

EINLEITUNG

Neuritenwachstums negativ beeinflussen konnte (**Abb. 4**) (Kohn et al., 1999, Park et al., 2010). Ein Mechanismus in diesem Zusammenhang ist die selektive Bindung von BDNF an $p75^{\text{NTR}}$ in Abwesenheit von TrkB, sodass dadurch beispielsweise der wachstumsfördernde Effekt des Neurotrophins NGF über TrkA aufgehoben wird (He und Koprivica, 2004). Des Weiteren verringert $p75^{\text{NTR}}$ die Aktivierung wachstumsstimulierender Signalwege wie ERK (Singh et al., 2008).

Zusätzlich wurde bei der Elimination von $p75^{\text{NTR}}$ in einem *in vitro* Modell bei entsprechenden Knockout-Tieren ein stabiles Auswachsen von adulten sympathischen Nervenfasern beobachtet (Walsh et al., 1999, Brors et al., 2008), was die Annahme weiter verstärkt, dass Neurotrophine über $p75^{\text{NTR}}$ als Wachstumsinhibitoren wirken.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass noch weitere, das Neuritenwachstum modulierende Faktoren Einfluss über $p75^{\text{NTR}}$ nehmen. Durch die inhibitorische Aktivität von Myelinzellen, die auch im peripheren Hörnerv vorhanden sind (Goycoolea et al., 1990, Nadol et al., 1990, Zhou et al., 1995, Toesca, 1996), lässt sich eine deutliche Einschränkung des Neuritenwachstums beobachten (Berry, 1982). Diese inhibitorische Aktivität wird durch bestimmte von Myelin abgeleitete Proteine hervorgerufen (Caroni und Schwab, 1988b). Zur Gruppe der Myelininhibitoren zählen MAG (**myelin-associated glycoprotein**) (McKerracher et al., 1994), Nogo-A (Chen et al., 2000, GrandPre et al., 2000) sowie OMgp (**oligodendrocyte myelin glycoprotein**) (Wang et al., 2002a). Alle genannten Proteine binden an zwei unterschiedliche Rezeptortypen, um inhibitorische Effekte zu vermitteln. Einerseits benutzen sie den erst seit kurzem bekannten Immunglobulin-like Receptor B (PirB) (Atwal et al., 2008, Park et al., 2010) und andererseits den schon länger veröffentlichten Nogo-66 Rezeptor (NgR) (Wang et al., 2002a). MAG nutzt mit NgR2 noch einen weiteren NOGO-Abkömmling für die Vermittlung inhibitorischer Signale (Venkatesh et al., 2005). Der für diese Arbeit bedeutsame Rezeptortyp NgR bildet einen Komplex mit LINGO-1 (Domeniconi et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002a, Mi et al., 2004) und nutzt $p75^{\text{NTR}}$ als Korezeptor für die intrazelluläre Signaltransduktion. Somit nimmt $p75^{\text{NTR}}$ die Funktion als Mediator für diese drei inhibitorischen

EINLEITUNG

Proteine ein (Domeniconi et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002a). Die Expression von MAG konnte auch im Spiralganglion nachgewiesen werden (Martini, 1994). Dies liefert eine mögliche Erklärung eines gesteigerten Neuritenwachstums im $p75^{\text{NTR}}$ knock-out-Modell über die Unterbrechung der inhibitorischen MAG/ $p75^{\text{NTR}}$ Signalkaskade (Yamashita et al., 1999, Yamashita et al., 2005).

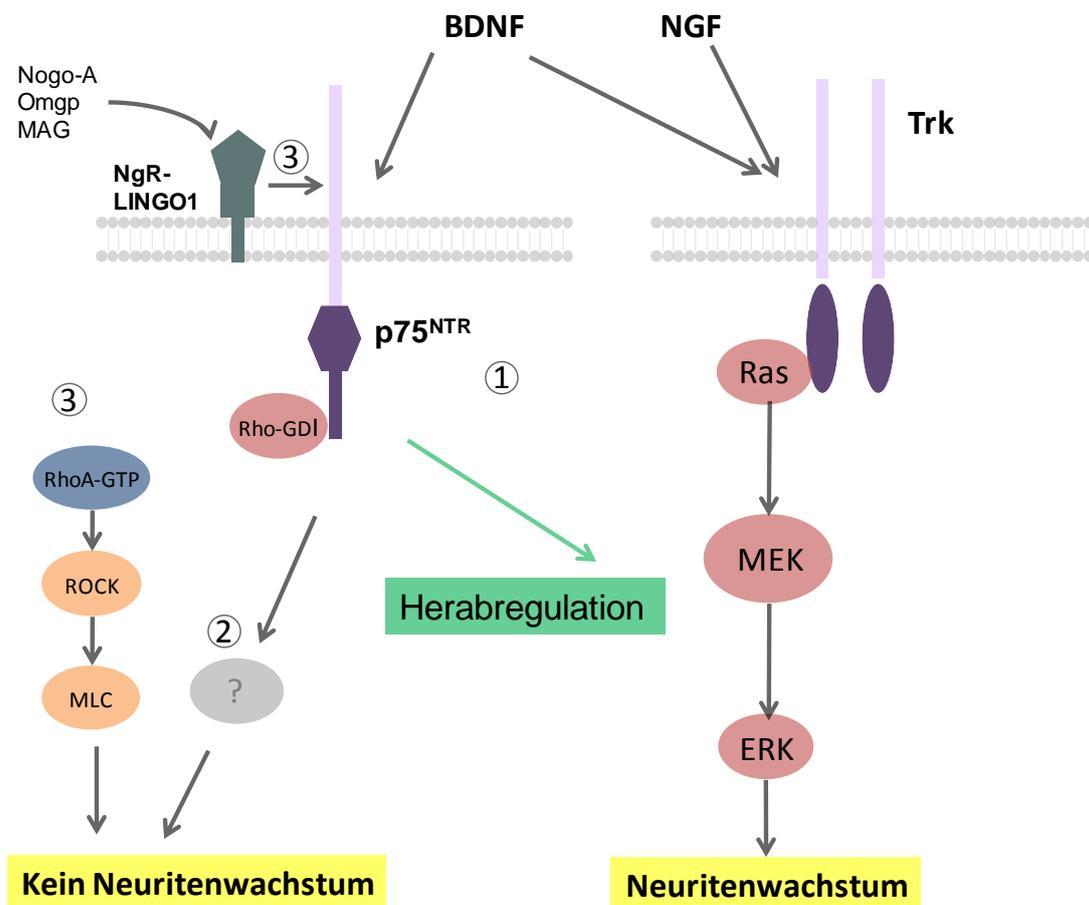


Abbildung 4: Mechanismen der neurotrophinvermittelten Inhibition des Neuritenwachstums

Durch die Bindung von BDNF an $p75^{\text{NTR}}$ kann das Neuritenwachstum myelinunabhängig einerseits (1) durch Herabregulation des durch NGF (nerve growth factor) über TrkA-Rezeptoren vermittelten MAPK Signalweges (MEK/ERK) oder andererseits (2) durch direkte Aktivierung von bislang unbekanntem Wachstumsinhibitoren (?) negativ beeinflusst werden (Kaplan & Miller, 2003). Myelinabhängig (3) kann durch gleichzeitige Bindung von BDNF an TrkB und an $p75^{\text{NTR}}$ vermutlich die inhibitorische RhoA/ROCK

EINLEITUNG

Signalkaskade in Gang gesetzt und damit das Neuritenwachstum inhibiert werden. Somit relativiert BDNF seine eigene stimulierende Wirkung durch gleichzeitige Bindung an $p75^{\text{NTR}}$ (Williams, 2005).

1.3.3.1 Der $p75^{\text{NTR}}$ -vermittelte inhibitorische Signalweg

Der über $p75^{\text{NTR}}$ vermittelte, auf das Neuritenwachstum Einfluss nehmende Signalweg wurde in mehreren Arbeiten bereits ausführlich beschrieben (**Abb. 5**) (Kaplan und Miller, 2000, Chao, 2003, Chen et al., 2009). Wie zuvor erwähnt, binden die drei inhibitorischen Proteine MAG, OMgp und Nogo-A an NgR (Wang et al., 2002a). Für die Vermittlung eines inhibitorischen Signals bildet NgR einen Komplex mit LINGO-1 (Mi et al., 2004). Da der NgR-LINGO1-Komplex keine intrazelluläre Domäne besitzt, sind die Myelinproteine über diesen Rezeptor alleine nicht in der Lage, ihre Wirkung auf das Neuritenwachstum zu entfalten. Erst durch Komplexbildung mit $p75^{\text{NTR}}$ kann intrazellulär ein Signal induziert werden (Mi et al., 2004). Die eigentliche inhibitorische Komponente wird durch Aktivierung von RhoA (**Ras homologue member A**) beschrieben (Ahmed et al., 2005). Erst durch die direkte Interaktion von RhoA mit Rho-GDI (**Rho guanine dissociation inhibitor**) und $p75^{\text{NTR}}$ kann ein inhibitorisches Signal vermittelt werden (Yamashita und Tohyama, 2003). Im Ruhezustand wird RhoA durch Bindung an Rho-GDI im inaktiven GDP (**guanosine diphosphate**)-gebundenen Zustand inaktiviert (Kaplan und Miller, 2003). Erst durch die Bindung von Myelin an den NgR-LINGO1- $p75^{\text{NTR}}$ -Komplex verbindet sich $p75^{\text{NTR}}$ mit Rho-GDI (Wang et al., 2002a, Wong et al., 2002, He und Koprivica, 2004). Durch diese Bindung an $p75^{\text{NTR}}$ kann Rho-GDI dann von RhoA freigesetzt werden. Durch einen Austausch von GDP durch GTP (**guanosine triphosphate**) wird RhoA dann in den aktivierten Zustand überführt und kann mit weiteren Signalproteinen interagieren (Kaplan und Miller, 2003, Yamashita und Tohyama, 2003, Chen et al., 2009). Im weiteren Verlauf wird ROCK (**rho-activated kinase**) durch RhoA aktiviert, was letztendlich zu einer Depolymerisierung von Aktinfilamenten und schließlich zum Kollaps der sogenannten Wachstumskegel führt und somit ein Stoppsignal für das

EINLEITUNG

Neuritenwachstum zur Folge hat (Yamashita und Tohyama, 2003, He und Koprivica, 2004).

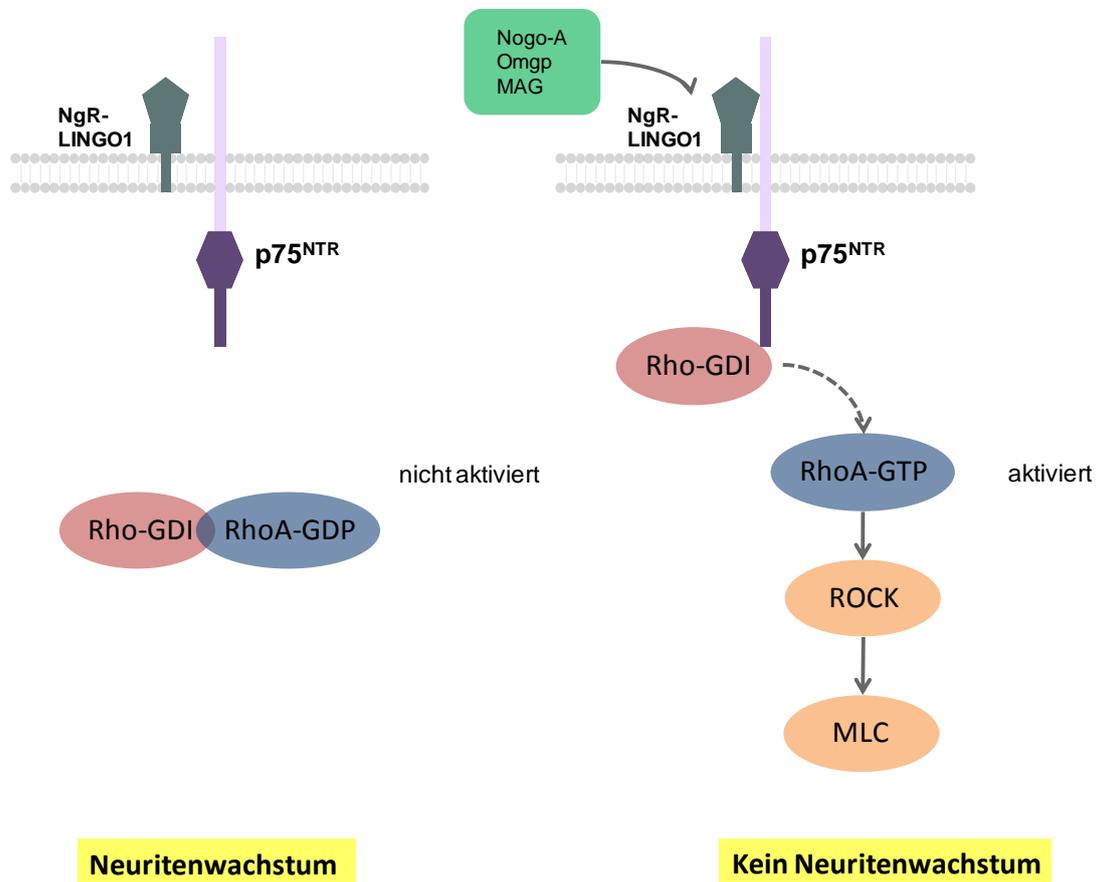


Abbildung 5: p75^{NTR}-Signalweg (modifiziert nach Kaplan & Miller, 2003)

In Abwesenheit von MAG (myelin-associated glycoprotein), Nogo oder OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) kann über NgR (Nogo-66 receptor) und p75^{NTR} (p75 Neurotrophinrezeptor) kein inhibitorisches Signal vermittelt werden. Rho-GDI (Rho guanine dissociation inhibitor) ist nicht an p75^{NTR} gebunden und hält RhoA (Ras homologue member A) im inaktiven GDP (guanosine diphosphate)-gebundenen Zustand. In Anwesenheit von MAG, Nogo-A oder OMgp, die an NgR binden, wird durch Komplexbildung mit p75^{NTR} ein intrazelluläres Signal vermittelt. Aktiviertes p75^{NTR} kann dann Rho-GDI binden, was dazu führt, dass RhoA von Rho-GDI abgelöst wird. Durch einen Austausch von GDP zu GTP (guanosine triphosphate) geht RhoA in den aktivierten Zustand über und interagiert mit Signalproteinen wie ROCK (rho-activated kinase). ROCK treibt die Phosphorylierung der MLC (myosin light chain) an, was zu einem inhibitorischen Signal für das Neuritenwachstum führt.

EINLEITUNG

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Identifikation von Faktoren, die ein gerichtetes Wachstum von Neuriten des Spiralganglions in der Cochlea bewirken. Das Fernziel soll eine Stimulation der sensorischen Nervenzellen in Richtung der Elektroden des Cochlea-Implantats bewirken, sodass ein leistungsfähigerer Kontakt zwischen dem Implantat und dem Hörnerv aufgebaut werden kann. Damit würde sich die räumliche Zuordnung der Neurone des Spiralganglions zu den Kontaktpunkten der Elektroden verbessern. Dies soll eine selektivere Stimulation ermöglichen und damit das Verständnis von Sprache im Alltag verbessern oder die Wahrnehmung von Musik möglich werden lassen.

Diese Arbeit befasst sich daher mit grundlegenden Mechanismen der Regulation und Stimulation des Neuritenwachstums im Spiralganglion der Mauscochlea im Zusammenhang mit neurotrophen Faktoren. Des Weiteren werden durch den Einfluss von Myelin hervorgerufene inhibitorische Effekte unter Berücksichtigung der beiden hauptsächlich verantwortlichen Signalwege von TrkB und p75^{NTR} betrachtet.

Der regulatorische Einfluss der einzelnen Mediatoren soll in einem *in vitro*-Modell unter Verwendung einer Organkultur des Spiralganglions untersucht werden (Richardson et al., 2007, Brors et al., 2008).

1.4.1 Regulation des Neuritenwachstums

Es soll gezeigt werden, dass eine Vermittlung des Neuritenwachstums hauptsächlich über die Trk-Rezeptorfamilie, in diesem Fall speziell über den TrkB-Rezeptor, erfolgt. Dazu soll ein durch BDNF hervorgerufenen Neuritenwachstum der für das Spiralganglion bekannten TrkB vermittelten Signalwege spezifisch gehemmt werden. Mit in der Literatur bereits bekannten Inhibitoren der TrkB-Signalkaskade soll ein hemmender Einfluss an mehreren für die intrazelluläre Vermittlung von Wachstumssignalen entscheidenden

EINLEITUNG

Punkten innerhalb des Signalwegs auf das durch BDNF hervorgerufene Neuritenwachstum genommen werden. Dazu stehen folgende Substanzen zur Verfügung:

K252a ist ein unspezifischer Proteinkinaseinhibitor und ein leistungsfähiger selektiver Inhibitor der Trk-Rezeptorfamilie, der die Aktivität der Tyrosinkinase reduziert und somit eine Transautophosphorylierung von TrkB verhindert (Tapley et al., 1992). Die inhibitorische Aktivität von K252a auf Neurotrophineffekte über Trk-Rezeptoren wurde bereits in PC12-Zellen nachgewiesen (Koizumi et al., 1988, Knusel und Hefti, 1992).

Eine Hemmung des Neuritenwachstums kann des Weiteren durch direkte Hemmung der für das Neuritenwachstum zentralen PI3K erreicht werden. Das Fungizid Wortmannin wurde als erster Inhibitor der PI3K beschrieben (Smith et al., 1995, Aletsee et al., 2002). Wortmannin entfaltet seine inhibitorische Wirkung durch direkte Interaktion mit den katalytischen Untereinheiten von PI3K (Yano et al., 1993). Weiterhin blockiert Wortmannin in hohen Dosen die Myosin leichte Ketten-Kinase (Ferby et al., 1996).

LY294002 ist ein Morpholinderivat von Quercetin und inhibiert ebenfalls die PI3K-abhängige Phosphorylierung von AKT (Vlahos et al., 1994, Smith et al., 1995, Maira et al., 2009). Im Gegensatz zu Wortmannin besitzt LY294002 zwar eine geringere pharmakologische Potenz, jedoch ist die Inhibition der PI3K reversibel (Vlahos et al., 1994, Maira et al., 2009).

Zur weiteren Überprüfung des über TrkB vermittelten Neuritenwachstums soll mit H-89 ein Inhibitor der cAMP abhängigen Proteinkinase A untersucht werden. (Chijiwa et al., 1990, Williams et al., 2005). H-89 ist ein Isoquinolinderivat und vermittelt seinen inhibitorischen Effekt durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle an der katalytischen Untereinheit der PKA (Murray, 2008).

KT5720 ist ein Hexylesterderivat von K252a und vermittelt seine Wirkung ebenfalls durch Blockade der PKA (Pae et al., 2000). Im Gegensatz zu H-89 weist KT5720 keine inhibitorischen Effekte auf andere Proteinkinasen wie die PKC oder MLCK auf (Huang et al., 2000).

EINLEITUNG

1.4.2 Inhibitorisches Umfeld

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll eine möglichst realitätsnahe Anpassung des Organmodells an die im Innenohr vorherrschenden natürlichen Bedingungen stattfinden. Hierbei wird das unter künstlichen Bedingungen erzeugte Umfeld des Spiralganglions den *in vivo* vorherrschenden Verhältnissen angepasst. Das geschieht durch die Zugabe von Myelin-Inhibitoren. Es soll die Wirkung von BDNF, selektiven TrkB-Agonisten und einem selektiven ROCK-Inhibitor in einem inhibitorischen Umfeld entsprechend der Myelin-Inhibition untersucht werden. Zu diesem Zweck soll eine Exposition mit MAG-Fc erfolgen (McKerracher et al., 1994, Tang et al., 1997). MAG ist ein Typ 1 Transmembranprotein, das auf myelinisierenden Oligodendrozyten und Schwannzellen exprimiert ist und für die ausbleibende Regenerationsfähigkeit neuronalen Gewebes verantwortlich ist (Cai et al., 1999). Dieses Modell der myelininduzierten Inhibition wurde im Zusammenhang mit neurotrophinvermitteltem Neuritenwachstum in der Mauscochlea bisher nicht untersucht und stellt somit einen neuen Ansatz in der Erforschung des Neuritenwachstums von SGN dar.

1.4.3 Stimulation des Neuritenwachstums

Eine weitere zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit beinhaltet eine möglichst gezielte Stimulation des Neuritenwachstums von Neuronen des Spiralganglions. Hierbei soll die wachstumsstimulierende Wirkung von Substanzen in Bezug auf neuronales Wachstum von SGN untersucht werden. Dabei gilt es, Substanzen zu identifizieren, die potenziell eine Alternative zu den bisher bekannten Neurotrophinen darstellen könnten. Dazu können im Wesentlichen zwei Hypothesen formuliert werden.

EINLEITUNG

1) Selektive Stimulation von TrkB

Um den Einfluss der über $p75^{NTR}$ vermittelten, durch Myelin induzierten Inhibition des Neuritenwachstums zu umgehen, soll mit einem selektiven TrkB-Agonisten eine verbesserte und vor allem gezieltere Stimulation des Neuritenwachstums erreicht werden.

Hierbei soll mit 7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF) ein selektiver TrkB-Agonist in Bezug auf seine wachstumsstimulierende Wirkung untersucht werden. 7,8-DHF stammt aus der inhomogenen Gruppe der Flavonoide und vermittelt als bioaktiver Metabolit eine Reihe von unterschiedlichen Wirkungen über eine hochaffine Bindung an TrkB (Jang et al., 2010b). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass dieser in der Natur vorkommende, selektive TrkB-Agonist neuronales Überleben fördert und Neuritenwachstum stimuliert (Liu et al., 2010). Diese Hypothese soll durch den direkten Vergleich von BDNF und 7,8-DHF im inhibitorischen Umfeld geprüft werden.

2) Selektive Inhibition der $p75^{NTR}$ Signalkaskade

Der zweite Aspekt einer gezielten Stimulation im Zusammenhang mit den beteiligten Rezeptoren beinhaltet die Vorstellung, dass der hemmende Einfluss des über $p75^{NTR}$ vermittelten Signalwegs auf das Neuritenwachstum von SGN durch einen selektiven inhibitorischen Eingriff in die $p75^{NTR}$ Signalkaskade ausgeschaltet werden kann.

Dazu soll die Wirkung des ROCK-Inhibitors Y27632 zur selektiven Unterbrechung der $p75^{NTR}$ Signalkaskade untersucht werden. Y27632 ist ein Pyridinderivat und inhibiert sowohl ROCK-I als auch ROCK-II (Uehata et al., 1997). Somit soll verhindert werden, dass der durch BDNF ausgelöste negative Einfluss auf das Neuritenwachstum durch $p75^{NTR}$ abgemildert wird. Der Effekt von Y27632 soll ebenfalls im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld geprüft werden.

EINLEITUNG

Tabelle 2: Verwendete Substanzen und deren Funktion in Bezug auf die beteiligten Signalwege

Substanz	Funktion
7,8-DHF (7,8-Dihydroxyflavon)	selektiver TrkB-Agonist
BDNF (brain derived neurotrophic factor)	Agonist an TrkB und p75 ^{NTR}
H-89	PKA-Inhibitor
K252a	selektiver Trk-Inhibitor, unspezifischer Proteinkinaseinhibitor
KT5720	PKA-Inhibitor
LY294002	PI3K-Inhibitor
MAG-Fc (myelin associated glycoprotein)	bildet inhibitorischen Komplex mit NgR und p75 ^{NTR}
Wortmannin	PI3K-Inhibitor, Inhibitor der MLCK
Y27632	ROCK-Inhibitor

METHODEN

2 Methoden

2.1 Zur Organentnahme verwendete Tiere

Die Entnahme der Spiralganglionpräparate für die Organkultur erfolgte an NMRI (**N**aval **M**edical **R**esearch **I**nstitute)-Mäusen (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Germany) im Alter von vier (P4), fünf (P5) oder sechs (P6) Tagen. Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung der HNO-Universitätsklinik Tübingen gemäß der „Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die zu Versuchszwecken und anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden“ vom 18. Juni 2007, durch die Kommission der europäischen Gemeinschaften veröffentlicht, gehalten. Das Töten der Tiere erfolgte gemäß § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.2006 (Aktualisierung der Fassung am 09.12.2010; BGBl. S. 1934). Dafür erforderlich war die „Anzeige zur Tötung von Wirbeltieren ohne Vorbehandlung, z.B. zur Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken“, die am 04.10.2010 über den Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Tübingens an das Regierungspräsidium Tübingen gemeldet wurden.

2.2 Anatomische Präparation des Ganglion spirale

2.2.1 Explantation der Cochleae

Die für die Organentnahme erforderliche Präparation der Cochlea und die Extraktion von Spiralganglionzellen wurden nach der Methode von Sobkowicz et al. (Sobkowicz et al., 1993) durchgeführt. Zum Ausschluss einer Kontamination musste eine sterile Umgebung für die Extraktion der Spiralganglionexplantate gewährleistet sein. Daher wurde die Präparation unter einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe® Heraeus®, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Es wurden sowohl die Haut über dem Operationsgebiet als auch

METHODEN

die für die Präparation notwendigen Instrumente in 70 prozentigem Alkohol (Verzeichnis der Protokolle, Kapitel 8.2) sterilisiert. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation. Nach Entfernung der Haut über dem kaudalen Anteil des Schädelknochens wurde der Schädel mit Ansatz im Foramen magnum mittels zweier longitudinaler Schnitte entlang der Sutura sagittalis und der Schädelbasis in 2 Hälften geteilt. Anschließend wurde das Gehirn mit einer stumpfen Pinzette entfernt und die Laterobasis mit dem Felsenbein durch einen Schnitt in der Frontalebene zwischen den Orbitae und den Ansätzen der Ohrmuscheln abgelöst. Die beiden Schädelhälftenexplantate wurden zur weiteren Präparation in Petrischalen bei +4°C in steriler Hanks' gepufferter Salzlösung (Hepes-Hanks-Lösung; Apotheke des Universitätsklinikums Tübingens) überführt und auf Eis gelagert. Es erfolgte die Darstellung der knöchernen Kapsel der Cochlea. Mithilfe von Pinzetten wurde die Bulla tympanica eröffnet und die knöchernen cochleären Strukturen vorsichtig entfernt. Die isolierten Cochleae wurden zur folgenden Feinpräparation in eine weitere Präparationsschale mit steriler Hanks' gepufferter Salzlösung bei +4°C überführt.

2.2.2 Feinpräparation des Ganglion spirale

Die Feinpräparation fand unter einem Operationsmikroskop (Zeiss Stemi 2000-C®, Carl Zeiss®, Göttingen, Deutschland) statt. Die verbliebenen knöchernen Anteile der Cochlea wurden mithilfe von kleinen Pinzetten entfernt, sodass der Modiolus als knöcherne Achse der Cochlea mit dem daran befindlichen Corti'schen Organ sowie der Stria vascularis sichtbar wurde. Nacheinander wurden Stria vascularis, die Reissner'sche Membran und das Corti'sche Organ mit einer feinen Pinzette von der Basis zur Schneckenspitze hin vom modiolären Gewebe abgezogen, wobei der Modiolus mitsamt der Spiralganglionzellschicht übrig blieb. Die apikale Windung des Spiralganglions wurde mithilfe einer Okularschere abgetrennt und die restlichen noch nicht verknöcherten Anteile des Modiolus wurden mit der Spitze einer

METHODEN

Pinzettenbranche sorgfältig entfernt, sodass ein etwa 400-500µm großes Stück des Spiralganglions für die Organkultur übrig blieb.

2.3 Organtypische Spiralganglionzellkultur

Die Übertragung der präparierten Spiralganglionexplantate in die Kammern des Objektträgers (BD BioCoat™, BD Biosciences®, Heidelberg, Deutschland) erfolgte mit einem stumpfen Okularlöffel, um eine weitere Traumatisierung des vitalen Gewebes zu verhindern. Die Bodenoberfläche der Kulturkammern waren mit den extrazellulären Matrixproteinen Laminin und Poly-D-Lysin beschichtet, um das Anhaften der Explantate sowie ein Auswachsen der Neuriten zu gewährleisten. Die Kulturplatten enthielten acht Kammern, die jeweils mit 200µl Kulturmedium (Neurobasal™, Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) befüllt wurden, das zusätzlich mit L-Glutamin (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland), Penicillin (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) und B27 Supplement (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) versetzt wurde. Mithilfe von Spritzenkanülen (0,4mm x 19mm, BD Microlance™, BD Biosciences®, Heidelberg, Deutschland) wurden die Organpräparate innerhalb des Kammerzentrums am Boden einer mit Kulturmedium gefüllten Kammer fixiert, um ein Abschwimmen der Proben zu verhindern. Alle Proben wurden im Brutschrank (HERAsafe®, Heraeus®, Hanau, Deutschland) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit für 96 Stunden inkubiert. Das Kulturmedium wurde für jede Präparation unter sterilen Bedingungen neu angesetzt (Verzeichnis der Protokolle, Kapitel 8.2).

2.4 Fixierung der Organkulturen

Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden wurden die Kulturkammern mit den darin enthaltenen Spiralganglionkulturen aus dem Brutschrank entnommen und für die Fixierung vorbereitet. Unter dem Stereomikroskop (Leica MZ6, Leica, Heerbrugg, Schweiz) wurde das Kulturmedium sorgfältig abgesaugt, um ein

METHODEN

Abschwimmen der Proben zu verhindern. Danach erfolgte die Fixierung der Explantate mit 4%-iger Paraformaldehydlösung (Roti®-Histofix 4% Formaldehydlösung, Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

2.5 Immunfluoreszenzfärbung der Explantate

Um das Ausbleichen der fluoreszenzmarkierten Antikörper und der Explantate zu verhindern, wurde die Immunfluoreszenzmarkierung in einer lichtundurchlässigen und feuchten Kammer vorgenommen. Die jeweiligen Mengen für die Herstellung von Permeabilisierungs- (PB), Block- (BB) und Reaktionsspuffer (RB), sowie die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurden in 5ml bzw. 50ml Reaktionsgefäße pipettiert (Verzeichnis der Protokolle, Kapitel 8.2). Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie das DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Reagenz (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) wurden im RB verdünnt, gemischt und zentrifugiert.

Nach Absaugen der Fixierungsflüssigkeit wurden die Präparate im PB für fünf Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte eine 60 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im BB zur Antigendemaskierung und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Danach wurde mit PB für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Primärantikörper NF-200 (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) aus der Maus und GFAP (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) aus dem Kaninchen in vorgegebener Verdünnung (1:400) zum RB hinzugefügt und in die Kammern pipettiert (Verzeichnis der Protokolle, Kapitel 8.2). Die Kulturkammern wurden anschließend für 24 Stunden unter Lichtschutz in einer feuchten Kammer bei +4°C gelagert. Am Folgetag wurden die Präparate in drei Schritten für jeweils 15 Minuten im PB gewaschen. Danach erfolgte die Behandlung mit den Sekundärantikörpern (Alexa®488 goat anti mouse, Alexa®546 goat anti rabbit, Molecular Probes®, Eugene, USA) in einer Verdünnung von 1:800 im RB für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Explantate erneut dreimal mit dem PB für jeweils 15 Minuten gewaschen, bevor die Kernfärbung mit dem DAPI-Reagenz erfolgte.

METHODEN

Nach 20 minütiger Einwirkzeit erfolgte ein letzter Waschschrift mit dem PB. Danach wurde die restliche Flüssigkeit aus den Kammern abgesaugt und die Kammerwände durch ein von BD Biosciences® mitgeliefertes System vom Boden abgelöst. Der übrig gebliebene Objektträger wurde mit Fluor-Save™ Reagent (Calbiochem®-Novabiochem® Corp., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt und unter Lichtschutz bei +4°C bis zur Mikroskopie aufbewahrt. Das Protokoll dieser Immunfluoreszenzmarkierung ist im Anhang zu finden (Verzeichnis der Protokolle, Kapitel 8.2).

2.6 Mikroskopie

Die Erstellung digitaler Abbildungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss®, Oberkochen, Deutschland), das mit einer definierten Anregung, Emissionsfiltern für FITC (Fluoresceinthiocyanat) und TR (Texas Red) sowie einer Kamera (AxioCam MRm, Auflösung 1388 x 1040 Pixel, entsprechend 1410 x 1056µm mit einem 10x Objektiv, Skalierungsfaktor 1 Pixel = 1,068µm) ausgestattet war. Die Bilderstellung erfolgte mit einer speziellen Software (Axiovision Version 4.8, Carl Zeiss®, Oberkochen, Deutschland) und wurde mit dem Zeiss Softwaremodul „Mosaix“ durchgeführt. Dabei entstand eine Bilderserie von mehreren Bildern. Im Normalfall reichte eine Matrix von drei mal drei Bildern aus, um ein Präparat vollständig abzubilden. Durch eine Bildüberlappung von 10% zwischen den einzelnen Bilddateien konnte eine vollständige Darstellung des gesamten Explantats gewährleistet werden. Schließlich wurden die Bilddateien für die spätere Analyse in ein JPG-Format umgewandelt.

METHODEN

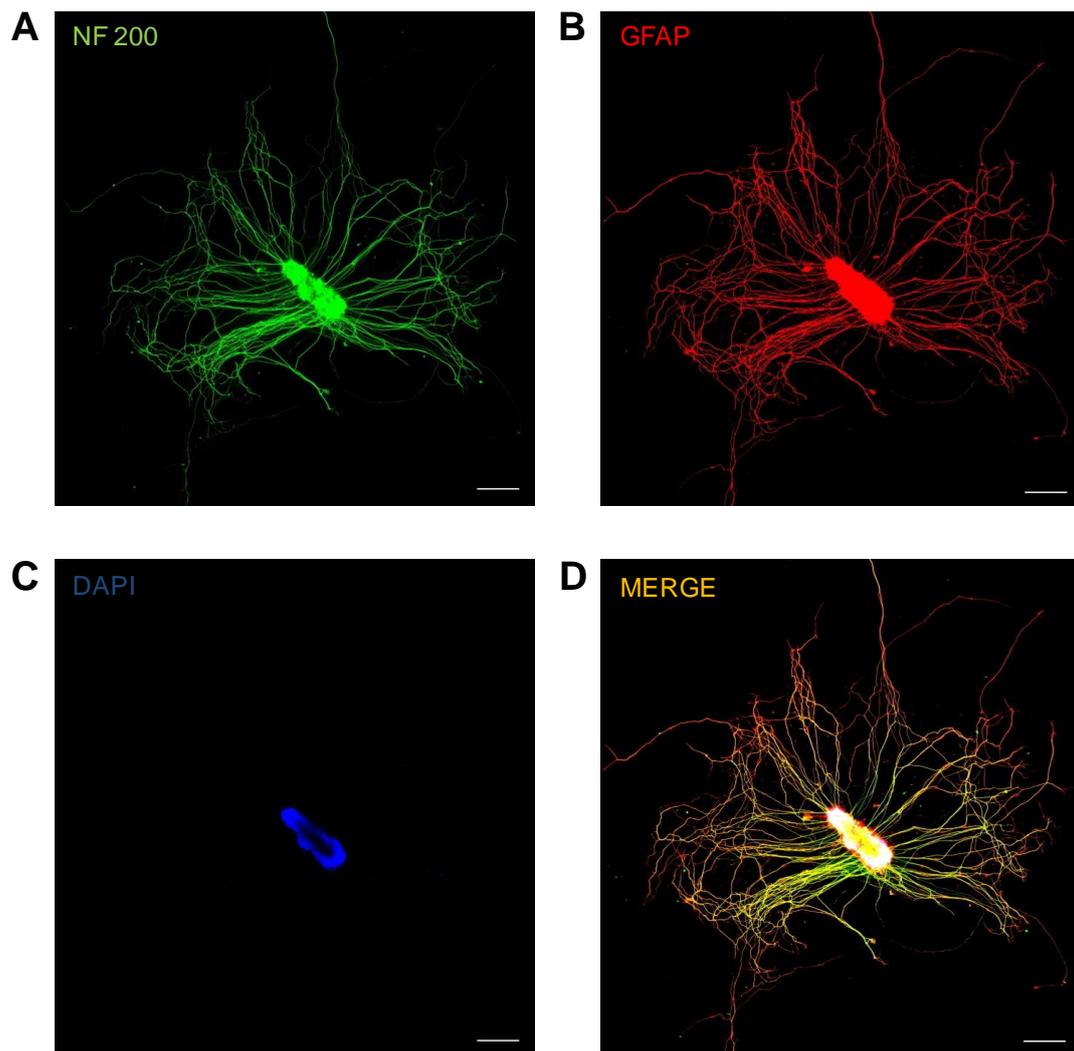


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung eines Spiralganglionexplantats

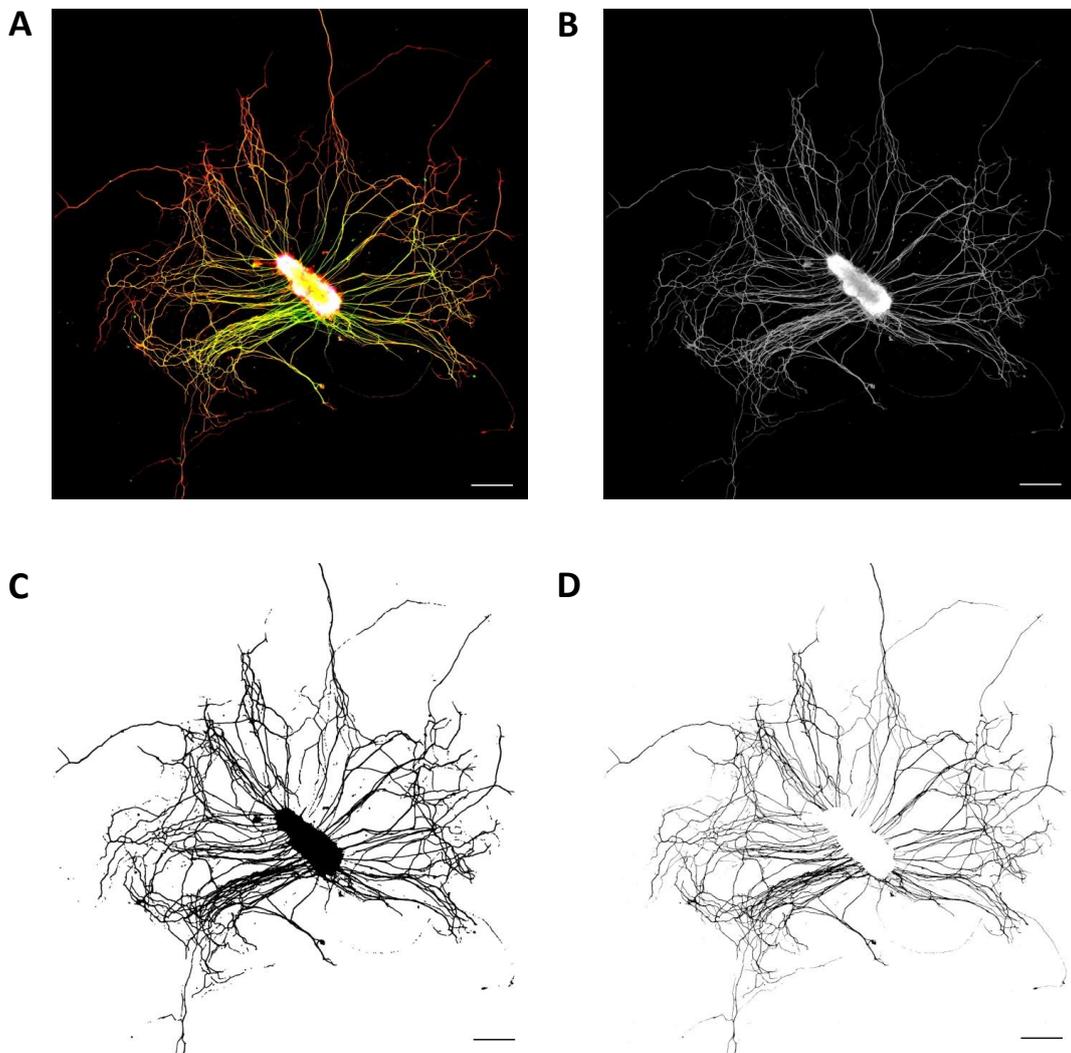
Das Präparat wurde mit 25 ng/ml BDNF für 96 Stunden kultiviert und anschließend gefärbt. Dargestellt ist die Färbung mit dem neuronalen Marker NF-200 (**N**eurofilament-200; **A**), dem Gliazellmarker GFAP (**g**lial fibrillary acid protein.; **B**) und Kernmarker DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; **C**). Eine Überlappung der einzelnen Bildkanäle ist in **D** gezeigt (Merge). Der Maßstabsbalken am rechten unteren Rand der Abbildungen zeigt die Länge von 200µm an.

2.7 Auswertung der Neuritenlänge

METHODEN

2.7.1 Bildbearbeitung mit ImageJ

Für die Auswertung der Neuritenlänge erfolgte ein Bearbeitungsalgorithmus mit ImageJ (Version 1.42q, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Im ersten Schritt erfolgte eine Umwandlung der digitalisierten Bilddateien in ein 8-bit schwarzweiß Format. Anschließend erfolgte eine Feinjustierung der Empfindlichkeitsschwelle für die binäre Information. Das Bild wurde in weiteren Schritten durch die Funktionen „Make Binary“, „Despeckle“ und „Dilate“ abgestimmt. Die Bildbearbeitung wurde durch die Entfernung von Übertragungs- und Färbungsartefakten fertiggestellt.



METHODEN

Abbildung 7: Bearbeitung durch ImageJ

Binarisierung eines Spiralganglionexplantats. Vom fluoreszenzmikroskopischen Ausgangsbild ausgehend (A) wurde die Bildinformation auf 8 bit reduziert (B). In einem weiteren Schritt wurde die Bilddatei binarisiert (C) und Bildartefakte wurden entfernt (D). Der Maßstabsbalken am rechten unteren Rand der Abbildungen zeigt die Länge von 200µm an.

2.7.2 Adaptierte Sholl-Analyse

Für die Auswertung des Neuritenwachstums des bearbeiteten Explantats wurde die seit über 50 Jahren bekannte Sholl-Analyse modifiziert. Idealerweise würde das Neuritenwachstum über die Länge eines jeden einzelnen Neuriten bestimmt werden. Da sich die Neuriten in ihrem Wachstum in der Organkultur jedoch häufig überlagern und sich in mehreren Bündeln vereinigen, ist eine Unterscheidung einzelner Neuriten in vielen Fällen sehr schwierig. Außerdem wachsen aus einem 400-500µm großen Explantat häufig mehrere hundert Neuriten aus, was die Auswertung eines einzelnen Neuriten zusätzlich erschwert. Um dennoch eine möglichst exakte Quantifizierung des Neuritenwachstums zu gewährleisten, wurden die binarisierten Bilddateien mithilfe einer modifizierten Sholl-Analyse ausgewertet.

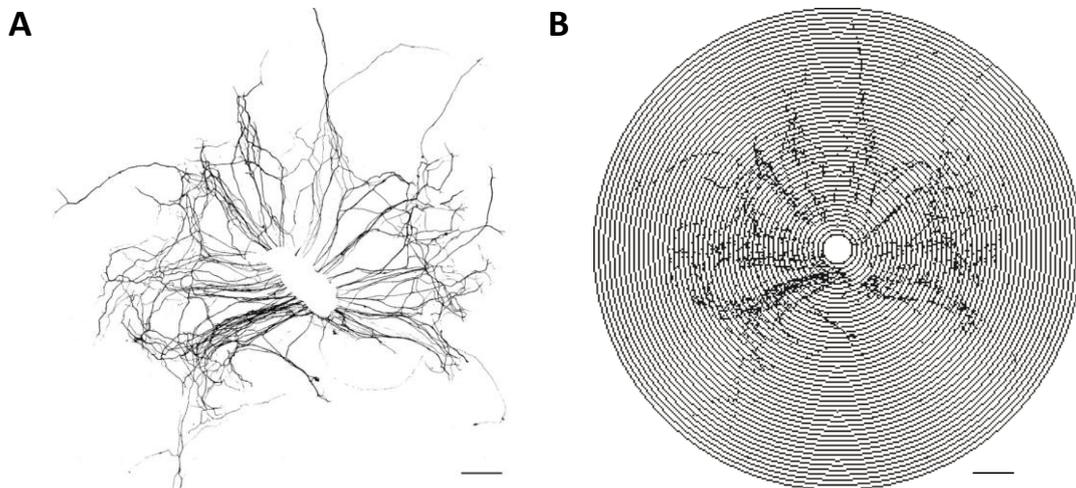
Das Prinzip der Sholl-Analyse wurde ursprünglich für die morphologische Charakterisierung von Dendriten eines einzelnen Neurons entwickelt (Sholl, 1953). Durch ein in diesem Labor entwickeltes ImageJ-Zusatzprogramm (Plugin) (Tropitzsch et al., Manuskript eingereicht zur Publikation) konnte die Länge der Neuriten auf diese Weise bestimmt werden.

Ausgehend von einem Mittelpunkt im Explantat wurden mithilfe dieses Plug-Ins Kreise mit definiert wachsenden Radien berechnet. Dabei wurden die Schnittpunkte dieser Kreise mit den Neuriten bestimmt und gezählt. Um dem Problem der Überlagerung einzelner Neuriten vorzubeugen, die sonst mehrfach gezählt worden wären, wurde immer nur der erste Schnittpunkt eines Kreises mit einem Neuriten in dem definierten Radiusabstand gezählt. Somit konnte eine Zählweise erreicht werden, die unabhängig von der Dicke entweder eines einzelnen Neuriten oder eines Neuritenbündels war. In der vorliegenden Arbeit

METHODEN

betragen die Abstände der Radien 10 Pixel. Zur Mittelung wurde der Mittelwert der Schnittpunkt-Anzahl für einen definierten Radiusbereich berechnet. Ein relativer Neuritenlängenindex wurde berechnet, indem der Mittelwert der Schnittpunkte mit der mittleren Distanz zum Mittelpunkt des Explantats multipliziert wurden. Dies erfolgte von außen nach innen (von den großen zu den kleinen Radien). Dabei wurde die kumulative Anzahl der Schnittpunkte, die in der Berechnung erfasst waren, von der Anzahl der Schnittpunkte im aktuellen Radius abgezogen. Auf diese Weise konnte ein Neuritenlängenindex bestimmt werden, der die Summe aller Neuritenlängen repräsentiert.

Obwohl durch diese Methode keine absolute Neuritenlänge bemessen werden kann, stellt sie eine objektive und reproduzierbare Messmethode des Neuritenwachstums dar. Somit ist diese Methode der Quantifizierung der Neuritenlänge unabhängig von subjektiven Bearbeitungsvorgängen sowie von der Intensität der Immunfluoreszenzmarkierung.



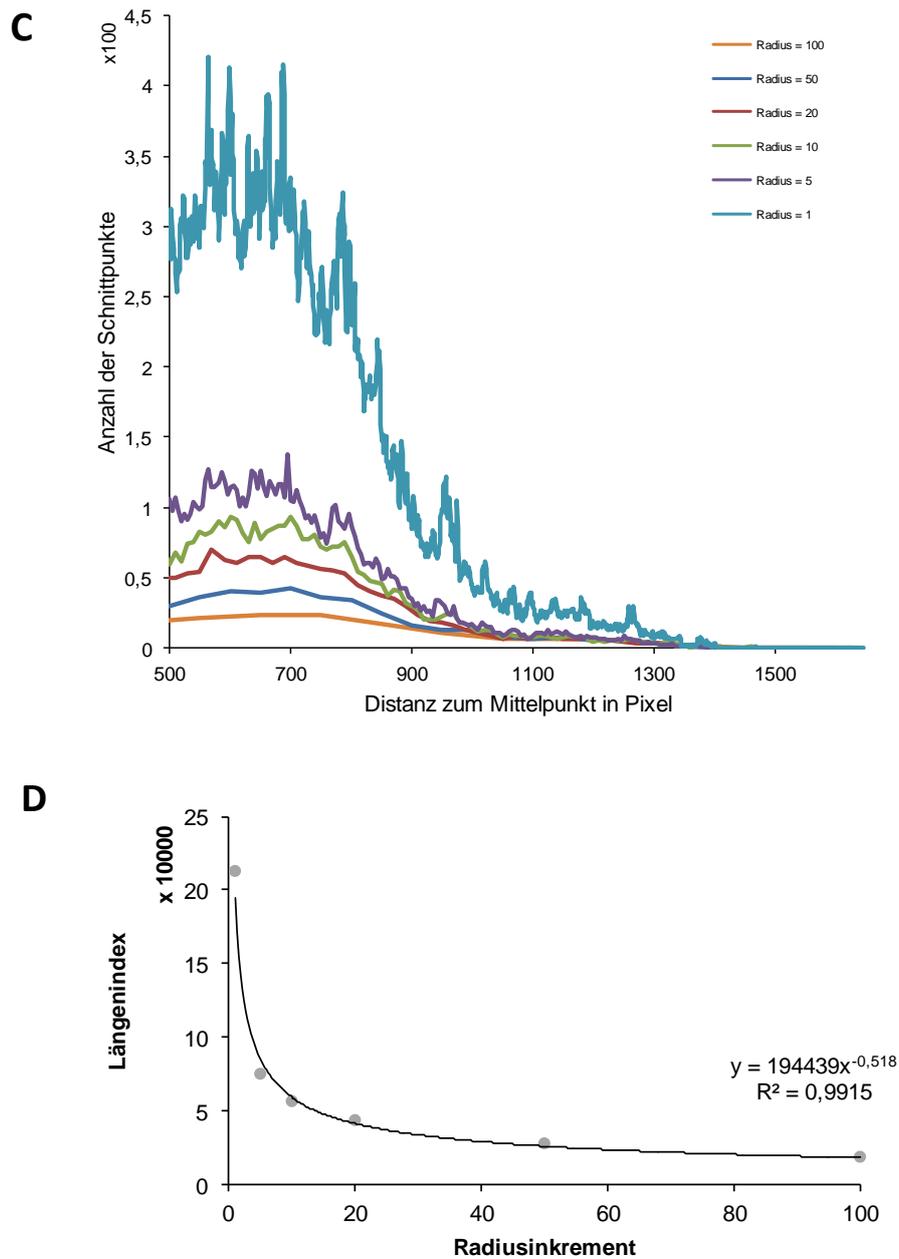


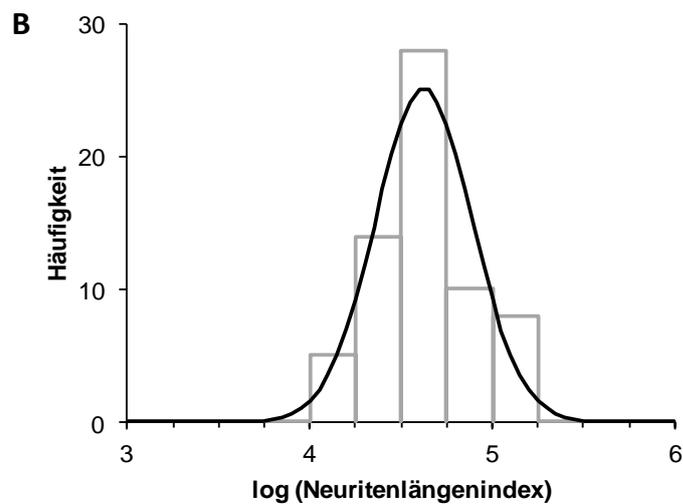
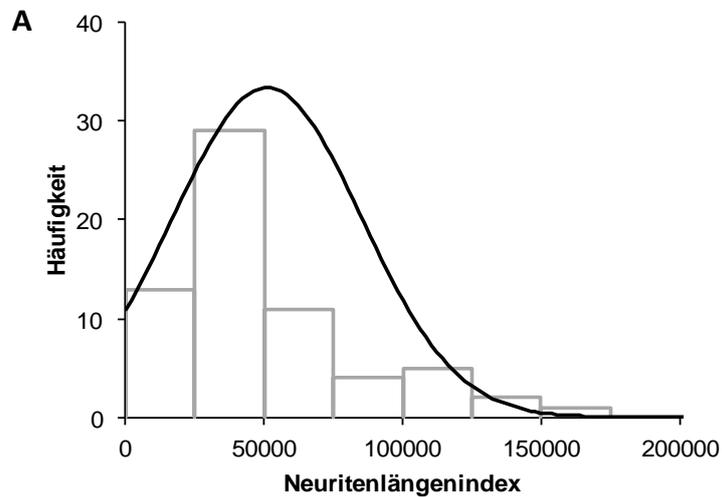
Abbildung 8: Schematische Darstellung der adaptierten Sholl-Analyse

Die bearbeitete binäre Bildinformation dient als Ausgangspunkt für die statistische Auswertung (A). Der Maßstabsbalken am rechten unteren Rand der Abbildungen zeigt die Länge von 200µm an. Ausgehend von einem virtuellen Mittelpunkt im Zentrum des Explantats werden Kreise mit einem jeweils größer werdenden Radius in definierten Abständen gezeichnet (B). Es wird die Anzahl der Schnittpunkte der Kreise mit den Neuriten berechnet. Die histogrammische Auswertung (C) zeigt, dass die die Größe des Radius keinen Einfluss auf das Messergebnis nimmt. Für die Berechnung eines Neuritenlängenindex aus diesen Angaben lässt sich vorhersagen, dass der Längenindex mit zunehmender Radiusgröße immer weiter abnimmt. Der mathematische Zusammenhang zwischen Radiusgröße und der Neuritenlänge ist in D sowohl graphisch als auch als mathematische Funktion dargestellt.

METHODEN

2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die Statistiksoftware JMP (JMP® 9.0.0 64-bit Version, 2011, SAS Institute Inc., Cary, USA) verwendet. Zur graphischen Darstellung wurden die Software Microsoft Office Excel (Microsoft Office Excel™ 2007, Microsoft Corporation, Seattle, USA) und CorelDRAW® Graphics Suite X4 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada) verwendet. Die Analyse der Verteilungsmuster der Neuritenlängenindizes ergab, dass hier eine logarithmische Normalverteilung vorlag.



METHODEN

Abbildung 9: Verteilungsmuster der Daten am Beispiel von 25 ng/ml BDNF

In der linearen Darstellung sind die *in vitro* generierten Originaldaten linksschief verteilt (A). Durch Logarithmierung der Daten kann eine annähernde Normalverteilung erreicht werden (B).

Die Neuritenlängenindizes wurden daher für die weitere statistische Analyse logarithmiert. Die arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten Daten wurden für die einzelnen Versuchsgruppen errechnet, dann erfolgte für die graphische Darstellung eine Rücktransformation in den linearen Maßstab. Die durch Rücktransformation berechneten Mittelwerte entsprechen dem geometrischen Mittelwert in den Versuchsgruppen.

Da der Logarithmus einer logarithmisch-normalverteilten Zufallsvariablen normalverteilt ist, konnte für die Analyse der Unterschiede im Neuritenwachstum ein Tukey-Cramer-Test verwendet werden. Hierbei wird geprüft, ob die Stichproben in einer Varianzanalyse (ANOVA) unterschiedliche Mittelwerte besitzen. Es können hierbei auch Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen durchgeführt werden.

Ein signifikanter Unterschied wurde erkannt, wenn der Fehler 1. Art kleiner als 5% war ($p < 0,05$). Für die graphische Darstellung wurde das obere und untere 95% Konfidenzintervall der logarithmierten Daten in den linearen Maßstab zurücktransformiert und als Intervall (im Sinne einer Standardabweichung) aufgetragen.

ERGEBNISSE

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines Wachstumsverhalten und Morphologie

Unter den in dieser Arbeit aufgestellten Versuchsbedingungen konnte ein konstantes und regelmäßiges Wachstumsverhalten der Neuriten des Spiralganglions beobachtet werden. Das erzielte Neuritenwachstum verhielt sich je nach durchgeführtem Experiment sehr unterschiedlich. Unter Stimulationsbedingungen konnte ein im Vergleich zu nicht stimulierten Präparaten deutlich gesteigertes Wachstumsverhalten erreicht werden.

Die Neuriten wuchsen vom Explantat ausgehend meist radiär aus. In der Nähe eines Explantats wuchsen die Neuriten häufig parallel in Bündeln. Mit zunehmender Entfernung vom Explantat bildeten sich Aufzweigungen, wobei sich die einzelnen Neuriten voneinander trennten. Häufig konnte eine Kreuzung einzelner Neuriten beobachtet werden.

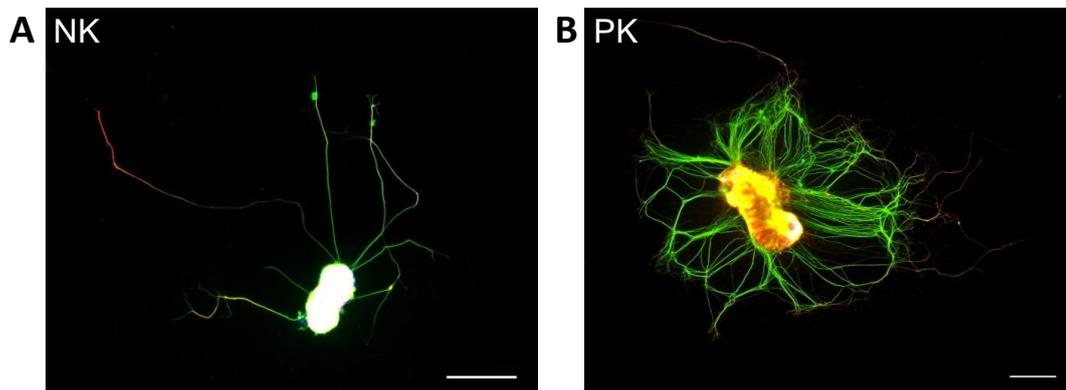


Abbildung 10: Wachstumsverhalten eines Gewebeexplantats einer Spiralganglionkultur

Die Neuriten wachsen radiär vom Explantat ausgehend aus. Die Neuriten wachsen sowohl parallel in Bündeln als auch einzeln und voneinander getrennt aus. Je nach Versuchsbedingungen können starke Unterschiede im Wachstumsverhalten beobachtet werden. Es sind die Negativkontrolle (A) und die Positivkontrolle (B) mit 25 ng/ml BDNF dargestellt. Der Maßstabsbalken am rechten unteren Rand der Abbildungen zeigt die Länge von 200µm an.

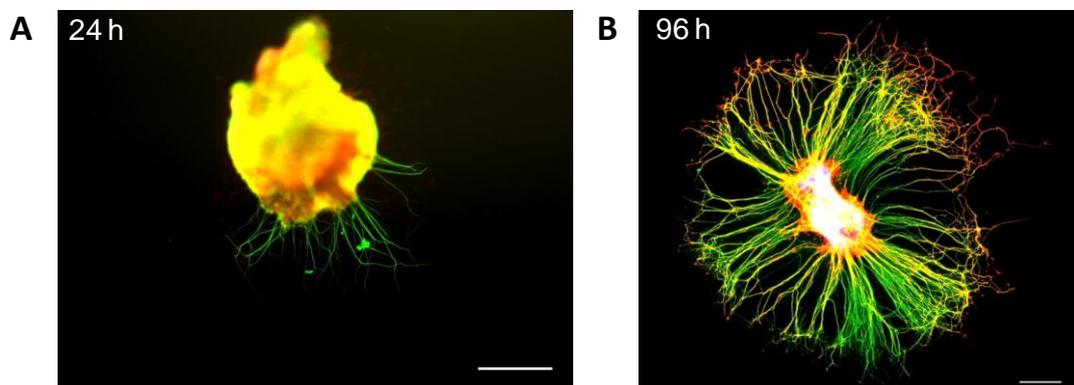
ERGEBNISSE

3.2 Wachstumsverhalten unter Stimulation mit BDNF

Unter Stimulation durch Zugabe von BDNF konnte zeit- und dosisabhängig ein Auswachsen der Neuriten beobachtet werden.

3.2.1 BDNF Zeitabhängigkeit

Das Neuritenwachstum der Spiralganglionzellkulturen konnte durch Zugabe des wachstumsstimulierenden Neurotrophins und TrkB-Agonisten BDNF zeitabhängig gesteigert werden. Die Spiralganglionexplantate wurden für jeweils 24 (n=6), 48 (n=11), 72 (n=8) oder 96 (n=76) Stunden mit einer Konzentration von 25 ng/ml BDNF kultiviert. Abb. 11 zeigt den Neuritenlängenindex in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Mit zunehmender Dauer konnte ein gesteigertes Neuritenwachstum beobachtet werden. Unter maximalen Stimulationsbedingungen bei 96 Stunden Kulturdauer wuchsen die Neuriten teilweise bis an den Rand der Kulturkammern heran. Daher wurden die folgenden Experimente mit einer Dauer von 96 Stunden durchgeführt. Das Wachstumsverhalten unter 96 Stunden war dabei hochsignifikant ($p < 0,001$) gesteigert im Vergleich zum Wachstum unter 24 und 48 Stunden.



ERGEBNISSE

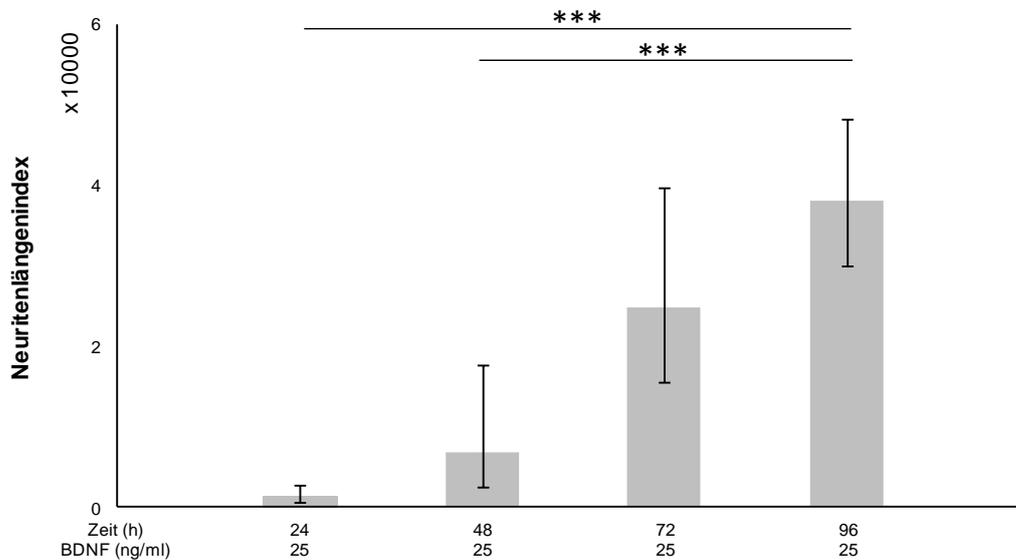


Abbildung 11: Zeitabhängigkeit für BDNF

Oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Spiralganglionexplantaten mit 25 ng/ml BDNF bei 24 (A) und 96 (B) Stunden Kultivierungsdauer. Der Maßstabsbalken am rechten unteren Rand der Abbildungen zeigt die Länge von 200µm an. **Unten:** Die Organkulturen wurden jeweils mit 25 ng/ml BDNF für 24, 48, 72 oder 96 Stunden inkubiert. Mit zunehmender Dauer zeigte sich ein gesteigertes Neuritenwachstum. Alle folgenden Experimente wurden daher mit einer Kultivierungszeit von 96 Stunden durchgeführt

3.2.2 BDNF Dosisabhängigkeit

Die Organkulturen des Spiralganglions wurden mit verschiedenen Konzentrationen von BDNF für jeweils 96 Stunden inkubiert: 0 ng/ml (n=75), 1 ng/ml (n=8), 5 ng/ml (n=8), 10 ng/ml (n=7), 25 ng/ml (=76) und 50 ng/ml (n=7). Die Abbildung 12 zeigt den Neuritenlängenindex in Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen von BDNF. Innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs führte eine zunehmende Konzentration an BDNF zu einem gesteigerten Auswachsen der Neuriten. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansätze wurde das Experiment mit einer Konzentration von 25 ng/ml BDNF jeweils als Positivkontrolle verwendet, da anhand dieser Kontrolle sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme des

ERGEBNISSE

Neuritenwachstums durch Beeinflussung der verschiedenen Testsubstanzen beurteilt werden konnte. Als Negativkontrolle für die im weiteren Verlauf durchgeführten Experimente diente der Versuch mit 0 ng/ml BDNF, was einem nicht stimulierten Zustand entspricht. Zwischen den Gruppen 0 ng/ml BDNF und 25 ng/ml BDNF und zwischen den Gruppen 0 ng/ml BDNF und 50 ng/ml BDNF konnte ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) festgestellt werden.

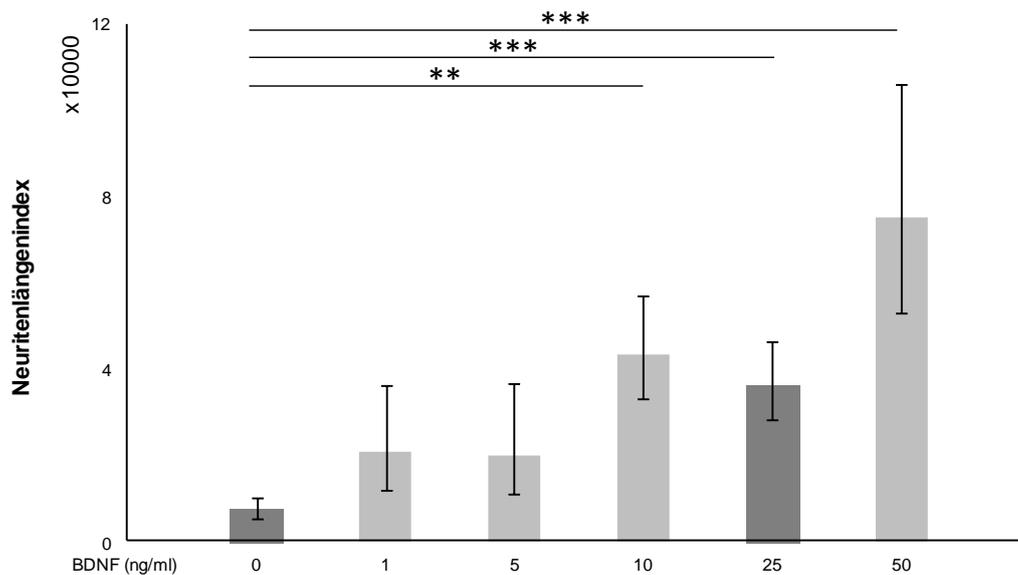


Abbildung 12: Dosisabhängigkeit BDNF

Graphische Darstellung der Gesamtneuritenlänge in Abhängigkeit der verwendeten BDNF-Konzentration. Mit zunehmender Konzentration von BDNF (0, 1, 5, 10, 25, 50 ng/ml) konnte eine dosisabhängige Zunahme des Neuritenlängenindex beobachtet werden. Die Negativ- (0 ng/ml BDNF) und Positivkontrolle (25 ng/ml BDNF) sind farblich hervorgehoben.

3.2.3 Vergleich des Neuritenwachstums in unterschiedlichen Windungen des Spiralganglions

Alle durchgeführten Experimente wurden unter Verwendung von Organkulturen aus der apikalen Windung des Spiralganglions generiert. Zur Überprüfung, ob die aus dem Präparat verwendete Windung Einfluss auf das Neuritenwachstum der SGN nimmt, wurden Präparate aus der apikalen ($n=76$), mittleren ($n=15$)

ERGEBNISSE

und basalen (n=14) Windung entnommen und für 96 Stunden mit 25 ng/ml BDNF kultiviert. Für die Untersuchung des Neuritenwachstums des Spiralganglions der Mauscochlea konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der SGN aus den unterschiedlichen Windungen beobachtet werden. Somit eignen sich Entnahmen aus allen drei Windungen des Spiralganglions zur Untersuchung des Neuritenwachstums der Maus im Alter von vier bis sechs Tagen.

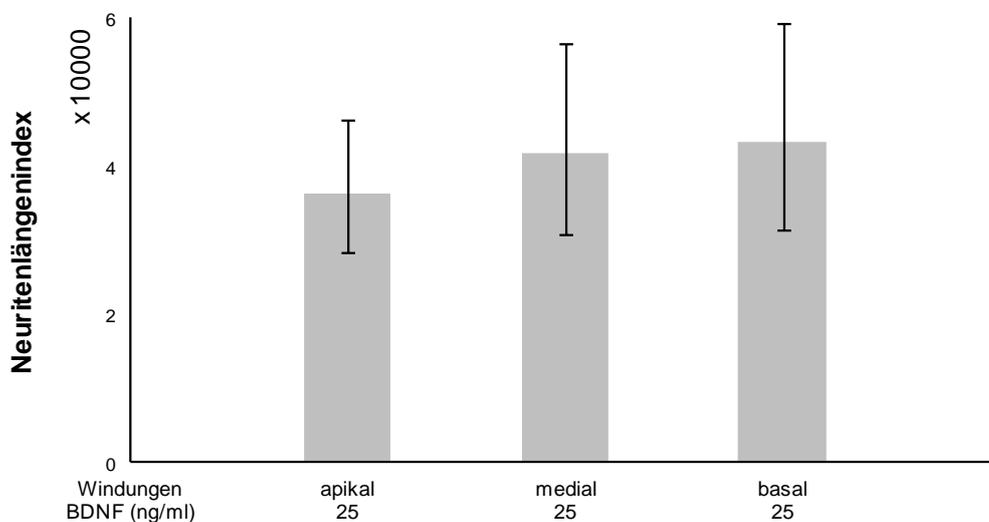


Abbildung 13: Vergleich des Wachstumsverhaltens im Vergleich einzelner Windungen

Spiralganglionexplantate aus der apikalen, medialen und basalen Windung wurden für 96 Stunden mit 25 ng/ml BDNF inkubiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der Neuriten innerhalb der unterschiedlichen Windungen festgestellt werden.

3.3 Inhibitoren des TrkB-Signalweges

Zur Überprüfung des unter 1.3.2 aufgeführten Wachstumseffekts über TrkB wurde mithilfe von unterschiedlichen und in der Literatur bereits beschriebenen (siehe Kapitel 1.4.1) Inhibitoren an gezielten Punkten innerhalb der neurotrophininduzierten Signalkaskade von TrkB eingegriffen. Die einzelnen Inhibitoren sind im folgenden Abschnitt jeweils einzeln aufgelistet. Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse bestätigen die zentrale Bedeutung der

ERGEBNISSE

über TrkB vermittelten Signalkaskaden im Zusammenhang mit dem Neuritenwachstum von SGN.

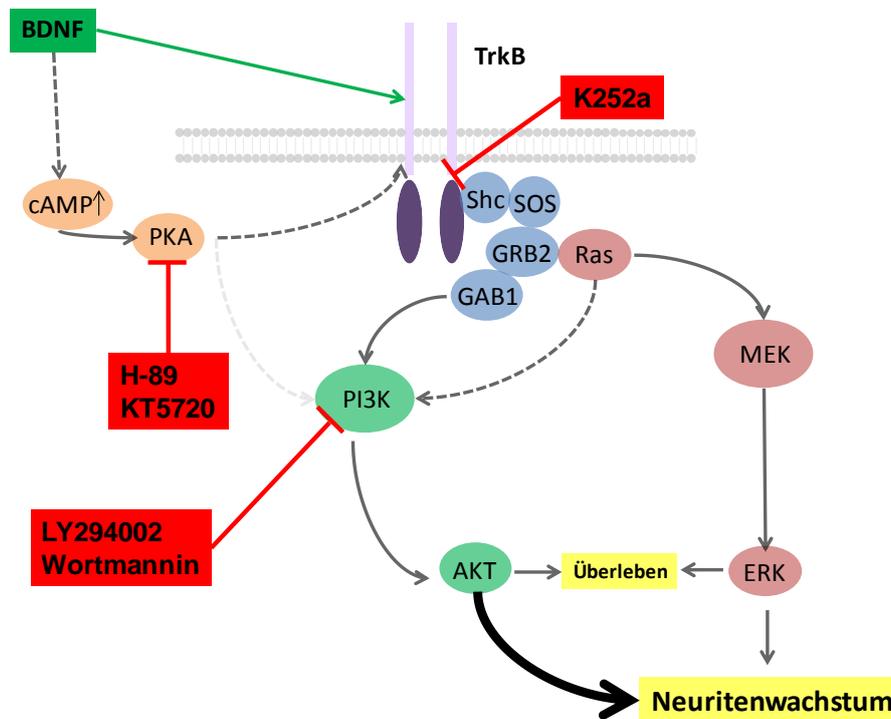


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Angriffspunkte einzelner Inhibitoren innerhalb des TrkB-Signalwegs

Dargestellt sind die wachstumshemmenden TrkB-Inhibitoren und deren Angriffspunkte innerhalb der Signalkaskade. K252a wirkt am Rezeptor und verhindert dessen Dimerisierung durch eine Aktivitätsminderung der Tyrosinkinase. H-89 und KT5720 vermitteln ihre Wirkung durch Inhibition der Proteinkinase A. LY294002 und Wortmannin sind spezifische Inhibitoren der PI3K.

3.3.1 Tyrosinkinaseinhibitor K252a

Durch Kultivierung der Explantate mit dem Tyrosinkinaseinhibitor K252a konnte dosisabhängig eine Inhibition des Neuritenwachstums erreicht werden. Hierbei wurde K252a in Konzentrationen von 0,01 μM (n=8), 0,1 μM (n=6) und 1 μM (n=6) getestet. Bei einer Konzentration von 1 μM K252a mit 25 ng/ml BDNF

ERGEBNISSE

konnte ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) im Vergleich zur Positivkontrolle registriert werden. Hierbei wurde das Ausmaß des Neuritenwachstums unter das Ausgangsniveau der Negativkontrolle reduziert.

Für die Substanz K252a konnte eine mittlere effektive Konzentration (EC50) von $0,0929 \mu\text{M}$ durch eine nichtlineare Regressionsanalyse errechnet werden.

Formel zur Berechnung der nichtlinearen Regressionsanalyse:

$$y = \frac{\min + (\max - \min)}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{Hillslope}\right)}$$

Min: $2,66 \times 10^{-9}$

Max: 43319,07

Hillslope: 1,7

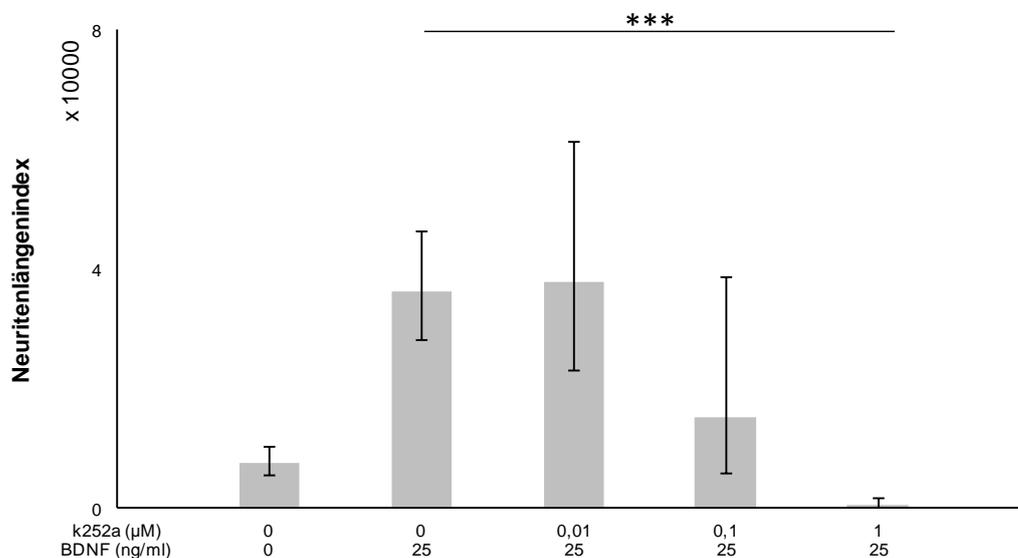


Abbildung 15: Tyrosinkinaseinhibitor K252a

Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors K252a auf das durch BDNF ausgelöste Wachstumsverhalten von Spiralganglionneuriten. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. K252a wurde in Konzentrationen von $0,01 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ zusammen mit 25 ng/ml BDNF kultiviert. Es konnte eine dosisabhängige Hemmung des Neuritenwachstums beobachtet werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

ERGEBNISSE

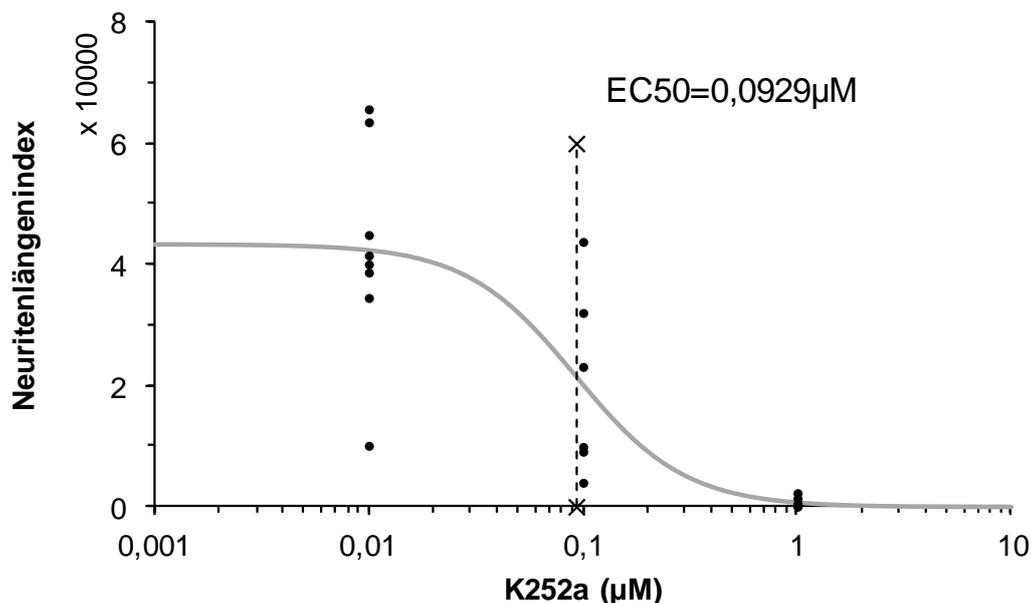


Abbildung 16: Graphische Darstellung der mittleren effektiven Konzentration für K252a

Als Grundlage für die Berechnung der nichtlinearen Regressionsanalyse wurden die Ausgangswerte für unterschiedliche Konzentrationen von K252a (0,01µM, 0,1 µM, 1µM) verwendet. Daraus ließ sich eine EC50 von 0,0929µM bestimmen.

3.3.2 PKA-Inhibitor H-89

Durch Hemmung der PKA mit der Substanz H-89 konnte eine wachstumsinhibierende Wirkung des durch BDNF hervorgerufenen Neuritenwachstums erreicht werden. Für H-89 wurden Konzentrationen von 0,1 µM (n=10), 0,4 µM (n=7), 10 µM (n=12) und 20 µM (n=8) getestet, die jeweils in Kombination mit 25 ng/ml BDNF im jeweiligen Experiment inkubiert wurden. In Bezug auf die Gesamtneuritenlänge konnten sehr signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) ab einer Konzentration von 10 µM H-89 im Vergleich zur Positivkontrolle festgestellt werden. Die Gesamtneuritenlänge konnte ab einer Konzentration von 10 µM H-89 auf das Ausgangsniveau der Negativkontrolle reduziert werden. Für die Substanz H-89 war eine Berechnung der EC50 nicht

ERGEBNISSE

möglich, da die nichtlineare Regressionsanalyse für die Daten von H-89 nicht konvergiert.

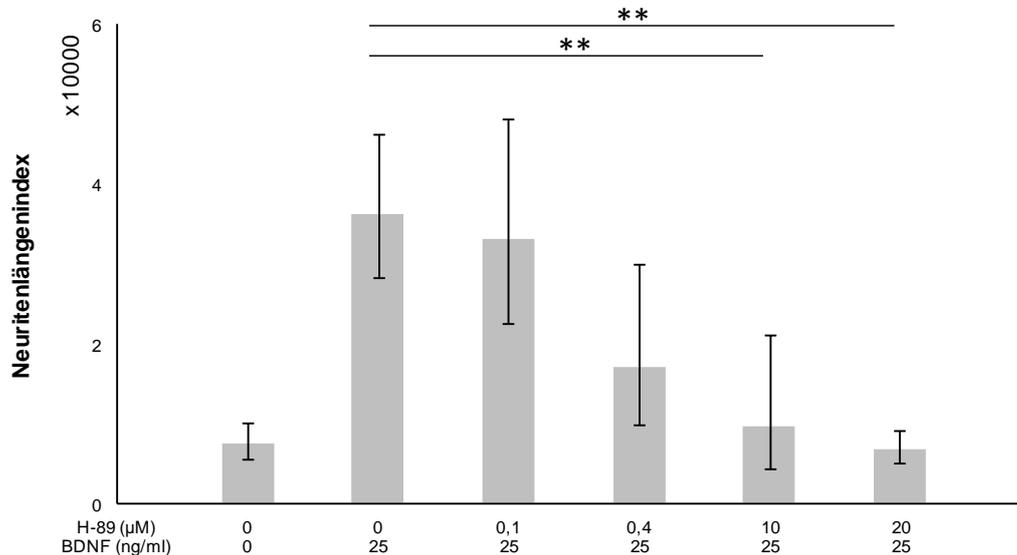


Abbildung 17: Proteinkinase A-Inhibitor H-89

Einfluss des PKA-Inhibitors H-89 auf das durch BDNF induzierte Neuritenwachstum von SGN. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. H-89 wurde in Konzentrationen 0,1 µM, 0,4 µM, 10 µM und 20 µM zusammen mit 25 ng/ml BDNF kultiviert. Es konnte eine dosisabhängige Hemmung des Neuritenwachstums beobachtet werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.3.3 PKA-Inhibitor KT5720

Durch den PKA-Inhibitor KT5720 wurde ebenfalls eine Überprüfung des BDNF-induzierten Neuritenwachstums über den TrkB-Signalweg vorgenommen. Dazu wurde KT5720 in den Konzentrationen 0,02 µM (n=12) 0,2 µM (n=10) 0,4 µM (n=8) und 2 µM (n=11) verwendet. Eine Reduktion des Neuritenwachstums erfolgte dosisabhängig. Ab einer Konzentration von 0,4 µM konnte eine im Vergleich zur Positivkontrolle signifikante Reduktion (p<0,05) des Neuritenwachstums beobachtet werden, wobei das Wachstum auf das Niveau der Negativkontrolle gesenkt werden konnte. Für die Substanz KT5720 war

ERGEBNISSE

eine Berechnung der EC50 nicht möglich, da die nichtlineare Regressionsanalyse für die Daten von KT5720 keine Konvergenz aufwies.

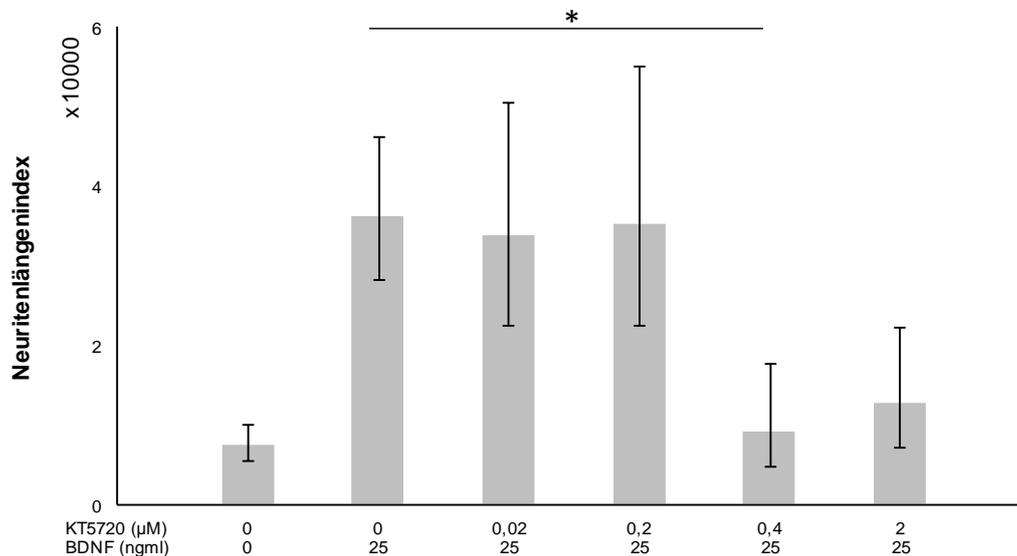


Abbildung 18: Proteinkinase A-Inhibitor KT5720

Einfluss des PKA-Inhibitors KT5720 auf das durch BDNF induzierte Neuritenwachstum von SGN. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. KT5720 wurde in Konzentrationen von 0,02 µM, 0,2 µM, 0,4 µM und 2 µM zusammen mit 25 ng/ml BDNF kultiviert. Es konnte eine dosisabhängige Hemmung des Neuritenwachstums beobachtet werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.3.4 PI3K-Inhibitor LY294002

Eine dosisabhängige Inhibition des Neuritenwachstums durch den PI3K-Inhibitor LY294002 konnte die zentrale Bedeutung der PI3K für das durch den TrkB-Signalweg vermittelte Neuritenwachstum bestätigen. Für LY294002 wurden Konzentrationen von 0,03 µM (n=5), 0,1 µM (n=15), 1 µM (n=11) und 10 µM (n=7) getestet. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte bei einer Konzentration von 1 µM LY294002 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), bei einer Konzentration von 10 µM LY294002 ein sehr signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 1 µM LY294002 konnte das Neuritenwachstum auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert werden. Für die Substanz LY294002 war eine Berechnung der EC50 nicht

ERGEBNISSE

möglich, da die nichtlineare Regressionsanalyse für die Daten von LY294002 nicht konvergiert.

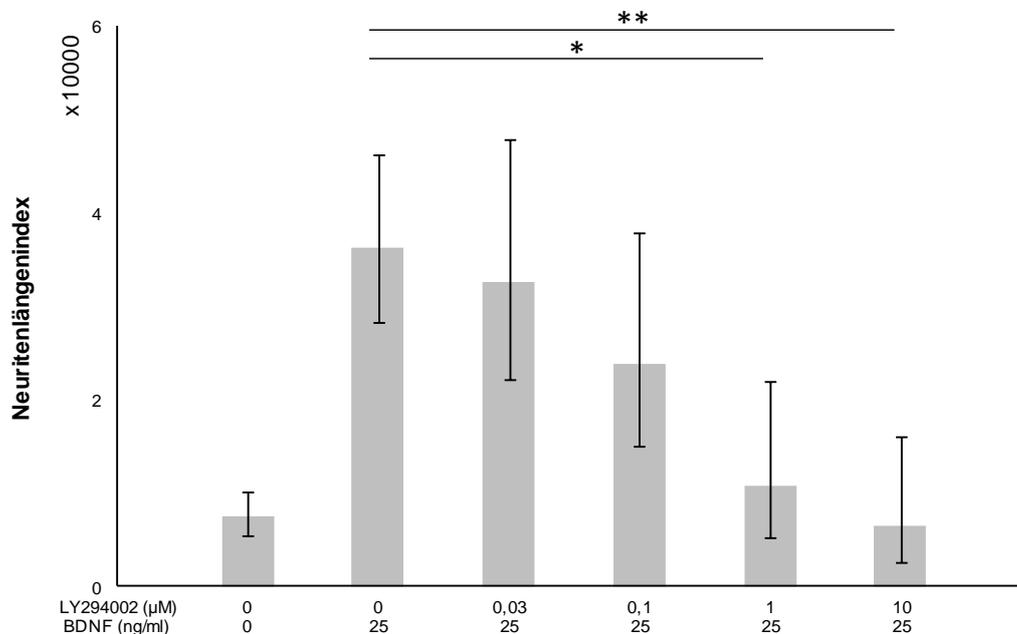


Abbildung 19: Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY294002

Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 auf das durch BDNF induzierte Neuritenwachstum von SGN. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. LY294002 wurde in Konzentrationen 0,03 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM zusammen mit 25 ng/ml BDNF kultiviert. Es konnte eine dosisabhängige Hemmung des Neuritenwachstums beobachtet werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.3.5 PI3K-Inhibitor Wortmannin

Der PI3K-Inhibitor Wortmannin konnte ebenfalls eine wachstumshemmende Wirkung für die SGN induzieren. Wortmannin wurde dazu in Konzentrationen von 0,2 µM (n=10), 2 µMol (n=13), 10 µM (n=8) und 20 µM (n=9) eingesetzt. Um eine Wirkung auf das durch BDNF ausgelöste Neuritenwachstum zu untersuchen, wurden jeweils 25 ng/ml BDNF mit dem PI3K-Inhibitor kombiniert. Dabei konnte eine dosisabhängige Reduktion des Neuritenwachstums beobachtet werden. Für die Substanz Wortmannin war eine Berechnung der

ERGEBNISSE

mittleren effektiven Konzentration nicht möglich, da die nichtlineare Regressionsanalyse für die Daten von Wortmannin nicht konvergiert.

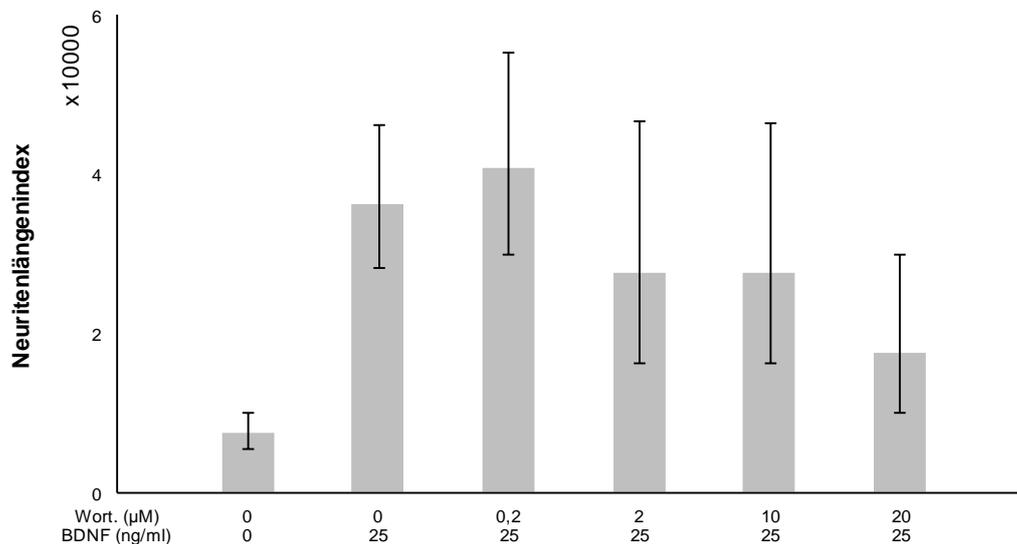


Abbildung 20: Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin

Einfluss des PI3K-Inhibitors Wortmannin auf das durch BDNF induzierte Neuritenwachstum von SGN. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. Wortmannin wurde in Konzentrationen von 0,2 µM, 2 µM, 10 µM und 20 µM zusammen mit 25 ng/ml BDNF kultiviert. Es konnte eine dosisabhängige Hemmung des Neuritenwachstums beobachtet werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.4 Der selektive TrkB-Agonist 7,8-DHF

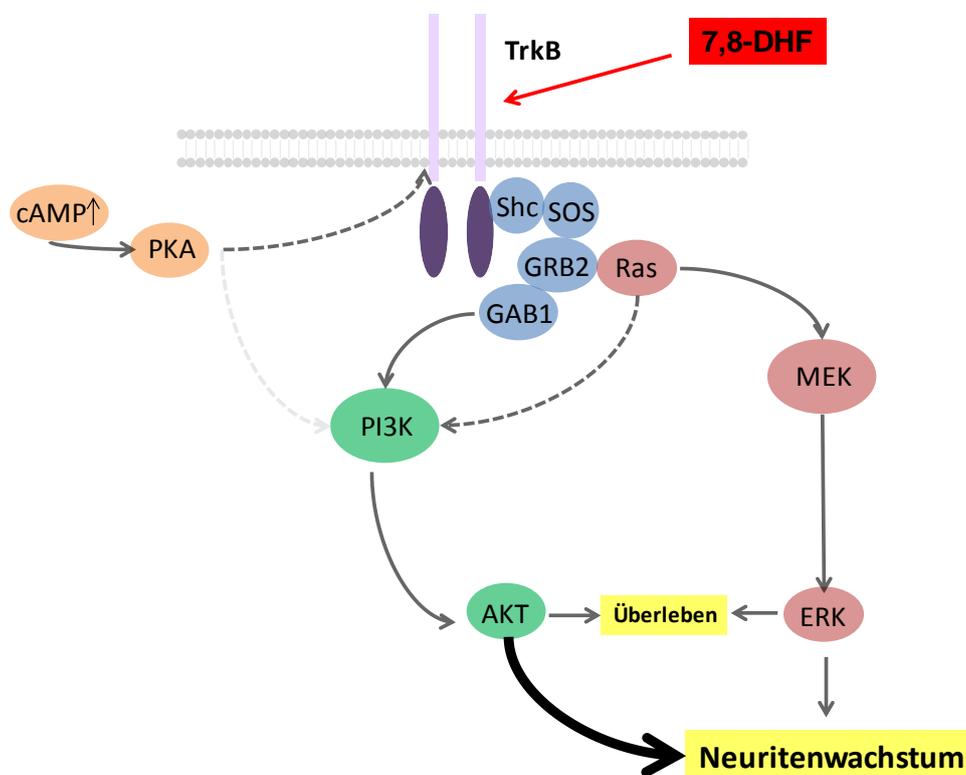
Ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation von wachstumsstimulierenden Stoffen, die ähnliche Wirkung zu BDNF aufweisen, jedoch als Alternative zu Neurotrophinen eingesetzt werden könnten.

Mit der Entdeckung von 7,8-DHF als leistungsfähigem TrkB-Agonisten entstand ein Potential für die weitere Testung dieser Substanz in unterschiedlichen Modellen und Fragestellungen (siehe Kapitel 1.4.3).

In dieser Arbeit zeigte die selektive Stimulation des Neuritenwachstums durch 7,8-DHF in einer Konzentration von 1 µM einen im Vergleich zur

ERGEBNISSE

Negativkontrolle hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) in Bezug auf den Neuritenlängenindex. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte kein signifikanter Unterschied bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ($p = 0,4322$) beobachtet werden. Der Effekt auf das durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ 7,8-DHF erzielte Neuritenwachstum erreichte ca. 66,5% des durch 25 ng/ml BDNF hervorgerufenen Niveaus der Gesamtneuritenlänge. Weiterhin konnte ein dosisabhängiger Anstieg des Neuritenwachstums durch 7,8-DHF in Konzentrationen von $0,035 \mu\text{M}$ ($n=8$), $0,1 \mu\text{M}$ ($n=12$) und $1 \mu\text{M}$ ($n=33$) beobachtet werden.



ERGEBNISSE

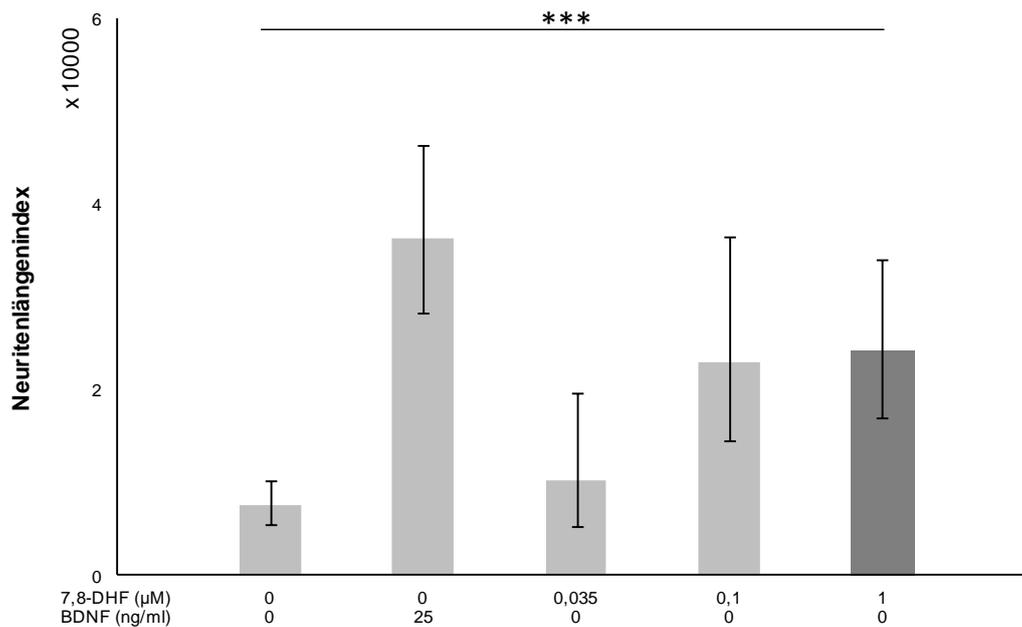


Abbildung 21: 7,8-Dihydroxyflavon

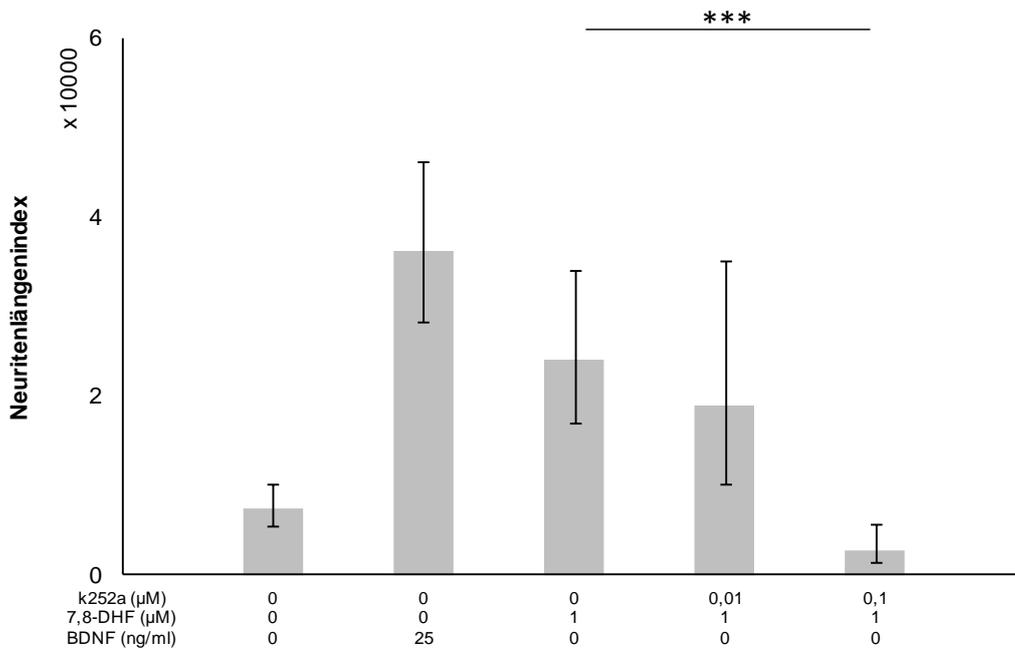
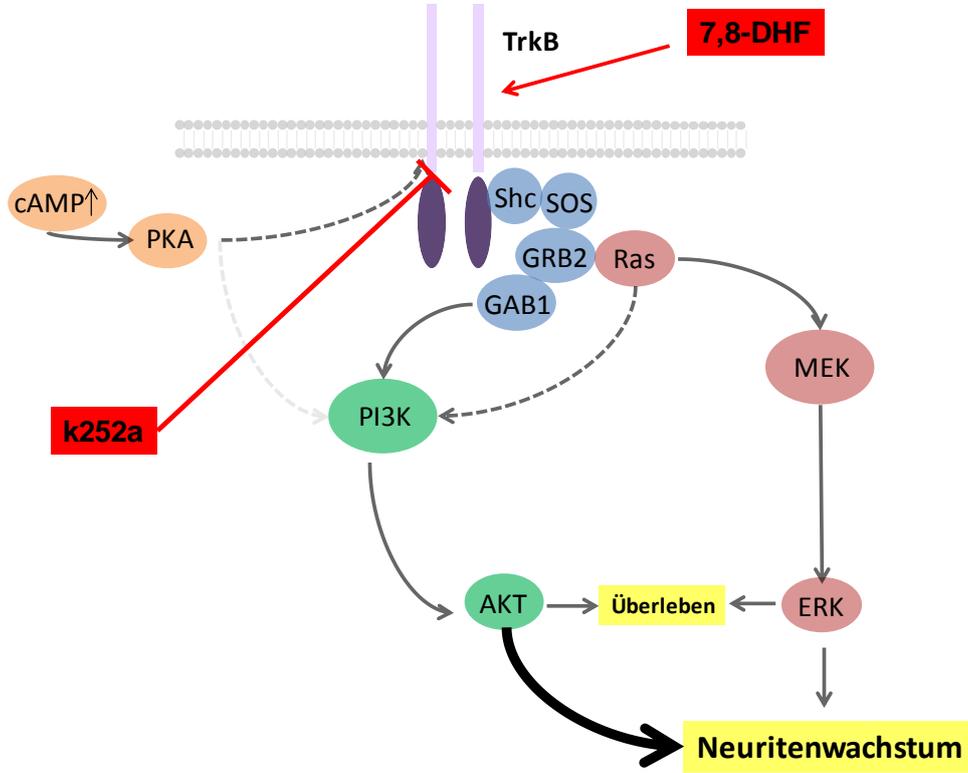
Einfluss des selektiven TrkB-Agonisten 7,8-DHF auf das Neuritenwachstum von SGN. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von 7,8-DHF im TrkB-Signalweg. **Unten:** 7,8-DHF zeigte eine dosisabhängige Steigerung des Neuritenwachstums. Es wurden Konzentrationen von 0,035 µM, 0,1 µM und 1 µM getestet. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte das Neuritenwachstum durch Zugabe von 1µM 7,8-DHF hochsignifikant gesteigert werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.5 7,8-DHF und K252a

In einem weiteren Experiment wurde die über TrkB vermittelte Wachstumssteigerung von 7,8-DHF durch Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors K252a überprüft. Die Anwesenheit von K252a inhibierte das durch 7,8-DHF hervorgerufene Neuritenwachstum dosisabhängig. Dazu wurde K252a in Konzentrationen von 0,01 µM (n=8) und 0,1µM (n=8) in Kombination mit 1 µM 7,8-DHF inkubiert. Es konnte ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der für diesen Versuch geltenden Positivkontrolle von 1 µM 7,8-DHF im Vergleich zu dem Experiment mit 1 µM 7,8-DHF mit 0,1 µM K252a beobachtet werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die

ERGEBNISSE

wachstumssteigernde Wirkung von 7,8-DHF tatsächlich über TrkB gesteuert wird.



ERGEBNISSE

Abbildung 22: Einfluss von K252a auf 7,8-Dihydroxyflavon

Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors K252a auf das durch 7,8-DHF induzierte Neuritenwachstum von SGN. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. K252a wurde in Konzentrationen 0,01 μM und 0,1 μM zusammen mit 1 μM 7,8-DHF kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von 7,8-DHF und K252a im TrkB-Signalweg. **Unten:** Es konnte eine dosisabhängige Hemmung des durch 7,8-DHF-induzierten Neuritenwachstums durch K252a beobachtet werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.6 Inhibitorisches Umfeld

Wie bereits erwähnt, sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein für dieses Modell neuartiges inhibitorisches Umfeld generiert werden, um sich den *in vivo* vorherrschenden Bedingungen anzunähern. Dazu sollte der durch Myelin hervorgerufene inhibitorische Einfluss auf das Modell der Organkultur übertragen werden. Für die Induktion des inhibitorischen Umfelds wurde in diesem Zusammenhang MAG verwendet, dessen Wirkung über die durch NgR-LINGO1-vermittelte Aktivierung von $p75^{\text{NTR}}$ erreicht wird.

MAG reduzierte das durch Zugabe von exogenem BDNF vermittelte Neuritenwachstum in Konzentrationen von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (n=8), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (n=7), 5 $\mu\text{g/ml}$ (n=8) und 25 $\mu\text{g/ml}$ (n=9) dosisabhängig. Durch Zugabe von 25 $\mu\text{g/ml}$ MAG zu 25 ng/ml BDNF konnte das Auswachsen der Neuriten auf das Niveau der Negativkontrolle vermindert werden. Des Weiteren konnte zwischen diesem Versuchsansatz und der Positivkontrolle ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) beobachtet werden.

Durch alleinige Zugabe von 25 $\mu\text{g/ml}$ MAG (n=6) zum Kulturmedium wurde der durch die Negativkontrolle verursachte geringfügige Wachstumseffekt noch weiter reduziert.

Für die Substanz MAG konnte eine mittlere effektive Konzentration (EC50) von 4,3367 $\mu\text{g/ml}$ durch eine nichtlineare Regressionsanalyse errechnet werden.

ERGEBNISSE

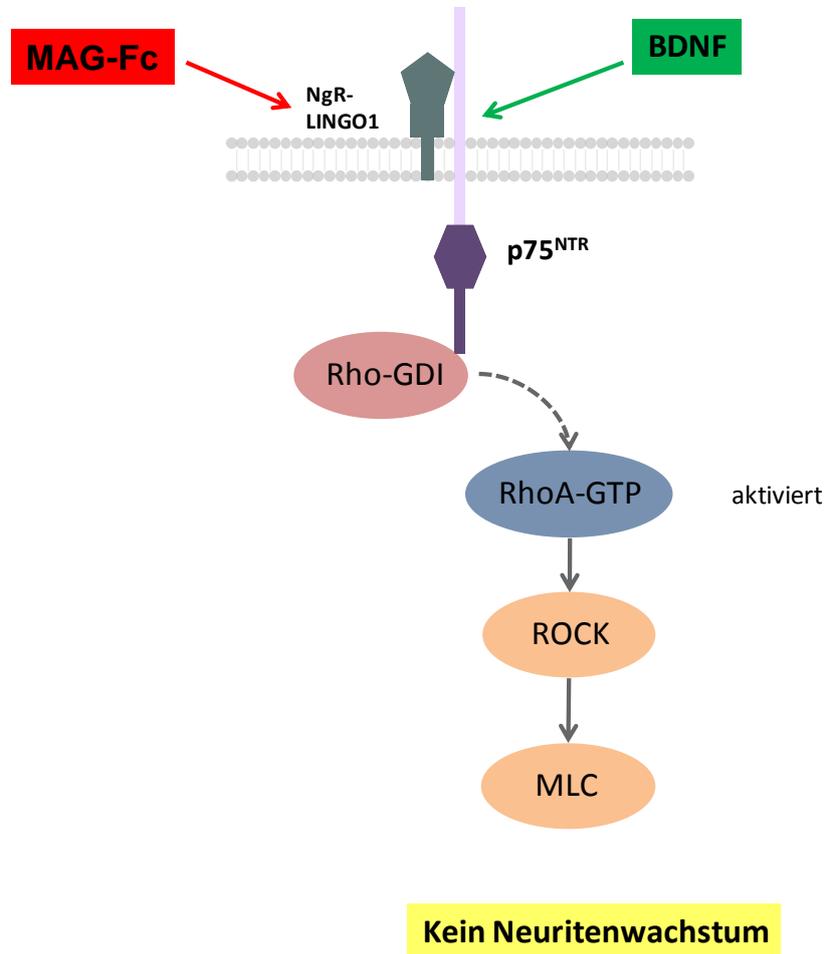
Formel zur Berechnung der nichtlinearen Regressionsanalyse:

$$y = \frac{\min + (\max - \min)}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{Hillslope}\right)}$$

Min: $1,64 \times 10^{-4}$

Max: 59026,65

Hillslope: 0,98



ERGEBNISSE

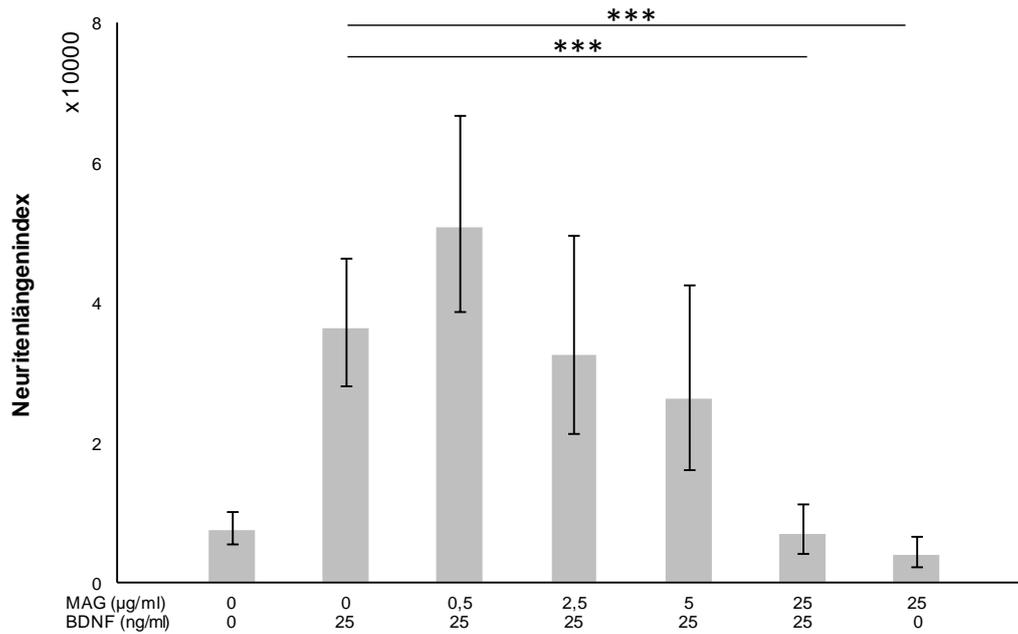


Abbildung 23: Induktion eines inhibitorischen Umfelds durch MAG

Einfluss von MAG-Fc auf das durch BDNF ausgelöste Neuritenwachstum. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von MAG im $p75^{\text{NTR}}$ -Signalweg. **Unten:** MAG-Fc wurde in Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 25 µg/ml mit 25 ng/ml BDNF und in einer Konzentration von 25 µg/ml ohne zusätzliches BDNF kultiviert. Das Neuritenwachstum konnte dosisabhängig vermindert werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

ERGEBNISSE

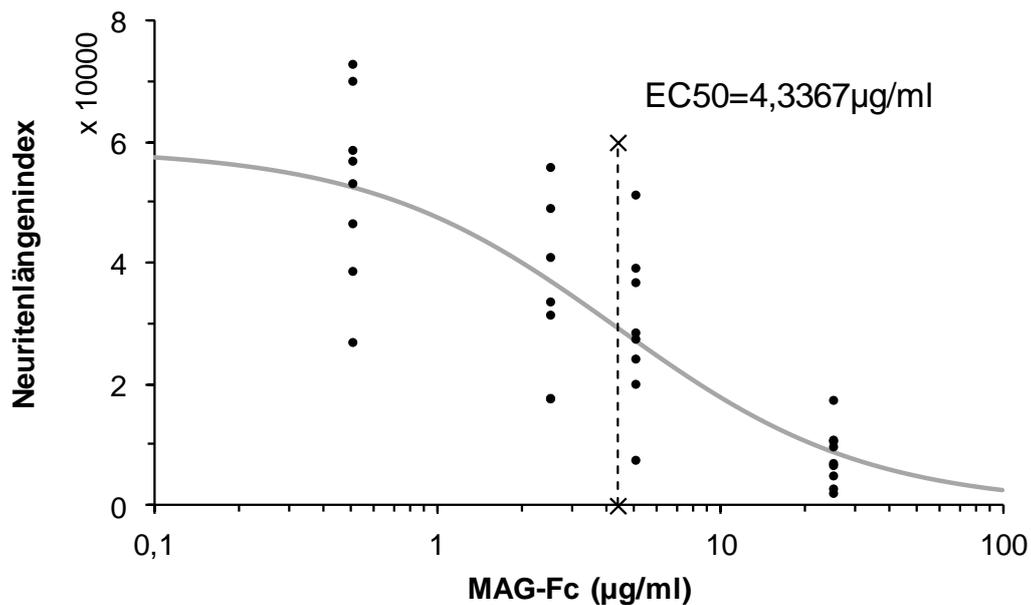


Abbildung 24: Graphische Darstellung der mittleren effektiven Konzentration von MAG-Fc

Als Grundlage für die Berechnung der nichtlinearen Regressionsanalyse wurden die Ausgangswerte für unterschiedliche Konzentrationen von MAG-Fc (0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml) verwendet. Daraus konnte sich eine EC50 von 4,3367 µg/ml errechnet werden.

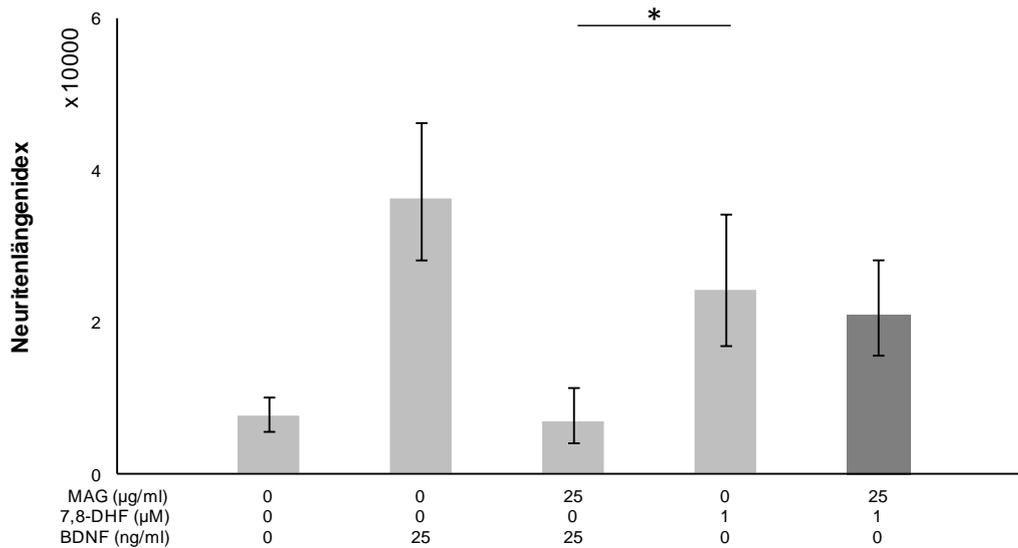
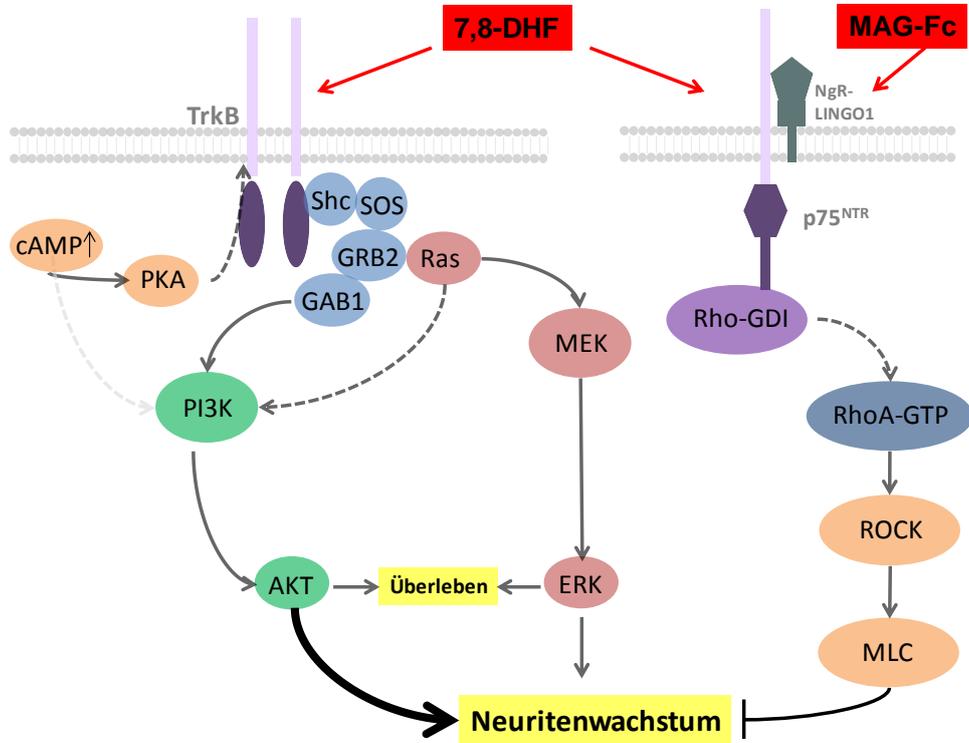
3.7 Einfluss von MAG auf die Wirkung von 7,8-DHF

In einem weiteren Versuchsansatz sollte das durch 7,8-DHF induzierte Neuritenwachstum der SGN in einem durch MAG hervorgerufenen inhibitorischen Umfeld getestet werden. Hierbei wurde die Hypothese aufgestellt, dass MAG in diesem Versuchsansatz keinen hemmenden Einfluss auf das Neuritenwachstum ausüben kann, da MAG seine Wirkung ausschließlich über p75^{NTR} entfaltet, wohingegen 7,8-DHF allein TrkB als Mediator für seinen wachstumsfördernden Effekt benutzt.

In der Kombination der beiden Substanzen konnte festgestellt werden, dass durch Zugabe von 25 µg/ml MAG (n=8) kein hemmender Effekt auf das durch 1 µM 7,8-DHF ausgelöste Neuritenwachstum erzielt werden konnte. Das

ERGEBNISSE

Ausmaß des Neuritenwachstums durch zusätzliche Gabe von MAG zu 7,8-DHF zeigte keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Testung mit 7,8-DHF.



ERGEBNISSE

Abbildung 25: 7,8-Dihydroxyflavon im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld

Einfluss von MAG-Fc auf das durch 7,8-DHF ausgelöste Neuritenwachstum. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. MAG-Fc wurde in einer Konzentration von 25 µg/ml mit 1 µM 7,8-DHF kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von 7,8-DHF und MAG im TrkB- und p75^{NTR}-Signalweg. **Unten:** Die Anwesenheit von MAG-Fc zeigte keinen Effekt auf das durch 7,8-DHF induzierte Neuritenwachstum. Negativ- und Positivkontrolle sowie Kontrollen mit der Kombination aus 25 ng/ml BDNF und 25 µg/ml MAG-Fc und 1 µM 7,8-DHF aufgetragen

3.8 Der ROCK-Inhibitor Y27632

Um den inhibitorischen Einfluss von p75^{NTR} auf das Neuritenwachstum selektiv zu unterbinden, erfolgte ein Eingriff in die hemmende Signalkaskade durch den ROCK-Inhibitor Y27632.

Die alleinige Gabe von 10 µM Y27632 (n=11) zeigte keinen wachstumsfördernden Effekt auf die Neuriten des Spiralganglions. Allerdings konnte bei zusätzlicher Gabe von 25 ng/ml BDNF und 10 µM Y27632 (n=9) ein im Vergleich zur Positivkontrolle gesteigertes Neuritenwachstum beobachtet werden. Hierbei konnte ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden.

ERGEBNISSE

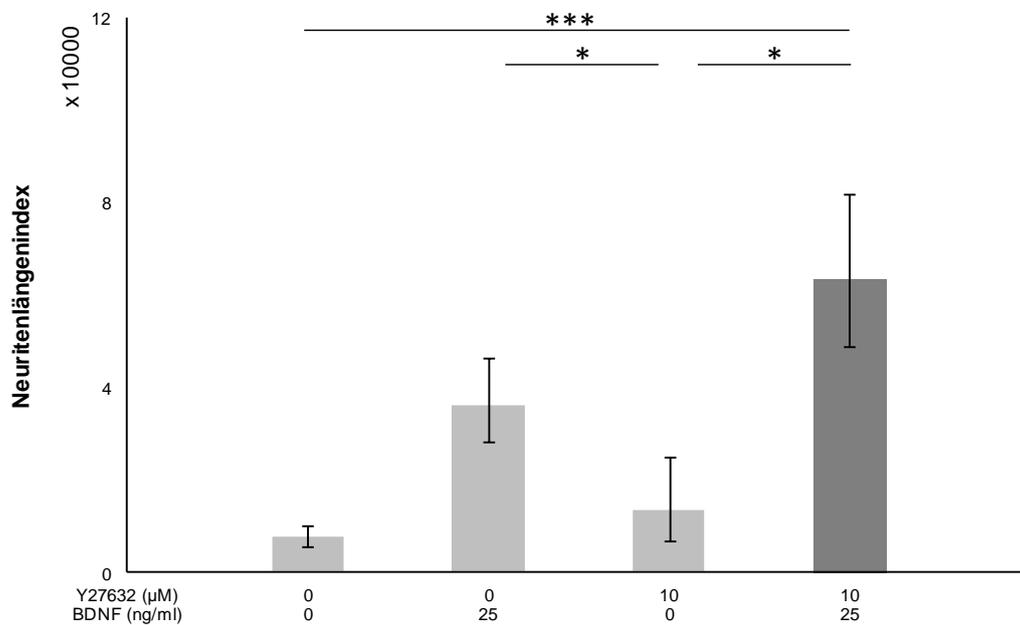
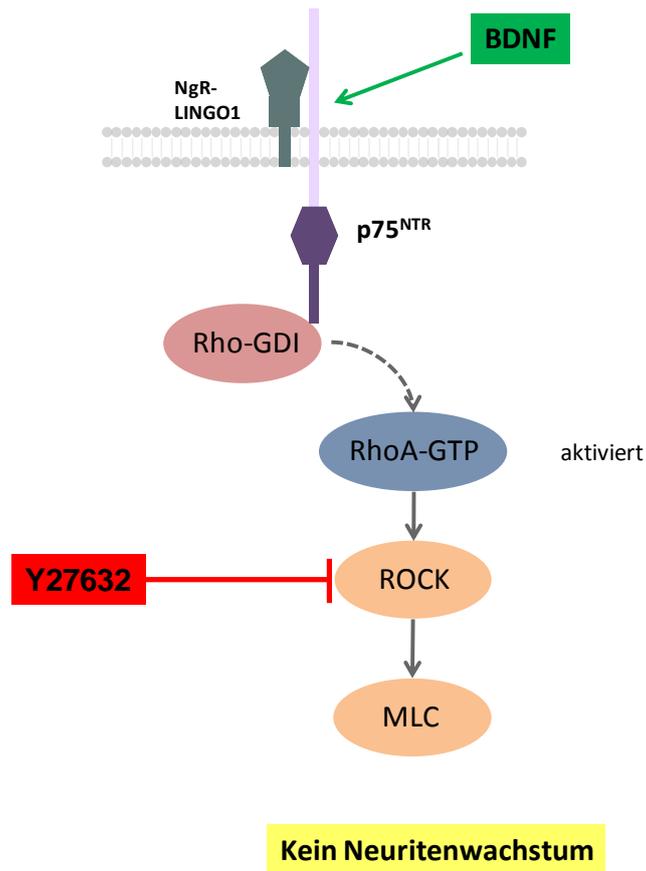


Abbildung 26: Der ROCK-Inhibitor Y27632

Wirkung des ROCK-Inhibitors Y27632 auf das Neuritenwachstum. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. Y27632 wurde in einer Konzentration von 10 μM und ein einer Konzentration von 10 μM mit 25

ERGEBNISSE

ng/ml BDNF kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion Y27632 im p75^{NTR}-Signalweg. **Unten:** Erst durch die Anwesenheit von BDNF konnte ein wachstumsfördernder Effekt durch Y27632 erzielt werden. Negativ- und Positivkontrolle aufgetragen.

3.9 Y27632 im inhibitorischen Umfeld

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Wirkung von Y27632 auf das durch MAG hervorgerufene inhibitorische Umfeld überprüft werden. Dazu wurden 10 µM Y27632 in Kombination mit 25 µg/ml MAG (n=11) inkubiert. Es konnte wie schon zuvor bei alleiniger Gabe von 10 µM Y27632 (n=9) kein stimulierender Einfluss auf das Neuritenwachstum registriert werden. Als in einem weiteren Schritt 10 µM Y27632 und 25 µg/ml MAG mit 25 ng/ml BDNF (n=8) kombiniert wurden, ließ sich ein deutlicher Effekt auf das Neuritenwachstum beobachten. Diese Kombination erreichte ein ausgeprägtes, über das Niveau der Positivkontrolle hinausgehendes Wachstum, das einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zur Negativkontrolle und einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zur Kontrolle aus der Kombination von 10 µM Y27632 und 25 µg/ml MAG aufwies. Somit kann festgehalten werden, dass der durch MAG ausgelöste inhibitorische Einfluss auf das durch das Neurotrophin BDNF hervorgerufene Neuritenwachstum von Spiralganglionneuronen durch Zugabe des ROCK-Inhibitors aufgehoben werden konnte.

ERGEBNISSE

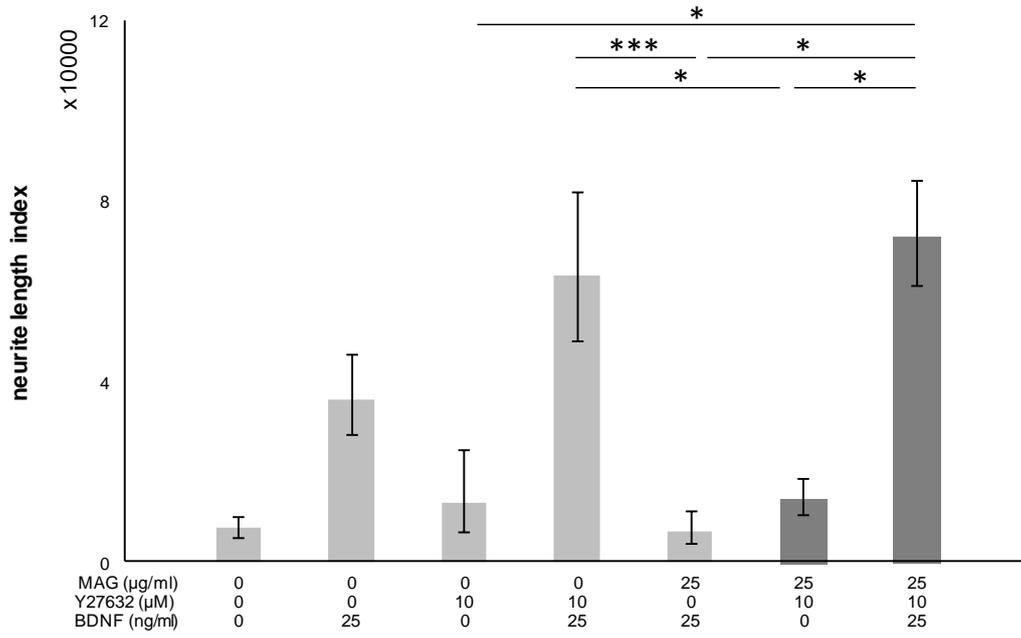
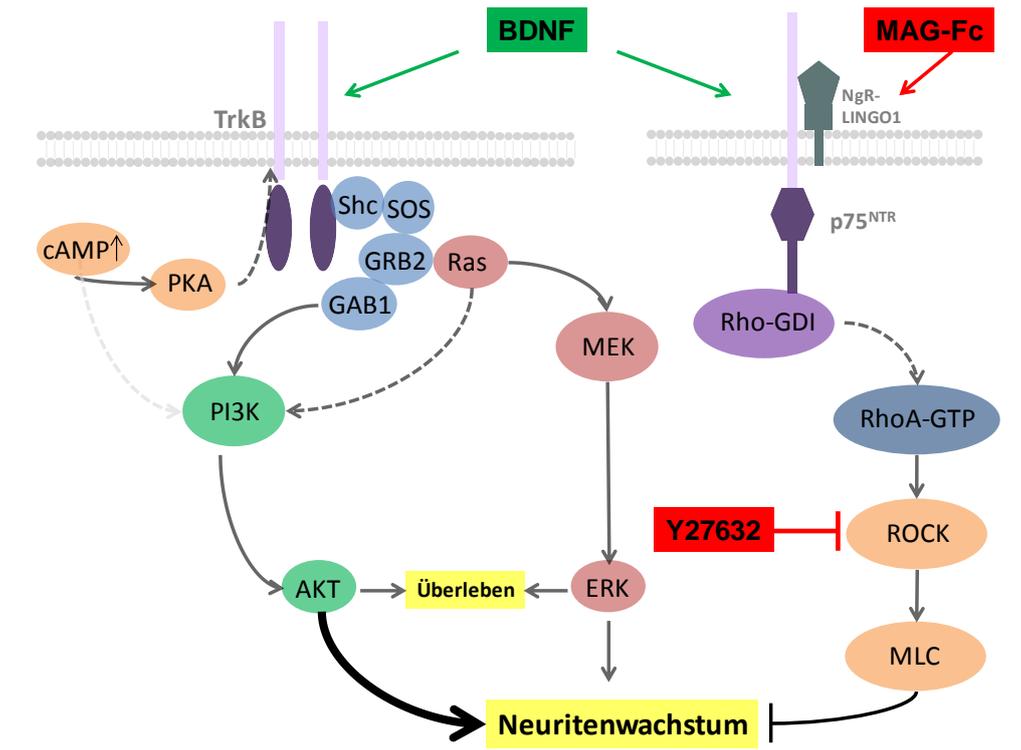


Abbildung 27: Y27632 im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld

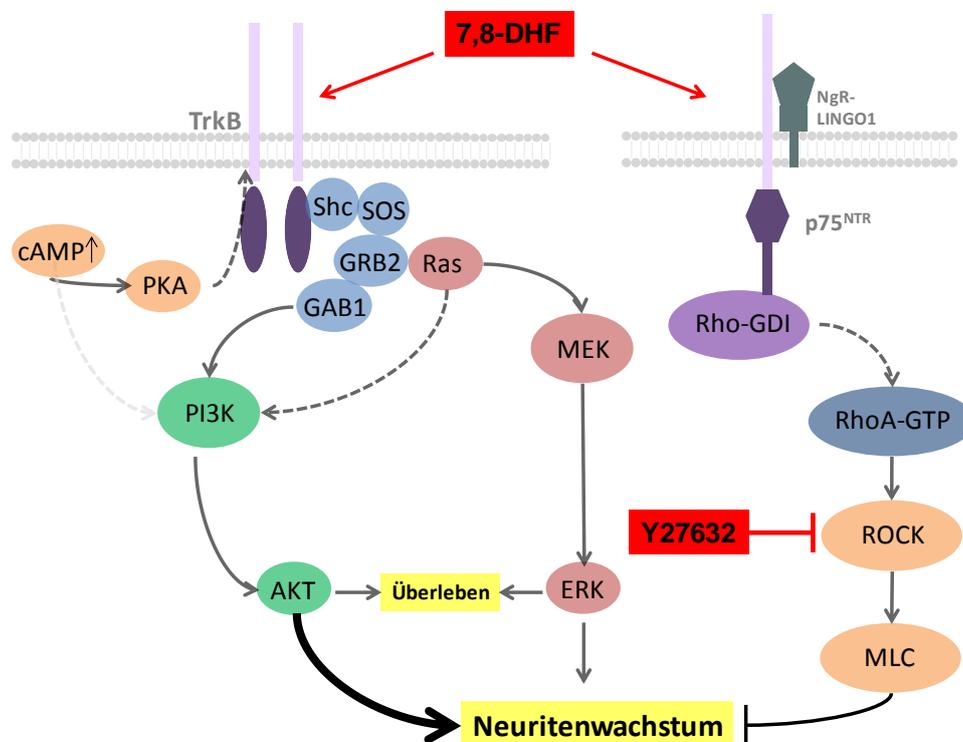
Die Wirkung des ROCK-Inhibitors Y27632 in Verbindung mit MAG-Fc auf das Neuritenwachstum wurde untersucht. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. Y27632 wurde in einer Konzentration von 10 µM mit 25 µg/ml MAG-Fc und in einer Konzentration von 10 µM mit 25 µg/ml MAG-Fc und 25 ng/ml BDNF kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von BDNF, Y27632 und MAG im TrkB- und p75^{NTR}-Signalweg. **Unten:** Die Anwesenheit von MAG-Fc hatte keinen Einfluss auf die Wirkung, die durch

ERGEBNISSE

Y27632 ausgelöst werden konnte. Auch in der Kombination aller drei Substanzen konnte MAG-Fc keine inhibitorische Aktivität hervorrufen. Negativ- und Positivkontrolle sowie Kontrollen mit 10 μM Y27632 und 25 $\mu\text{g/ml}$ MAG-Fc sind aufgetragen.

3.10 Kombination aus Y27632 mit 7,8-DHF

Ein weiteres Experiment sollte den Effekt von Y27632 auf das durch 7,8-DHF hervorgerufene Neuritenwachstum zeigen. Durch die Kombination der beiden Substanzen sollte sowohl der fördernde Einfluss über TrkB verstärkt als auch der hemmende Einfluss über $p75^{\text{NTR}}$ vermindert werden. Dazu wurden 10 μM Y27632 mit 1 μM 7,8-DHF (n=8) in Kultur gegeben. Das Ergebnis zeigte einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) in Bezug auf das Neuritenwachstum im Vergleich zur Negativkontrolle. Außerdem konnte der wachstumssteigernde Effekt von 7,8-DHF noch leicht verstärkt werden. Allerdings konnte kein über das Niveau der Positivkontrolle hinausgehendes Ergebnis beobachtet werden.



ERGEBNISSE

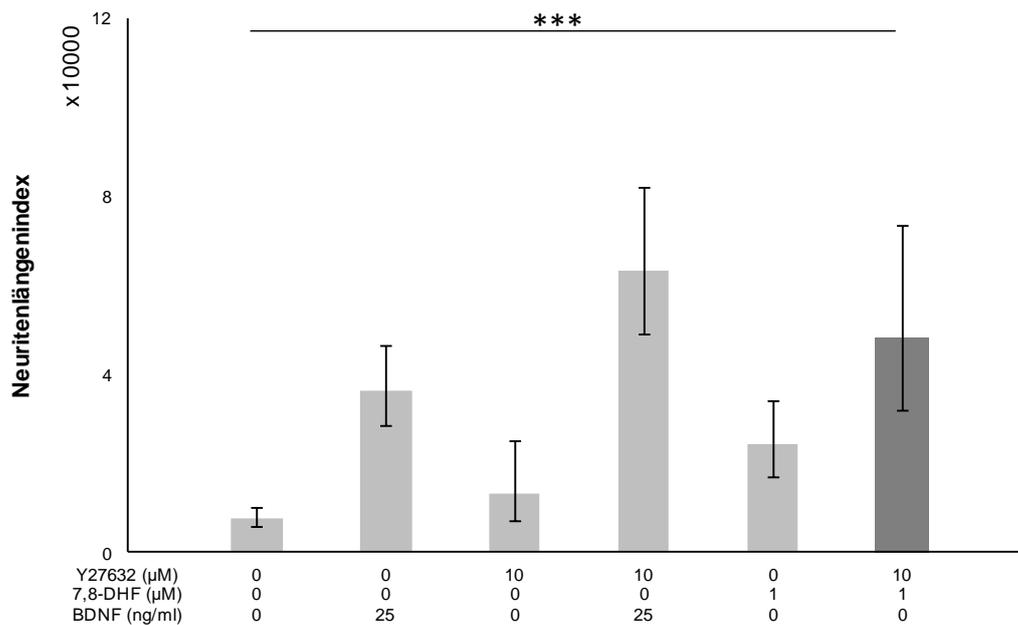


Abbildung 28: Kombination aus Y27632 und 7,8-Dihydroxyflavon

Die Wirkung des ROCK-Inhibitors Y27632 in Verbindung mit 7,8-DHF auf das Neuritenwachstum wurde untersucht. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. Y27632 wurde in einer Konzentration von 10 µM mit 1 µM 7,8-DHF kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von 7,8-DHF und Y27632 im TrkB- und p75^{NTR}-Signalweg. **Unten:** Durch die Kombination des selektiven TrkB-Agonisten mit dem selektiven ROCK-Inhibitor konnte ein im Gegensatz zur Kontrolle mit 1 µM 7,8-DHF gesteigertes Wachstumsverhalten festgestellt werden. Negativ- und Positivkontrolle sowie Kontrollen mit Y27632 und 7,8-DHF sind aufgetragen.

3.11 Kombination aus Y27632 mit 7,8-DHF im inhibitorischen Umfeld

Um die Wirkung des selektiven TrkB-Agonisten in Kombination mit dem selektiven ROCK-Inhibitor Y27632 im inhibitorischen Umfeld zu untersuchen, wurden Experimente mit der Kombination aus 1 µM 7,8-DHF, 10 µM Y27632 und 25 µg/ml MAG durchgeführt (n=10). Dabei konnte festgestellt werden, dass der durch MAG über p75^{NTR} vermittelte, hemmende Einfluss in diesem Zusammenhang unbedeutend für das Neuritenwachstum der Spiralganglionneurone ist. Im Vergleich zur Kontrolle mit 1 µM 7,8-DHF und der Kontrolle mit 1 µM 7,8-DHF und 10 µM Y27632 konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Neuritenwachstum registriert werden. Der

ERGEBNISSE

erzielte Wachstumseffekt der Neuriten blieb in Anwesenheit des inhibitorischen Umfelds unbeeinträchtigt.

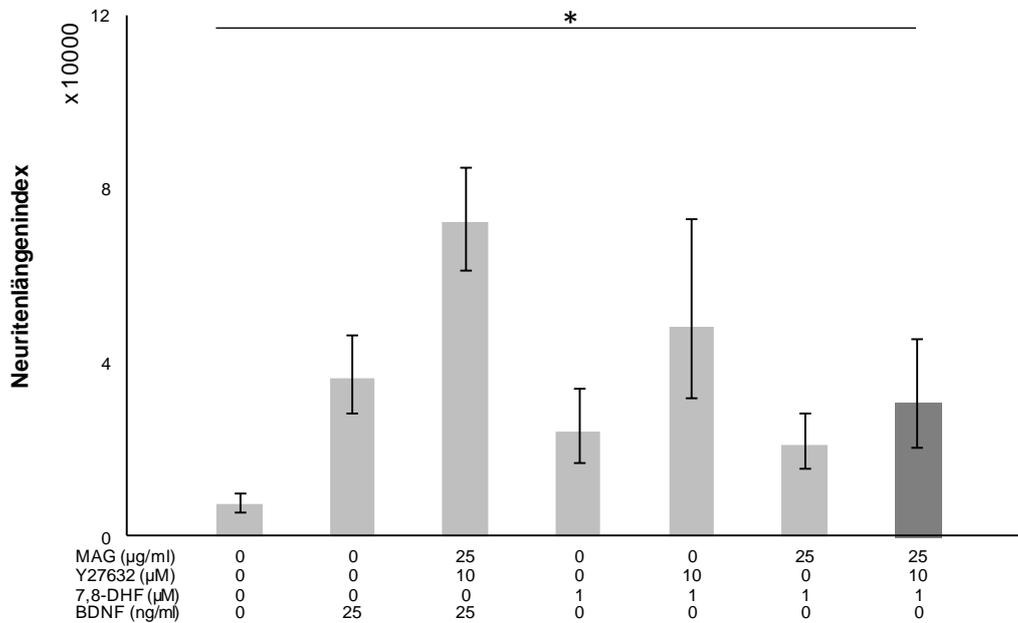
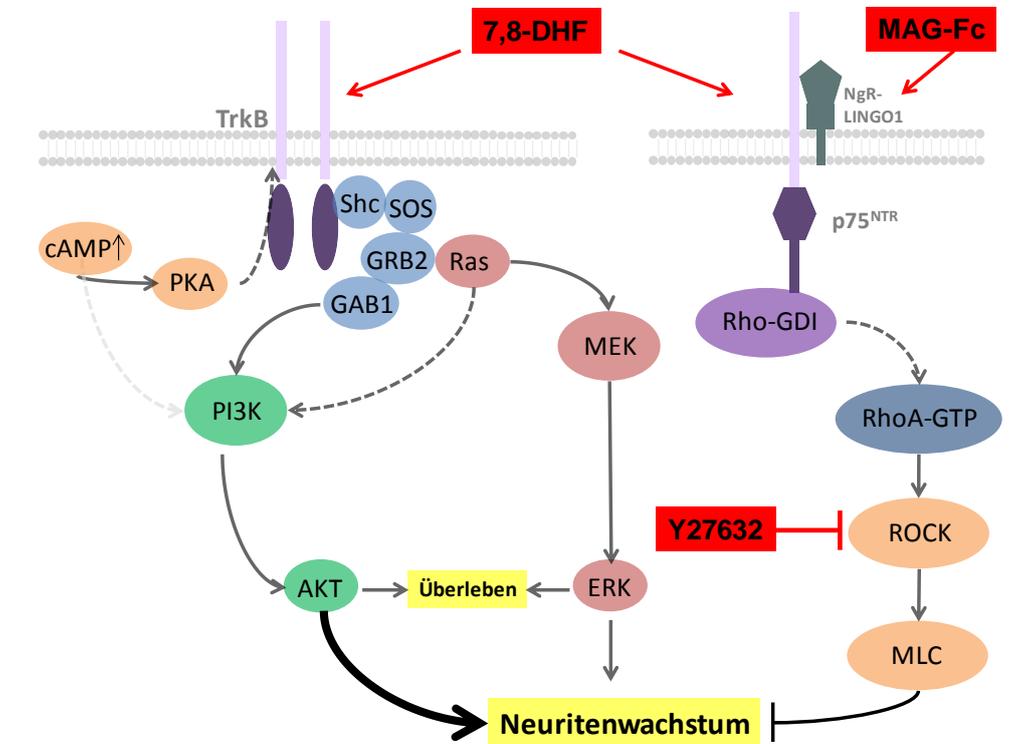


Abbildung 29: Kombination aus Y27632 und 7,8-Dihydroxyflavon im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld

ERGEBNISSE

Die Wirkung des ROCK-Inhibitors Y27632 in Verbindung mit 7,8-DHF und MAG-Fc auf das Neuritenwachstum wurde untersucht. Die Präparate wurden für 96 Stunden kultiviert. Y27632 wurde in einer Konzentration von 10 μM mit 1 μM 7,8-DHF und 25 $\mu\text{g/ml}$ MAG-Fc kultiviert. **Oben:** Schematische Darstellung der Interaktion von 7,8-DHF, MAG und Y27632 im TrkB- und p75^{NTR}-Signalweg. **Unten:** MAG-Fc hatte keinen Effekt auf das durch die Kombination von Y27632 und 7,8-DHF hervorgerufene Neuritenwachstum. Negativ- und Positivkontrolle, sowie Kontrollen mit Y27632, MAG-Fc und 7,8-DHF sind aufgetragen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von peripheren Neuriten von Spiralganglionneuronen unter Verwendung unterschiedlicher Kombinationen aus stimulierenden Komponenten wie Neurotrophinen, TrkB-Agonisten, und p75^{NTR}-Inhibitoren sowie wachstumshemmenden Substanzen wie myelin-assoziiertes Glykoprotein oder selektiver Inhibitoren innerhalb des TrkB-Signalwegs untersucht.

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass 7,8-DHF und Y27632 trotz Induktion eines inhibitorischen Umfelds ein stabiles Wachstum von peripheren Neuriten von SGN hervorrufen und somit als potenzielle Kandidaten für die angewandte technologische Weiterentwicklung von Cochlea-Implantaten zur Verfügung stehen.

4.1 Modelle zur Untersuchung des Neuritenwachstums von SGN

Das in dieser Arbeit verwendete Modell der Organkultur, das einem dynamischen biologischen System von Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs entspricht, erwies sich als hilfreich und zielführend, um Aussagen über das Wachstumsverhalten von SGN in Bezug auf deren natürliche Umgebung treffen zu können.

Um das Neuritenwachstum oder das Überleben von SGN *in vitro* zu untersuchen, stehen derzeit zwei gängige Versuchsmodelle zur Verfügung. Einerseits können Versuche an einzelnen Zellen und andererseits Versuche mit Organkulturen durchgeführt werden.

Ein wichtiger Vorteil von Einzelzellversuchen gegenüber Organkulturen liegt darin, eine standardisierte Anzahl von einzelnen Zellen für jeden Versuch untersuchen zu können. Somit können stets gleichbleibende Bedingungen für die einzelnen Experimente geschaffen werden. Ein elementarer Nachteil dieser Methode kann in dem fehlenden Zusammenhang zu einem in der Natur vorkommenden Zellverbund gesehen werden, dessen komplexe Einflüsse auf

DISKUSSION

das Auswachsen von Nervenzellfortsätzen daher nicht berücksichtigt werden können.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Modell einer Organkultur gearbeitet, um den physiologischen, *in vivo* vorherrschenden Bedingungen möglichst nahe zu kommen und somit einem Konzept zu folgen, das einfacher auf die natürlichen Bedingungen übertragen werden kann.

Neurotrophine wie BDNF und NT-3 fördern neuronales Überleben und Neuritenwachstum von SGN *in vitro* und *in vivo* durch die Bindung an Trk-Rezeptoren und die dadurch aktivierten PI3K/AKT- und MAPK-Signalkaskaden (Malgrange et al., 1996, Miller et al., 1997, Mou et al., 1997, Aletsee et al., 2001, Gillespie und Shepherd, 2005, Anderson et al., 2006, Vieira et al., 2007, Wei et al., 2007). Dies unterstreicht die herausragende Bedeutung von Neurotrophinen im Innenohr und somit deren entscheidende Bedeutung für die Weiterentwicklung moderner Therapieansätze im Zusammenhang mit der CI-Technologie.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell konnte die in vorangegangenen Studien erzielte Wachstumsstimulation der peripheren Neuriten des Spiralganglions durch Neurotrophine wie BDNF bestätigen (Brors et al., 2008, Hansen et al., 2009). Ein Nachteil des Modells einer Organkultur kann darin gesehen werden, mit jeweils minimal abweichenden Rahmenbedingungen die einzelnen Versuche zu arbeiten. Durch die Mikropräparation eines ganzen Zellverbundes mit mehreren tausend Zellen lässt sich beispielsweise nicht genau abgrenzen, wie viel Zellgewebe entnommen wurde und ob jeweils die gleiche Menge an funktionell erhaltenem Gewebe vorhanden ist. Diese große biologische Variabilität der einzelnen Versuche kann ein Erklärungsansatz für die relativ hohe Streubreite innerhalb eines Experiments sein.

Ein entscheidender Vorteil des Modells einer Organkultur ist jedoch, dass man die Zellen in ihrem funktionalen Verbund als Ganzes betrachten und so möglicherweise die Funktionalität und den Einfluss anderer Zellpopulationen auf das erzielte Ergebnis in die Auswertung mit einbeziehen kann. Außerdem konnte durch die Einführung einer adaptierten Sholl-Methode eine

DISKUSSION

standardisierte Form der Auswertung für dieses Modell angepasst werden. Des Weiteren kann durch die Anpassung der Sholl-Methode ausgeschlossen werden, dass Bildartefakte oder Überreste nicht neuronalen Gewebes in die Auswertung der Neuritenlänge mit einbezogen werden.

Somit bleibt festzuhalten, dass das Modell der Organkultur für die spezifische Fragestellung des Neuritenwachstums von SGN geeignet ist.

4.2 Interaktion der beteiligten Rezeptoren

Das Zusammenspiel von TrkB und p75^{NTR} ist komplex. Lange Zeit galt p75^{NTR} als reiner Neurotrophinrezeptor, bevor er als Schlüsselkomponente für die Bindung von Myelininhibitoren wie MAG über den NgR-LINGO1-p75^{NTR}-Rezeptorkomplex identifiziert werden konnte (Wong et al., 2002, Yamashita et al., 2002). Durch Bindung von Neurotrophinen an p75^{NTR} können stark variierende Effekte hervorgerufen werden, die vom Aufrechterhalten neuronalen Überlebens bis hin zur Induktion der Apoptose reichen (Huang und Reichardt, 2003, Nykjaer et al., 2005). Im Zusammenhang eines induzierten inhibitorischen Umfelds limitiert die Bindung von Neurotrophinen wie BDNF an p75^{NTR} den durch die Bindung an TrkB ausgelösten Wachstumseffekt (Domeniconi et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002a, Mi et al., 2004, Fobian et al., 2010). Die Tatsache, dass Neurotrophine in Anwesenheit von Myelininhibitoren in der Regel keine wachstumssteigernde Wirkung entfalten können (Cai et al., 1999), gibt Anlass für die Erarbeitung von Strategien, entweder das *in vivo* vorkommende inhibitorische Umfeld zu umgehen oder aber pharmazeutisch zu durchbrechen.

Aus diesem Anlass wurde in der vorliegenden Arbeit nach möglichen Lösungsansätzen gesucht, um das Neuritenwachstum von SGN zum einen unabhängig von Neurotrophinen zu machen und zum anderen die repressive Komponente durch p75^{NTR} so auszuschalten, dass exogen zugeführte Neurotrophine und andere wachstumsfördernde Substanzen ihre stimulierende Wirkung ohne hemmenden Einfluss entfalten können.

DISKUSSION

Die beteiligten Signalwege, die ihre Wirkung über eine Aktivierung von TrkB und p75^{NTR} vermitteln, wurden in ihrem funktionellen Zusammenhang in der Cochlea erstmals in dieser Arbeit untersucht.

4.3 MAG induziert ein inhibitorisches Umfeld

Eine Schädigung innerhalb des Innenohrs, unabhängig von ihrer Ätiologie, kann in einem Haarzelluntergang resultieren, wodurch die afferenten Anteile der SGN ihre Zielstruktur verlieren. Funktionell geschädigte Haarzellen können sich nach derzeitigem Kenntnisstand nicht spontan regenerieren (Hawkins, 1973, Roberson und Rubel, 1994, Warchol, 2011). Mit dem Untergang des sensorischen Zellgewebes kommt es zu einem Rückzug der Nervenendigungen des versorgenden neuronalen Gewebes, was als Waller'sche Degeneration bezeichnet wird (Shibata et al., 2011). Jedoch bleiben einige Neurone des Spiralganglions erhalten, die für eine Therapie mit Cochlea-Implantaten von zentraler Bedeutung sind (Brigande und Heller, 2009, Linthicum und Fayad, 2009). Die Fähigkeit zur Regeneration von Neuronen des Spiralganglions nach dem Untergang von Haarzellen hängt zum einen stark von der Art der Schädigung, zum anderen jedoch von endogenen, wachstumshemmenden Einflüssen ab (Shibata et al., 2011).

Nach heutigem Kenntnisstand sind mit MAG, NOGO-A und OMgp drei zentrale Myelin-assoziierte Proteine bekannt, die die Regenerationsfähigkeit neuronalen Zellgewebes negativ beeinflussen (Llorens et al., 2011, Pernet und Schwab, 2012). Alle drei genannten Myelininhibitoren binden mit einer hohen Affinität an den inhibitorischen NgR-LINGO1-Komplex (Domeniconi et al., 2002, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002b, Oertle et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurden Versuche an Tieren durchgeführt, die jeweils homozygote Mutationen für die einzelnen Myelininhibitoren aufwiesen, um festzustellen, welches der Proteine den größten inhibitorischen Einfluss besitzt (Cafferty et al., 2010). Interessanterweise ist hier zu erwähnen, dass beispielsweise MAG im Übergang vom embryonalen zum funktionell reifen neuronalen Stadium seine Funktion bezüglich des Neuritenwachstums verändert. Die Anwesenheit von

DISKUSSION

MAG in embryonalen Neuronen wirkt stimulierend auf das Neuritenwachstum. In postnatalem neuronalen Gewebe kehrt sich dieser Effekt jedoch um und MAG übt dann größtenteils einen hemmenden Einfluss aus (Murray et al., 2009).

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass p75^{NTR} die zentrale Bindungskomponente für den inhibitorischen NgR-LINGO1-Rezeptorkomplex darstellt, der bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Neuronen auf der Oberfläche exprimiert wird (Josephson et al., 2002) und der alle drei genannten Myelin-Proteine binden kann (Wang et al., 2002a, Mi et al., 2004). p75^{NTR} wird dabei als Korezeptor für die intrazelluläre Signaltransduktion verwendet (Filbin, 2003). Wie bereits erwähnt, kommt es durch die myelininduzierte Aktivierung von p75^{NTR} zur Interaktion mit Rho-GDI (Yamashita et al., 1999, Park et al., 2010), wodurch die RhoA-ROCK-Kaskade in Gang gesetzt wird, die unter anderem verantwortlich für die intrazelluläre Vermittlung eines inhibitorischen Signals für neuronales Wachstum ist.

In Anwesenheit von Myelininhibitoren verlieren Neurotrophine ihre Fähigkeit, das Auswachsen von Neuriten zu stimulieren (Cai et al., 1999). Durch die gleichzeitige Bindung von Neurotrophinen an TrkB und p75^{NTR} (He und Garcia, 2004) im inhibitorischen Umfeld verringern Neurotrophine somit die eigenen, über TrkB hervorgerufenen stimulierenden Effekte auf das Neuritenwachstum (Williams et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmals ein Modell eingeführt, das die Einflüsse des myelininduzierten Umfelds auf die Wirkung von Neurotrophinen wie BDNF im Spiralganglion der Mauscochlea untersucht. Die inhibitorische Wirkung von MAG in Form eines löslichen Fc-Chimers (Tang et al., 1997) auf das Neuritenwachstum von SGN konnte bestätigt werden, indem der durch BDNF ausgelöste Wachstumseffekt vollständig reduziert werden konnte. Somit gelang es in dieser Studie erstmals, ein durch MAG erzeugtes inhibitorisches Umfeld zu generieren, das eine durch Neurotrophine ausgelöste stimulierende Wirkung auf das Neuritenwachstum von SGN vollständig aufhebt. Da die Neuriten des SGN *in vivo* fast vollständig von einer Myelinscheide umgeben sind, könnten durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eines

DISKUSSION

inhibitorischen Modells durch Myelin somit weitere Experimente *in vitro* durchgeführt werden, welche die natürlichen Verhältnisse realistischer nachbilden und somit exaktere Schlussfolgerungen in Bezug auf das Neuritenwachstum im Innenohr zulassen.

4.4 7,8-DHF – ein selektiver TrkB-Agonist

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass einerseits schon eine geringe Anzahl an verbliebenen Neuronen in der funktionell geschädigten Cochlea die Fähigkeit zur spontanen Aussprossung besitzen (Bohne und Harding, 1992, Glueckert et al., 2008) und dass andererseits diese Fähigkeit durch die Gabe von exogen zugeführten Neurotrophinen weiter unterstützt wird (Richardson et al., 2008, Shibata et al., 2010). Der therapeutische Einsatz von Neurotrophinen in Bezug auf das Neuritenwachstum von SGN ist durch das *in vivo* vorherrschende inhibitorische Umfeld, das durch die Aktivität von Myelinzellen induziert wird, jedoch limitiert (Cai et al., 1999, Williams et al., 2005). Des Weiteren sprechen pharmakokinetische Eigenschaften von BDNF wie z.B. eine sehr kurze Halbwertszeit (Poduslo und Curran, 1996, Kishino et al., 2001) gegen einen therapeutischen Einsatz von Neurotrophinen. Daher werden schon seit längerem potenzielle BDNF-Mimetika (O'Leary und Hughes, 2003, Fletcher und Hughes, 2006) und TrkB-Agonisten (Williams et al., 2005, Qian et al., 2006, Jang et al., 2009, Fobian et al., 2010, Jang et al., 2010a, Moubarak et al., 2010, Cazorla et al., 2011) auf ihre Fähigkeit zur TrkB-Stimulation untersucht. Dabei sind ein stabiles pharmakokinetisches Profil und eine möglichst selektive Bindung an TrkB von entscheidender Bedeutung.

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit das natürlich vorkommende Flavonderivat 7,8-Dihydroxyflavon, ein selektiver TrkB-Agonist (Jang et al., 2010b), auf seine Wirksamkeit bezüglich des Neuritenwachstums von SGN untersucht. Flavonoide sind natürlich vorhandene, essentielle Bestandteile in vielen unterschiedlichen Sorten von Früchten, Gemüse und Wein (Vauzour et al., 2008). Dabei entfalten sie eine breite biologische Bandbreite und wirken unter anderem als Antioxidantien krebsvorbeugend (Harborne und Williams,

DISKUSSION

2000). Des Weiteren wird vermutet, dass Flavonoide das Potenzial zur Steigerung der Gedächtnisleitung und kognitiver Funktionen in sich tragen, indem sie neuroprotektiv wirken und die Regenerationsfähigkeit von Neuronen stimulieren (Spencer, 2008a, b, Vauzour et al., 2008). Sie nutzen dabei den über TrkB vermittelten PI3K/AKT- und MAPK-Signalweg (Maher et al., 2006, Vauzour et al., 2007), um diese Wirkung zu erreichen (Vauzour et al., 2008). Beide Signalwege werden u.a. durch eine Dimerisierung und anschließende Transautophosphorylierung von TrkB aktiviert. Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, auf welche Art und Weise die TrkB-Dimerisierung durch 7,8-DHF erreicht wird. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von 7,8-DHF erweisen sich dabei jedoch als günstig und stabil (Liu et al., 2010). Somit ist 7,8-DHF potenziell für weitere *in vivo*- und *in vitro*-Studien und für einen möglichen Einsatz in der therapeutischen Anwendung geeignet. Das Wirkspektrum und die damit verbundene therapeutische Anwendungsbreite von 7,8-DHF ist Thema gegenwärtiger Forschung und unterstreicht dessen zunehmende Bedeutung im Zusammenhang mit unterschiedlichen neurologischen Fragestellungen (Blugeot et al., 2011, Devi und Ohno, 2012, Johnson et al., 2012, Mantilla und Ermilov, 2012).

Durch eine in dieser Arbeit durchgeführte Stimulation mit 7,8-DHF konnte das Neuritenwachstum von SGN angeregt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die hervorgerufenen Wachstumseffekte über einen von TrkB unabhängigen Signalweg vermittelt wurden, ist dabei jedoch gering. In dieser Arbeit konnte der Einfluss auf das über TrkB vermittelte Neuritenwachstum von SGN durch die Zugabe des spezifischen Tyrosinkinaseinhibitors K252a zu 7,8-DHF erstmals nachgewiesen werden. Somit bleibt festzuhalten, dass obwohl ein direkter immunhistochemischer Nachweis hier nicht erbracht werden konnte, trotzdem vieles dafür spricht, dass 7,8-DHF tatsächlich TrkB für die Vermittlung seiner stimulierenden Effekte nutzt.

Allerdings wurde weiterhin beobachtet, dass der durch 7,8-DHF erreichte Wachstumseffekt nur ca. 66,5% des durch BDNF ausgelösten Wachstumsniveaus erreichte.

DISKUSSION

Die gleichzeitige Bindung von Neurotrophinen an TrkB und p75^{NTR} in Anwesenheit von Myelininhibitoren und die damit verbundene Aktivierung eines inhibitorischen Signalkomplexes stellt ein zentrales Problem für die Erarbeitung neuer Strategien zur Förderung des Neuritenwachstums durch Neurotrophine dar. Der Nachweis, dass BDNF im inhibitorischen Umfeld keine stimulierende Wirkung auf das Neuritenwachstum entfalten kann, wurde von Williams et al., 2005, erbracht. Die Gruppe um Williams konnte an Neuronen des Kleinhirns zeigen, dass p75^{NTR} die zentrale inhibitorische Komponente für das Neuritenwachstum darstellt. Dort wurde demonstriert, dass ein weiteres Neurotrophin – NGF – mit BDNF um die Bindungsstelle an p75^{NTR} konkurriert, nicht aber um die Bindungsstelle an TrkB. Bei überschüssiger Zugabe von NGF in die Kleinhirnzellkulturen wurden daher alle Bindungsstellen von p75^{NTR} durch NGF abgesättigt. Dadurch konnte BDNF in Anwesenheit von MAG einen deutlich positiven Effekt auf das Neuritenwachstum erreichen (Williams et al., 2005).

Eine weitere Möglichkeit, die über p75^{NTR} vermittelte inhibitorische Komponente zu umgehen, könnte darin liegen, 7,8 DHF einzusetzen und dessen Eigenschaft als selektiver TrkB-Agonist zu nutzen, indem der p75^{NTR}-vermittelte Einfluss umgangen wird und somit das Neuritenwachstum auch im inhibitorischen Umfeld angeregt werden kann.

Unterschiedliche TrkB-Agonisten sind in zahlreichen Studien Gegenstand derzeitiger Forschung (Bai et al., 2010, Hu et al., 2010, Schmid et al., 2012). Obwohl die Wirkung dieser Agonisten in vielfältigen neuronalen Fragestellungen intensiv beforscht wurde (Tsai, 2007, Liu et al., 2010, Andero et al., 2011, Devi und Ohno, 2012, Liu et al., 2012), auch in Bezug auf das Überleben von Spiralganglionneuronen in Kultur (Yu et al., 2012), blieb dennoch offen, ob ein durch selektive TrkB-Stimulation ausgelöster Effekt auch im inhibitorischen Umfeld bestätigt werden kann. Daher wurde 7,8-DHF und seine Wirkung auf das Neuritenwachstum im inhibitorischen Umfeld in der vorliegenden Arbeit überprüft.

Im Gegensatz zu BDNF, das in seiner Wirkung durch die Anwesenheit eines myelininduzierten inhibitorischen Umfelds vollständig restringiert wurde, konnte

DISKUSSION

die stimulierende Wirkung von 7,8-DHF auch im inhibitorischen Umfeld bestätigt werden. Die Fähigkeit von 7,8-DHF in Anwesenheit von MAG Neuritenwachstum zu stimulieren, liegt vermutlich an der fehlenden Bindungsstelle für p75^{NTR}. Allerdings bleibt abzuwarten, wie sich die positiven Effekte von 7,8-DHF in Verbindung mit MAG *in vivo* darstellen.

Im Zuge der technischen Weiterentwicklung von Cochlea-Implantaten, die verschiedene Ansätze wie bsp. Drug-Delivery-Systeme oder die Beschichtung der Elektrodenträger mit bioaktiven Substanzen zur kontinuierlichen Applikation verfolgen (Tykocinski und Cowan, 2005, Pettingill et al., 2007, Richardson et al., 2007, Volkenstein et al., 2009, Jolly et al., 2010), könnte 7,8-DHF als möglicher Kandidat für eine gezielte Anregung des Neuritenwachstums ernsthaft in Betracht gezogen werden. Allerdings bleibt abzuwarten, wie sich 7,8-DHF im Tierversuchsmodell verhält und ob die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanz eine klinische Anwendung zulassen.

4.5 Y27632 greift in die p75^{NTR}-Signalkaskade ein

Ein alternativer Ansatz zur Stimulation des Neuritenwachstums von SGN ist der direkte Eingriff in den inhibitorischen Signalweg, der durch die gleichzeitige Bindung von Neurotrophinen an p75^{NTR} und den durch die Aktivität von Myelinzellen wachstumshemmenden NgR-LINGO1-Rezeptorkomplex ausgelöst wird.

In mehreren Studien, die an unterschiedlichem Zellgewebe neuronalen Ursprungs durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass Rho-GTPasen wichtige Funktionen im Zusammenhang mit neuronalem Wachstum einnehmen (Sarner et al., 2000, Yamaguchi et al., 2001, Aoki et al., 2004). Dabei wird das Neuritenwachstum durch die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 aktiviert, wohingegen die Aktivierung von Rho zu einem Zusammenbrechen der axonalen Wachstumskegel führt und eine entscheidende Rolle für die Inhibition des Neuritenwachstums spielt (Jalink et al., 1994, Jin und Strittmatter, 1997, Kozma et al., 1997, Hirose et al., 1998, Kranenburg et al., 1999, Lehmann et al., 1999, Fournier et al., 2003). Downstream von Rho befindet sich die Rho-

DISKUSSION

assoziierte Kinase (ROCK), die eine Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase bewirkt und regulatorisch die Kontraktilität von Aktinfilamenten innerhalb des Zytoskeletts beeinflusst und somit direkt Einfluss auf das Neuritenwachstum nimmt (Kimura et al., 1996, Amano et al., 1997, Schmandke und Strittmatter, 2007).

Für die Inhibition von ROCK konkurriert der in dieser Arbeit verwendete ROCK-Inhibitor Y27632 mit dessen Bindungsstelle für ATP (Ishizaki et al., 2000). Y27632 inhibiert vornehmlich ROCK-II, wobei auch die Inhibition von ROCK-I sowie der Protein Kinase C-abhängigen Protein Kinase (PRK2) Einfluss auf die Regulation des Neuritenwachstums haben (Vincent und Settleman, 1997, Darenfed et al., 2007). So konnte das durch neurotrophe Faktoren vermittelte Neuritenwachstum durch die Zugabe von Y27632 an kultivierten PC12-Zellen signifikant gesteigert werden (Minase et al., 2010).

Für das Spiralganglion wurde bereits ein experimenteller Ansatz zur Stimulation des Neuritenwachstums durch einen weiteren ROCK-Inhibitor L-1152 untersucht (Lie et al., 2010). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen den positiven Effekt eines ROCK-Inhibitors auf das Neuritenwachstum von SGN. Durch Zugabe von 10 μ M Y27632 konnte das durch BDNF ausgelöste Neuritenwachstum *in vitro* um 75,1% gesteigert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die zentrale Bedeutung von ROCK für das Neuritenwachstum von SGN und bestätigt die Ergebnisse von Lie et al, 2010. Des Weiteren sprechen die Ergebnisse dafür, dass BDNF in den Positivkontrollen trotz stabilem Wachstum nicht die volle Wirkung entfalten kann. Dafür ist vermutlich die gleichzeitige Bindung des NgR-LINGO1-Rezeptorkomplexes an p75^{NTR} verantwortlich, der die Wirkung inhibitorischer Proteine wie NOGO, OMgp und MAG vermittelt (Goldberg und Barres, 2000, Sandvig et al., 2004). Dadurch wird die RhoA-ROCK-Kaskade in Gang gesetzt und somit die potenzielle Wirkung von BDNF, die durch Zugabe eines ROCK-Inhibitors zusätzlich ausgeschöpft werden kann, unterdrückt. In diesem Zusammenhang spielt eine wichtige Rolle, dass durch Inhibition von ROCK durch Y27632 nicht nur die inhibitorische p75^{NTR}-Signalkaskade unterbrochen wird, sondern durch ROCK-Inhibition interessanterweise gleichzeitig eine

DISKUSSION

intrazelluläre Phosphorylierung der MAPK und AKT stattfindet (Lingor et al., 2008). Diese beiden Signalwege sind vor allem für die durch Neurotrophine über TrkB vermittelten Wachstumseffekte verantwortlich. Jedoch bleibt die alleinige Gabe des ROCK-Inhibitors Y27632 ohne Zugabe von exogenem BDNF ohne Effekt auf das Längenwachstum der Neuriten, was die These unterstreicht, dass Neurotrophine oder neurotrophinähnliche Substanzen zur Stimulierung von Spiralganglionneuriten notwendigerweise vorhanden sein müssen.

Vor diesem Hintergrund stellt die selektive pharmakologische Intervention in die $p75^{\text{NTR}}$ -Signalkaskade durch den Einsatz von ROCK-Inhibitoren wie Y27632 einen interessanten und vielversprechenden Ansatz zur Stimulation des Neuritenwachstums von SGN dar. Damit könnte ein weiterer Schritt in der Weiterentwicklung der bisher vorhandenen CI-Technologie durch eine besser zu kontrollierende Überbrückung der Distanz zwischen Sender (Elektrode) und Empfänger (neuronales Gewebe) gemacht werden.

4.6 Selektive $p75^{\text{NTR}}$ -Inhibition im inhibitorischen Umfeld

Neben der selektiven TrkB-Stimulation durch 7,8-DHF stellt die selektive Unterbrechung der $p75^{\text{NTR}}$ -Signalkaskade einen weiteren Mechanismus zur Umgehung des über $p75^{\text{NTR}}$ -vermittelten inhibitorischen Einflusses dar. Dadurch wird der Weg für die wachstumsstimulierenden Effekte durch Neurotrophine wie BDNF geebnet. Hierbei existieren zwei grundsätzliche Überlegungen, wie das durch Myelin induzierte inhibitorische Umfeld überwunden werden kann. Einerseits besteht die Möglichkeit, die Myelininhibitoren selbst oder deren Zielrezeptoren durch Antikörper oder Peptide gezielt zu beeinflussen.

Andererseits könnte die intrinsische Antwort des Neurons auf das Vorhandensein von Myelin so verändert werden, dass die Wahrnehmung von Myelin als Wachstumsinhibitor modifiziert wird und somit kein inhibitorischer Einfluss mehr von Myelin ausgeht (Filbin, 2003).

DISKUSSION

Zu Beginn der Entwicklung, die sich mit der Reduktion von inhibitorischen Einflüssen beschäftigt, wurde lange Zeit mit Antikörpern wie dem IN-1-Antikörper zur direkten Blockierung der durch NOGO-A hervorgerufenen inhibitorischen Effekte geforscht (Caroni und Schwab, 1988a, Schnell und Schwab, 1990, Bregman et al., 1995). Mit der Entdeckung von NgR als zentralem Bindungsprotein für alle drei Myelininhibitoren kam die Vorstellung auf, an diesem Knotenpunkt der Inhibition für das Neuritenwachstum ebenfalls einzugreifen, um das Zusammenspiel von NgR mit $p75^{NTR}$ zu verhindern (Fournier et al., 2001, Liu et al., 2002, Wang et al., 2002b). Dazu wurden diverse Studien bezüglich der Blockade von NgR veröffentlicht. Es konnte sowohl an NgR-knockout-Mäusen (Kim et al., 2004) als auch durch eine pharmakologische Blockade durch kompetitive Bindungspeptide und NgR-Antikörper (Domeniconi et al., 2002, GrandPre et al., 2002) gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Myelininhibitoren ein deutliches Neuritenwachstum *in vitro* erreicht werden konnte. So wurden diese positiven Ergebnisse mit der Strategie, NgR auszuschalten, bereits in klinischen Phase-I-Studien im Zusammenhang mit Rückenmarksverletzungen transferiert (Zorner und Schwab, 2010). Ebenso konnte durch den Einsatz von spezifischen $p75^{NTR}$ -Antikörpern, die kompetitiv mit NgR um die Bindungsstelle an $p75^{NTR}$ konkurrieren, jedoch kein intrazelluläres Signal vermitteln, ein positiver Effekt auf das Neuritenwachstum nachgewiesen werden (Wang et al., 2002a).

Eine andere Möglichkeit, die myelininduzierte Inhibition zu überwinden, besteht darin, das Neuron selbst zu verändern, sodass es nicht mit einem Zusammenbrechen der Wachstumskegel oder der Hemmung des Neuritenwachstums auf die Anwesenheit der Myelinproteine antwortet.

Der Schlüssel zum Erfolg dieser Strategie liegt in der Unterbrechung der wachstumsretardierenden intrazellulären Signalkaskade. Durch die Aktivierung von Rho und der weiteren Signalkaskade durch den NgR- $p75^{NTR}$ -Rezeptorkomplex kommt es zur intrazellulären Polymerisierung von Aktin, die ein vermindertes axonales Wachstum, den Kollaps von Wachstumskegeln und den Rückzug von Neuriten nach sich zieht (McGee und Strittmatter, 2003, Mimura et al., 2006, Boomkamp et al., 2012). Daher stehen schon seit

DISKUSSION

längerem Rho und sein nachgeschalteter Effektor ROCK für die Erforschung axonaler Regeneration und des Aussprossens von Neuriten nach neuronalen Traumata zum Verständnis der genauen Wirkmechanismen im Fokus (McGee und Strittmatter, 2003, Chan et al., 2005, Lord-Fontaine et al., 2008).

In vorangegangenen Studien konnte die Bedeutung des Rho-Signalweges für das Auswachsen von Neuriten nachgewiesen werden. C3 ist ein von *Clostridium botulinum* hergestelltes Toxin und verhindert die Aktivierung von Rho durch ADP-Ribosylierung der Effektordomäne (Dillon und Feig, 1995). Der ROCK-Inhibitor Y27632 blockiert die Aktivität von ROCK durch kompetitive Bindung mit ATP für die Bindungsstelle an ROCK (Uehata et al., 1997, Ishizaki et al., 2000). Von beiden Substanzen wird eine wachstumsfördernde Wirkung von Neuriten im inhibitorischen Umfeld berichtet (Lehmann et al., 1999, Bito et al., 2000, Dergham et al., 2002).

Bislang ist keine Untersuchung für das Auswachsen von Neuriten von SGN in einem inhibitorischen Umfeld durch selektive pharmakologische Unterbrechung des $p75^{NTR}$ -Signalwegs bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmals ein *in vitro* Modell für ein durch MAG induziertes inhibitorisches Umfeld etabliert, das in weiteren Versuchsansätzen durch Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 aufgehoben werden sollte.

Es konnte gezeigt werden, dass der ROCK-Inhibitor Y27632 in Anwesenheit eines durch MAG ausgelösten inhibitorischen Umfeldes die wachstumsfördernde Wirkung durch BDNF nicht nur bestätigen, sondern sogar unterstützen konnte. Der Neuritenlängenindex konnte um beinahe 100% (99,4%) des durch alleinige Zugabe von BDNF erreichten Wachstumseffektes gesteigert werden. Daher stellt die pharmakologische Unterbrechung der $p75^{NTR}$ -Signalkaskade durch Y27632 im inhibitorischen Umfeld einen wirkungsvollen Ansatz im Rahmen der möglichen Anwendung innerhalb biologischer Entwicklungsprozesse neuer CI-Strategien dar.

DISKUSSION

4.7 Kombination aus selektiver TrkB-Stimulation und selektiver p75^{NTR}-Inhibition

In einem weiteren Versuchsansatz sollte geprüft werden, ob die Kombination aus selektiver TrkB-Stimulation durch 7,8-DHF und selektiver p75^{NTR}-Unterbrechung durch den ROCK-Inhibitor Y27632 einen zusätzlichen Effekt auf das Neuritenwachstum von SGN hervorruft. Die hierbei zugrunde liegende Idee beruhte darauf, dass durch die Beseitigung des inhibitorischen Einflusses, der durch Bindung von endogen vorhandenem BDNF an p75^{NTR} vorhanden ist, ein zusätzliches Potential für die durch 7,8-DHF vermittelte Wirkung auf das Neuritenwachstum entsteht.

In den durchgeführten Experimenten konnte zwar ein leichter Anstieg des Neuritenwachstums durch die Kombination beider Substanzen sowohl ohne inhibitorisches Umfeld als auch in Anwesenheit eines myelininduzierten inhibitorischen Umfelds festgestellt werden. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu dem durch alleinige Gabe von 7,8-DHF induzierten Wachstumseffekt festgestellt werden, was darauf hinweist, dass der durch endogenes BDNF hervorgerufene inhibitorische Effekt geringer als erwartet auszufallen scheint. Eine weitere Erklärung für den geringen erzielten Wachstumseffekt könnte die geringe stimulatorische Potenz von 7,8-DHF sein, die sich schon im Versuch ohne Zugabe eines inhibitorischen Umfeldes gezeigt hat. Ein alternativer Erklärungsansatz könnte ein bislang unbekannter Mechanismus in einer der beiden Substanzen sein, der einen bisher nicht berücksichtigten wachstumshemmenden Einfluss auf die andere Substanz auslöst, wobei sich 7,8-DHF und Y27632 somit negativ beeinflussen könnten. Außerdem könnte durch die Zugabe beider Substanzen das Neuron selbst so verändert sein, dass keine optimalen Bedingungen mehr für ein Auswachsen von Neuriten vorhanden gegeben sind. Die Frage, warum der Wachstumseffekt in der Kombination der beiden Substanzen geringer als erwartet ausfiel, bleibt daher ungeklärt und könnte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

DISKUSSION

4.8 Mögliche Anwendungsgebiete

Obwohl das Überleben und das Auswachsen von SGN durch die exogene Zufuhr von Neurotrophinen und neurotrophen Faktoren geleistet werden kann, ist dieser Effekt nur temporär und gilt bislang lediglich für die Zeit der direkten intracochleären Applikation dieser Substanzen (Gillespie et al., 2003). Daher steht die berechtigte Frage im Raum, wie eine anhaltende Wirkstoffapplikation zur Stimulation des Neuritenwachstums gewährleistet werden kann. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass nicht nur Neurotrophine einen positiven Effekt auf Überleben und Neuritenwachstum von SGN auslösen können, sondern auch die direkte elektrische Stimulation durch ein Cochlea-Implantat. Auf diese Weise kann ein positiver Effekt für die Aufrechterhaltung und die Integrität des Hörnerven hervorgerufen werden (Shepherd et al., 2008, Song et al., 2008, Agterberg et al., 2009, Scheper et al., 2009). Daher stellt die Strategie zur Bewerkstelligung einer anhaltenden Neurotrophinapplikation in Kombination mit einer verlässlichen elektrischen Stimulation einen wichtigen Ansatzpunkt in der Weiterentwicklung der CI-Therapie dar.

Eine intensiv untersuchte Fragestellung in diesem Zusammenhang beschäftigt sich damit, wie eine kontinuierliche Applikation von wachstumsfördernden Substanzen an die SGN erfolgen kann. Einige methodische Überlegungen zur transienten Applikation von Neurotrophinen in die Cochlea wurden bereits gemacht. Im Wesentlichen existieren momentan drei wichtige Modelle, die sich mit der exogenen Zufuhr von Neurotrophinen beschäftigen.

1) In einem ersten Ansatz werden Hydrogenperlen in das runde Fenster der Cochlea eingesetzt. Diese werden mit Natriumalginat gefüllt und sollen so über Tage kontinuierlich NT-3 freisetzen, was kontinuierliche Stimulationsbedingungen gewährleisten soll (Noushi et al., 2005).

2) Eine weitere Methode zur Neurotrophinapplikation besteht in der Beschichtung der CI-Elektrode selbst. Dazu wird sie mit dem leitfähigen Polymer Polypyrrol beschichtet, in das exogene Neurotrophine eingewachsen

DISKUSSION

sind, die kontrolliert freigesetzt werden können (Thompson et al., 2006, Richardson et al., 2007, Evans et al., 2009, Richardson et al., 2009, Thompson et al., 2010). Die Bestätigung der biologischen Aktivität der freigesetzten Neurotrophine konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden (Richardson et al., 2009).

3) Ein weiteres Verfahren im Tierexperiment stellt die dauerhafte Applikation von Neurotrophinen durch mini-osmotische Pumpen dar. Die Neurotrophine können auf diese Weise kontinuierlich in die Cochlea appliziert werden (Miller et al., 1997, Wise et al., 2005, Glueckert et al., 2008).

Alle genannten Verfahren stellen geeignete Vehikel für die in dieser Arbeit evaluierten Ergebnisse dar. So könnten statt der bisher üblichen Neurotrophinapplikation andere Substanzen wie 7,8-DHF oder Y27632 entweder gesondert oder in Kombination mit Neurotrophinen appliziert werden. Allerdings stellt sich bei allen vorgestellten Verfahren zur intracochleären Zufuhr von Neurotrophinen die Frage, ob die auf diese Weise dargebotene trophische Unterstützung ausreicht, um die Neuriten einerseits suffizient zu stimulieren und andererseits die biologische Integrität der Neuriten zu erhalten. Weiterhin bleibt offen, ob hierdurch eine Regeneration der Fasern, die sich bereits im Degenerationsprozess befinden, erreicht werden kann.

Eine weitere Herausforderung liegt darin, die Neuriten zu einem räumlich gerichteten Wachstum anzuregen, damit sie sich der CI-Elektrode annähern und nicht ungeordnet auswachsen. Es konnte gezeigt werden, dass sich Neuriten, die sich in der Regeneration befinden, unregelmäßig ausbreiten (Wise et al., 2005). Durch ein ungerichtetes Auswachsen der Nervenzellfortsätze kann die Strategie der selektiveren Stimulation einzelner Neurone, die einem tonotopen Muster innerhalb der Cochlea folgt, nicht erreicht werden. In der Bewältigung dieser Fragestellung werden bislang zwei Ansätze zum geordneten Auswachsen von Neuriten des Spiralganglions verfolgt.

DISKUSSION

1) Der erste Ansatz beschäftigt sich mit der Idee der Chemotaxis. Dabei sollen die sich ausbreitenden Neuriten entlang eines neurotrophininduzierten Konzentrationsgradienten in eine vorgegebene Richtung auswachsen und könnten somit der Stimulationselektrode angenähert werden (Robinson et al., 1999, Richardson et al., 2007, Yu et al., 2008).

2) Ein weiterer Ansatz besteht darin, eine biomolekulare Brücke zwischen Elektrode und neuronalem Gewebe zu errichten, auf der die Neuriten durch die Anwesenheit von wachstumsstimulierenden Substanzen an die Elektrode heranwachsen können (Rangappa et al., 2000, Mahoney et al., 2005, Gomez und Schmidt, 2007).

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse könnten auch hier effektive Substanzen in die Cochlea eingebracht werden, die unabhängig vom Einfluss inhibitorischer Myelinproteine ein gerichtetes Neuritenwachstum hin zur Stimulationselektrode fördern und somit zur Weiterentwicklung von Strategien zur Applikation und zum gerichteten Neuritenwachstum verwendet werden könnten.

4.9 Schlussfolgerungen

Im Zuge der Weiterentwicklung von CI-Technologien zur Steigerung der Frequenzselektivität und damit des Hörergebnisses wird der Distanzreduktion zwischen Elektrode und zu stimulierendem neuronalem Gewebe des Spiralganglions eine entscheidende Rolle beigemessen. Ein biologischer Ansatz zur Umsetzung dieses Ziels besteht darin, das Neuritenwachstum von SGN in Richtung der Elektrode durch neurotrophe Faktoren anzuregen.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Wachstumseffekte von Neuriten des Spiralganglions in einem durch Myelin induzierten inhibitorischen Umfeld durchgeführt werden. Durch die für dieses Modell der Organkultur adaptierte Sholl-Analyse konnte eine verlässliche und

DISKUSSION

reproduzierbare Methode zur Auswertung des Längenwachstums der Spiralganglionneuriten etabliert werden.

Auf der Suche nach neurotrophinähnlichen Substanzen, die eine konstante und vielversprechende stimulatorische Wirkung auf das Auswachsen von Neuriten zeigen und deren pharmakokinetischen Eigenschaften stabiler als die von Neurotrophinen wie beispielsweise BDNF sind, konnte mit dem in der Natur vorkommenden Flavonderivat 7,8-DHF ein potenter und potenziell für die Anwendung in der weiteren biomolekularen CI-Forschung geeigneter TrkB-Agonist identifiziert werden. Es bleiben jedoch weiterhin Fragen offen, inwieweit die Wirkung von 7,8-DHF *in vivo* bestätigt werden kann und ob dieses Flavonderivat für die klinische Anwendung möglicherweise in Betracht gezogen werden kann.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit die zuvor schon in anderen Fragestellungen und auf andere Systeme erforschten Effekte von ROCK-Inhibitoren auf das Neuritenwachstum von SGN bestätigt werden. Die Verwendung von Y27632 als wirkungsvolle Unterstützung für das durch TrkB-Agonisten generierte Aussprossen peripherer Nervenzellfortsätze im Spiralganglion müsste in einem nächsten Schritt im Tiermodell zur Anwendung kommen und überprüft werden. Ein neuer Ansatz in der biologischen Weiterentwicklung der CI-Technologie könnte eine Strategie sein, die sowohl die selektive Stimulation der durch TrkB als auch die selektive Unterbrechung der durch p75^{NTR} hervorgerufenen Effekte beinhaltet. Diese Strategie gilt es allerdings in weiteren Forschungsarbeiten zu stabilisieren und weiter voranzutreiben.

Des Weiteren müssen die Ergebnisse dieser Arbeit auf den aktuellen technischen Stand der Möglichkeiten zur Applikation von Neurotrophinen und neurotrophinähnlichen Substanzen in die Cochlea und zum gerichteten Wachstum von Neuriten der Spiralganglionneurone im Rahmen von neu entwickelten CI-Strategien übertragen und ausgeweitet werden.

5 Zusammenfassung

Jährlich wird eines von 1000 Kindern gehörlos oder mit hochgradiger Schwerhörigkeit geboren. Das Cochlea-Implantat (CI) stellt eine der wichtigsten Entwicklungen zur Kommunikation von hochgradig schwerhörigen und ertaubten Menschen dar. Hierbei wird die Funktion der geschädigten Haarsinneszellen durch direkte elektrische Stimulation des Hörnervs ersetzt. Das Hörergebnis eines CIs hängt zum einen von der Anzahl erhaltener Neurone des Spiralganglions ab, zum anderen ist eine möglichst definierte Interaktion zwischen Stimulationselektrode und erhaltenem Nervengewebe von entscheidender Bedeutung für das Hörergebnis von CI-Trägern.

Ein biologischer Ansatz, um diese Interaktion zu verbessern, besteht in der Verringerung des räumlichen Abstands zwischen Nerv und Elektrode. Dabei wird das Auswachsen der Neuriten des Spiralganglions in Richtung der Elektrode stimuliert. Für die Stimulation des Neuritenwachstums sind Neurotrophine wie BDNF (brain derived neurotrophic factor) verantwortlich. Sie vermitteln ihre wachstumssteigernde Wirkung über die Bindung an TrkB-Rezeptoren. Neurotrophine binden jedoch gleichzeitig an den niedrig-affinen $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor, der diesen wachstumssteigernden Effekt in Anwesenheit eines durch Myelin induzierten inhibitorischen Umfeldes vermindert. Daher ist die Suche nach Strategien zur Umgehung der durch $p75^{\text{NTR}}$ ausgelösten Wachstumsretardierung von entscheidender Bedeutung für eine effektive Stimulierung des Neuritenwachstums von SGN.

In dieser Arbeit wurde eine Organkultur des Spiralganglions verwendet, die die Beurteilung verschiedener Substanzen, die in die Regulierung des peripheren Neuritenwachstums über TrkB und $p75^{\text{NTR}}$ eingreifen erlaubt. Dies wurde erstmals auch in Anwesenheit eines durch Myelin induzierten inhibitorischen Umfeldes untersucht. Die in der Literatur beschriebenen, durch BDNF hervorgerufenen Wirkungen konnten in dem verwendeten Modell bestätigt werden. Durch gezielte Eingriffe an entscheidenden Stellen in der TrkB-

ZUSAMMENFASSUNG

Signalkaskade mit Inhibitoren der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), PKA (Proteinkinase A) und am Rezeptor selbst, konnte der durch BDNF über TrkB hervorgerufene Wachstumseffekt inhibiert und damit die Spezifität der Stimulation nachgewiesen werden.

Das Flavonderivat 7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF) zeigte einen deutlichen fördernden Effekt auf das Neuritenwachstum von SGN und wirkt als selektiver TrkB-Agonist. Im Gegensatz zu BDNF vermittelte es auch eine Wirkung im inhibitorischen Umfeld. Um den durch $p75^{\text{NTR}}$ vermittelten inhibitorischen Einfluss von BDNF zu umgehen, wurde durch selektive Inhibition der $p75^{\text{NTR}}$ -Signalkaskade mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 die durch BDNF und 7,8-DHF ausgelösten Wachstumseffekte auch im inhibitorischen Umfeld noch weiter gesteigert.

Die gewonnenen Erkenntnisse könnten in vorhandene und neue Strategien für die Weiterentwicklung der CI-Technologie im Bereich eines biomolekularen Modells eingebracht werden. Ein erster Schritt wäre die Umsetzung der hier erbrachten Erkenntnisse auf ein Tierversuchsmodell. Beispielsweise stellt die kombinierte Anwendung eines TrkB-Agonisten mit einem ROCK-Inhibitor einen neuen Ansatzpunkt in der Forschung mit neurotrophen Faktoren und neurotrophinähnlichen Substanzen in Neuronen des Spiralganglions dar.

Zusammenfassend könnten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse einen wichtigen Baustein für die weitere angewandte CI-Forschung darstellen.

ABSTRACT

6 Abstract

Every year one out of 1000 children is born deaf or with severe hearing loss. The development of cochlear-implant-technology marks a milestone for the communication of deaf or profoundly hearing impaired people. A cochlear implant works by direct stimulation of the auditory nerve fibers by omitting the damaged hair cells. On the one hand the outcome of a cochlear implant is dependent on the number of neurons that are available for stimulation and on the other hand of a preferably defined interaction between neurons and the stimulating electrode.

A biological strategy to improve the interaction between neurons and electrode consists of reducing the spatial distance between neurons and stimulating electrode by specific stimulation of the peripheral auditory nerve fibers so that the neurites grow towards and onto the electrode. Stimulation of neurite outgrowth can be achieved by neurotrophic factors as BDNF (brain derived neurotrophic factor). Neurotrophins mediate their stimulatory effects by binding to *trk*-receptors, in this case to TrkB-receptors. However, as a paradox, BDNF is also binding to the low-affinity receptor $p75^{\text{NTR}}$ and limits its stimulating effects in the presence of a myelin-induced inhibitory environment. Therefore there is a need to search for strategies to circumvent the $p75^{\text{NTR}}$ -mediated inhibitory effects to achieve constant and effective neurite outgrowth.

An organotypic model of postnatal (P4-6) mouse spiral ganglion was established to evaluate the various effects of different substances referring to the regulation of neurite outgrowth via TrkB and $p75^{\text{NTR}}$, even in the presence of a myelin induced inhibitory environment. This study could confirm the well known effects of BDNF already published. Selective inhibition of neurite outgrowth through TrkB could be achieved by inhibitors of PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), PKA (protein kinase A) and by inhibiting the tyrosine phosphorylation of TrkB.

ABSTRACT

The naturally occurring TrkB-ligand 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) is a derivative of flavones and reveals distinct effects on neurite outgrowth. In contrast to BDNF, 7,8-DHF reveals to be a potent stimulator of neurite outgrowth in a myelin-induced inhibitory environment. An alternative way to overcome the negative influence of p75^{NTR} on neurite outgrowth is a selective intervention in the inhibitory p75^{NTR}-pathway with ROCK-inhibitors like Y27632. Selective inhibition of p75^{NTR} improves the effects of BDNF and 7,8-DHF on neurite outgrowth in an inhibitory environment.

The findings of this study could be transferred into existing and novel strategies of tissue engineering in further development of CI-technologies. The next step includes a transfer of these findings into an animal model. A possible strategy in the field of neurite outgrowth research in the inner ear could be a combined application of a selective TrkB-agonist and a ROCK-inhibitor to attain optimal neurite growth effects.

In summary the findings of the study reveal to be an important step in the field of applied CI-research.

7 Literaturverzeichnis

- Agterberg MJ, Versnel H, van Dijk LM, de Groot JC, Klis SF (2009) Enhanced survival of spiral ganglion cells after cessation of treatment with brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* : JARO 10:355-367.
- Ahmed Z, Dent RG, Suggate EL, Barrett LB, Seabright RJ, Berry M, Logan A (2005) Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A. *Molecular and cellular neurosciences* 28:509-523.
- Aletsee C, Beros A, Mullen L, Palacios S, Pak K, Dazert S, Ryan AF (2001) Ras/MEK but not p38 signaling mediates NT-3-induced neurite extension from spiral ganglion neurons. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* : JARO 2:377-387.
- Aletsee C, Brors D, Mlynski R, Ryan AF, Dazert S (2002) [Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase influences neurotrophin-induced spiral ganglion neurite growth]. *Laryngo- rhino- otologie* 81:189-195.
- Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K (1997) Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275:1308-1311.
- Andero R, Heldt SA, Ye K, Liu X, Armario A, Ressler KJ (2011) Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning. *The American journal of psychiatry* 168:163-172.
- Anderson M, Bostrom M, Pfaller K, Glueckert R, Schrott-Fischer A, Gerdin B, Rask-Andersen H (2006) Structure and locomotion of adult in vitro regenerated spiral ganglion growth cones-- a study using video microscopy and SEM. *Hearing research* 215:97-107.
- Aoki K, Nakamura T, Matsuda M (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* 279:713-719.
- Aran JM, Erre JP, Lima da Costa D, Debarh I, Dulon D (1999) Acute and chronic effects of aminoglycosides on cochlear hair cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 884:60-68.
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2000) TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Molecular and cellular biology* 20:5908-5916.
- Atkinson PJ, Cho CH, Hansen MR, Green SH (2011) Activity of all JNK isoforms contributes to neurite growth in spiral ganglion neurons. *Hearing research* 278:77-85.
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M (2008) PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 322:967-970.
- Bai Y, Xu J, Brahimi F, Zhuo Y, Sarunic MV, Saragovi HU (2010) An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:4722-4731.
- Bao J, Ohlemiller KK (2010) Age-related loss of spiral ganglion neurons. *Hearing research* 264:93-97.
- Békésy (1960) *Experiments in Hearing* (Translated and edited by E. G. Wever).

LITERATURVERZEICHNIS

- Berry M (1982) Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system. *Bibliotheca anatomica* 1-11.
- Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, Salehi AH, Becker EB, Said F, Bonni A, Barker PA (2003) Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:11373-11381.
- Bianchi LM, Conover JC, Fritsch B, DeChiara T, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1996) Degeneration of vestibular neurons in late embryogenesis of both heterozygous and homozygous BDNF null mutant mice. *Development* 122:1965-1973.
- Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 26:431-441.
- Black RC, Clark GM, Patrick JF (1981) Current distribution measurements within the human cochlea. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 28:721-725.
- Black RC, Clark GM, Tong YC, Patrick JF (1983) Current distributions in cochlear stimulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 405:137-145.
- Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ, Becker C (2011) Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:12889-12899.
- Bohne BA, Harding GW (1992) Neural regeneration in the noise-damaged chinchilla cochlea. *The Laryngoscope* 102:693-703.
- Boomkamp SD, Riehle MO, Wood J, Olson MF, Barnett SC (2012) The development of a rat in vitro model of spinal cord injury demonstrating the additive effects of Rho and ROCK inhibitors on neurite outgrowth and myelination. *Glia* 60:441-456.
- Boulle F, Kenis G, Cazorla M, Hamon M, Steinbusch HW, Lanfumey L, van den Hove DL (2012) TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. *Progress in neurobiology* 98:197-206.
- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378:498-501.
- Briaire JJ, Frijns JH (2006) The consequences of neural degeneration regarding optimal cochlear implant position in scala tympani: a model approach. *Hearing research* 214:17-27.
- Brigande JV, Heller S (2009) Quo vadis, hair cell regeneration? *Nature neuroscience* 12:679-685.
- Briggs RJ, Eder HC, Seligman PM, Cowan RS, Plant KL, Dalton J, Money DK, Patrick JF (2008) Initial clinical experience with a totally implantable cochlear implant research device. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 29:114-119.
- Brors D, Hansen S, Mlynski R, Volkenstein S, Aletsee C, Sendtner M, Ryan AF, Dazert S (2008) Spiral ganglion outgrowth and hearing development in p75-deficient mice. *Audiology & neuro-otology* 13:388-395.
- Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, Strittmatter SM (2010) MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal

LITERATURVERZEICHNIS

- cord trauma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:6825-6837.
- Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22:89-101.
- Caroni P, Schwab ME (1988a) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.
- Caroni P, Schwab ME (1988b) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *The Journal of cell biology* 106:1281-1288.
- Cazorla M, Arrang JM, Premont J (2011) Pharmacological characterization of six trkB antibodies reveals a novel class of functional agents for the study of the BDNF receptor. *British journal of pharmacology* 162:947-960.
- Chan CC, Khodarahmi K, Liu J, Sutherland D, Oschipok LW, Steeves JD, Tetzlaff W (2005) Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury. *Experimental neurology* 196:352-364.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience* 4:299-309.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.
- Chen Y, Zeng J, Cen L, Wang X, Yao G, Wang W, Qi W, Kong K (2009) Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *The Journal of international medical research* 37:281-288.
- Cheng PL, Song AH, Wong YH, Wang S, Zhang X, Poo MM (2011) Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:18430-18435.
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *The Journal of biological chemistry* 265:5267-5272.
- Cohen NL, Roland JT, Jr., Marrinan M (2004) Meningitis in cochlear implant recipients: the North American experience. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 25:275-281.
- Cunningham M, Cox EO (2003) Hearing assessment in infants and children: recommendations beyond neonatal screening. *Pediatrics* 111:436-440.
- Darenfed H, Dayanandan B, Zhang T, Hsieh SH, Fournier AE, Mandato CA (2007) Molecular characterization of the effects of Y-27632. *Cell motility and the cytoskeleton* 64:97-109.
- Dechant G, Biffo S, Okazawa H, Kolbeck R, Pottgiesser J, Barde YA (1993) Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* 119:545-558.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6570-6577.

LITERATURVERZEICHNIS

- Devi L, Ohno M (2012) 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37:434-444.
- Dillon ST, Feig LA (1995) Purification and assay of recombinant C3 transferase. *Methods in enzymology* 256:174-184.
- Djourno A, Eyries C (1957) [Auditory prosthesis by means of a distant electrical stimulation of the sensory nerve with the use of an indwelt coiling]. *La Presse medicale* 65:1417.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35:283-290.
- Dorman MF, Loizou PC, Fitzke J, Tu Z (1998) The recognition of sentences in noise by normal-hearing listeners using simulations of cochlear-implant signal processors with 6-20 channels. *The Journal of the Acoustical Society of America* 104:3583-3585.
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry* 276:32687-32695.
- Evans AJ, Thompson BC, Wallace GG, Millard R, O'Leary SJ, Clark GM, Shepherd RK, Richardson RT (2009) Promoting neurite outgrowth from spiral ganglion neuron explants using polypyrrole/BDNF-coated electrodes. *Journal of biomedical materials research Part A* 91:241-250.
- Farinas I, Jones KR, Tessarollo L, Vigers AJ, Huang E, Kirstein M, de Caprona DC, Coppola V, Backus C, Reichardt LF, Fritsch B (2001) Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:6170-6180.
- Fayad JN, Linthicum FH, Jr. (2006) Multichannel cochlear implants: relation of histopathology to performance. *The Laryngoscope* 116:1310-1320.
- FDA USFaDA (2010) Cochlear Implants. vol. 11-4798 (Services, U. S. D. o. H. a. H., ed): National Institute on Deafness and Other Communication Disorders.
- Ferby IM, Waga I, Hoshino M, Kume K, Shimizu T (1996) Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor through a mechanism independent of p85/p110-type phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 271:11684-11688.
- Filbin MT (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews Neuroscience* 4:703-713.
- Finley CC, Holden TA, Holden LK, Whiting BR, Chole RA, Neely GJ, Hullar TE, Skinner MW (2008) Role of electrode placement as a contributor to variability in cochlear implant outcomes. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 29:920-928.
- Finn R, with assistance of Hudspeth, A.J., Zwislocki, J., Young, E., Merzenich, M., (1998) Sounds from silence: the development of cochlear implants. *Beyond Discovery: The Path from Research to Human Benefit. : National Academy of Sciences, Washington (DC).*
- Fitzgerald MB, Shapiro WH, McDonald PD, Neuburger HS, Ashburn-Reed S, Immerman S, Jethanamest D, Roland JT, Svirsky MA (2007) The effect of

LITERATURVERZEICHNIS

- perimodiolar placement on speech perception and frequency discrimination by cochlear implant users. *Acta oto-laryngologica* 127:378-383.
- Fletcher JM, Hughes RA (2006) Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 12:515-524.
- Fobian K, Owczarek S, Budtz C, Bock E, Berezin V, Pedersen MV (2010) Peptides derived from the solvent-exposed loops 3 and 4 of BDNF bind TrkB and p75(NTR) receptors and stimulate neurite outgrowth and survival. *Journal of neuroscience research* 88:1170-1181.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409:341-346.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:1416-1423.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168.
- Friesen LM, Shannon RV, Baskent D, Wang X (2001) Speech recognition in noise as a function of the number of spectral channels: comparison of acoustic hearing and cochlear implants. *The Journal of the Acoustical Society of America* 110:1150-1163.
- Frijns JH, Briare JJ, Grote JJ (2001) The importance of human cochlear anatomy for the results of modiolus-hugging multichannel cochlear implants. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 22:340-349.
- Fritsch B, Barbacid M, Silos-Santiago I (1998) The combined effects of trkB and trkC mutations on the innervation of the inner ear. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 16:493-505.
- Fritsch B, Farinas I, Reichardt LF (1997) Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:6213-6225.
- Fu QJ, Nogaki G (2005) Noise susceptibility of cochlear implant users: the role of spectral resolution and smearing. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 6:19-27.
- Gao WQ, Zheng JL, Karihaloo M (1995) Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) act at later stages of cerebellar granule cell differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:2656-2667.
- Garnham C, O'Driscoll M, Ramsden, Saeed S (2002) Speech understanding in noise with a Med-El COMBI 40+ cochlear implant using reduced channel sets. *Ear and hearing* 23:540-552.
- Gartner A, Polnau DG, Staiger V, Sciarretta C, Minichiello L, Thoenen H, Bonhoeffer T, Korte M (2006) Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:3496-3504.
- Gestwa G, Wiechers B, Zimmermann U, Praetorius M, Rohbock K, Kopschall I, Zenner HP, Knipper M (1999) Differential expression of trkB.T1 and trkB.T2,

LITERATURVERZEICHNIS

- truncated trkC, and p75(NGFR) in the cochlea prior to hearing function. *The Journal of comparative neurology* 414:33-49.
- Gillespie LN, Clark GM, Bartlett PF, Marzella PL (2003) BDNF-induced survival of auditory neurons in vivo: Cessation of treatment leads to accelerated loss of survival effects. *Journal of neuroscience research* 71:785-790.
- Gillespie LN, Shepherd RK (2005) Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. *The European journal of neuroscience* 22:2123-2133.
- Glasberg BR, Moore BC (1990) Derivation of auditory filter shapes from notched-noise data. *Hearing research* 47:103-138.
- Glueckert R, Bitsche M, Miller JM, Zhu Y, Prieskorn DM, Altschuler RA, Schrott-Fischer A (2008) Deafferentation-associated changes in afferent and efferent processes in the guinea pig cochlea and afferent regeneration with chronic intrascalar brain-derived neurotrophic factor and acidic fibroblast growth factor. *The Journal of comparative neurology* 507:1602-1621.
- Gold T (1948) Hearing. II. The physical basis of the action of the cochlea. *Proc R Soc London B Biol Sci* 135:492-498.
- Goldberg JL, Barres BA (2000) Nogo in nerve regeneration. *Nature* 403:369-370.
- Gomez N, Schmidt CE (2007) Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. *Journal of biomedical materials research Part A* 81:135-149.
- Goycoolea MV, Stypulkowski P, Muchow DC (1990) Ultrastructural studies of the peripheral extensions (dendrites) of type I ganglion cells in the cat. *The Laryngoscope* 100:19-24.
- GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417:547-551.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403:439-444.
- Gstoettner W, Franz P, Hamzavi J, Plenk H, Jr., Baumgartner W, Czerny C (1999) Intracochlear position of cochlear implant electrodes. *Acta oto-laryngologica* 119:229-233.
- Hansen MR, Zha XM, Bok J, Green SH (2001) Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:2256-2267.
- Hansen S, Mlynski R, Volkenstein S, Stark T, Schwaab M, Dazert S, Brors D (2009) [Growth behavior of spiral ganglion explants on cochlear implant electrodes and their materials]. *HNO* 57:358-363.
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- Harrington AW, Kim JY, Yoon SO (2002) Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:156-166.
- Hatsushika S, Shepherd RK, Tong YC, Clark GM, Funasaka S (1990) Dimensions of the scala tympani in the human and cat with reference to cochlear implants. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 99:871-876.
- Hawkins JE, Jr. (1973) Comparative otopathology: aging, noise, and ototoxic drugs. *Advances in oto-rhino-laryngology* 20:125-141.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hayes H, Geers AE, Treiman R, Moog JS (2009) Receptive vocabulary development in deaf children with cochlear implants: achievement in an intensive auditory-oral educational setting. *Ear and hearing* 30:128-135.
- He XL, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304:870-875.
- He Z, Koprivica V (2004) The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annual review of neuroscience* 27:341-368.
- Helms J, Muller J, Schon F, Moser L, Arnold W, Janssen T, Ramsden R, von Ilberg C, Kiefer J, Pfennigdorf T, Gstottner W, Baumgartner W, Ehrenberger K, Skarzynski H, Ribari O, Thumfart W, Stephan K, Mann W, Heinemann M, Zorowka P, Lippert KL, Zenner HP, Bohndord M, Huttenbrink K, Hochmair-Desoyer I, et al. (1997) Evaluation of performance with the COMBI40 cochlear implant in adults: a multicentric clinical study. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 59:23-35.
- Hempstead BL (2002) The many faces of p75NTR. *Current opinion in neurobiology* 12:260-267.
- Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S (1998) Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *The Journal of cell biology* 141:1625-1636.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emllet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:12419-12424.
- Hu Y, Cho S, Goldberg JL (2010) Neurotrophic effect of a novel TrkB agonist on retinal ganglion cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:1747-1754.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72:609-642.
- Huang YY, Martin KC, Kandel ER (2000) Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:6317-6325.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Molecular pharmacology* 57:976-983.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of cell biology* 126:801-810.
- Jang SW, Liu X, Chan CB, France SA, Sayeed I, Tang W, Lin X, Xiao G, Andero R, Chang Q, Ressler KJ, Ye K (2010a) Deoxygedunin, a natural product with potent neurotrophic activity in mice. *PLoS one* 5:e11528.
- Jang SW, Liu X, Chan CB, Weinschenker D, Hall RA, Xiao G, Ye K (2009) Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity. *Chemistry & biology* 16:644-656.
- Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Bianchi B, Sun YE, Ye K (2010b) A selective TrkB agonist with potent

LITERATURVERZEICHNIS

- neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:2687-2692.
- Jin Z, Strittmatter SM (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:6256-6263.
- Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9:1067-1079.
- Johnson RA, Lam M, Punzo AM, Li H, Lin BR, Ye K, Mitchell GS, Chang Q (2012) 7,8-dihydroxyflavone exhibits therapeutic efficacy in a mouse model of Rett syndrome. *J Appl Physiol* 112:704-710.
- Jolly C, Garnham C, Mirzadeh H, Truy E, Martini A, Kiefer J, Braun S (2010) Electrode features for hearing preservation and drug delivery strategies. *Advances in oto-rhino-laryngology* 67:28-42.
- Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR, Widenfalk J, Olson L, Spenger C (2002) Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *The Journal of comparative neurology* 453:292-304.
- Kang SY, Colesa DJ, Swiderski DL, Su GL, Raphael Y, Pfingst BE (2010) Effects of hearing preservation on psychophysical responses to cochlear implant stimulation. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 11:245-265.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 10:381-391.
- Kaplan DR, Miller FD (2003) Axon growth inhibition: signals from the p75 neurotrophin receptor. *Nature neuroscience* 6:435-436.
- Kawano A, Seldon HL, Clark GM, Ramsden RT, Raine CH (1998) Intracochlear factors contributing to psychophysical percepts following cochlear implantation. *Acta oto-laryngologica* 118:313-326.
- Kenchappa RS, Tep C, Korade Z, Urra S, Bronfman FC, Yoon SO, Carter BD (2010) p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17. *The Journal of biological chemistry* 285:20358-20368.
- Khan AM, Handzel O, Burgess BJ, Damian D, Eddington DK, Nadol JB, Jr. (2005a) Is word recognition correlated with the number of surviving spiral ganglion cells and electrode insertion depth in human subjects with cochlear implants? *The Laryngoscope* 115:672-677.
- Khan AM, Whiten DM, Nadol JB, Jr., Eddington DK (2005b) Histopathology of human cochlear implants: correlation of psychophysical and anatomical measures. *Hearing research* 205:83-93.
- Kiefer J, Hohl S, Sturzebecher E, Pfennigdorff T, Gstoettner W (2001) Comparison of speech recognition with different speech coding strategies (SPEAK, CIS, and ACE) and their relationship to telemetric measures of compound action potentials in the nucleus CI 24M cochlear implant system. *Audiology : official organ of the International Society of Audiology* 40:32-42.
- Kiefer J, von Ilberg C, Rupprecht V, Hubner-Egner J, Knecht R (2000) Optimized speech understanding with the continuous interleaved sampling speech coding strategy in patients with cochlear implants: effect of variations in stimulation rate and number of channels. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 109:1009-1020.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kim JE, Liu BP, Park JH, Strittmatter SM (2004) Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron* 44:439-451.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273:245-248.
- Kishino A, Katayama N, Ishige Y, Yamamoto Y, Ogo H, Tatsuno T, Mine T, Noguchi H, Nakayama C (2001) Analysis of effects and pharmacokinetics of subcutaneously administered BDNF. *Neuroreport* 12:1067-1072.
- Knusel B, Hefti F (1992) K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *Journal of neurochemistry* 59:1987-1996.
- Koch DB, Osberger MJ, Segel P, Kessler D (2004) HiResolution and conventional sound processing in the HiResolution bionic ear: using appropriate outcome measures to assess speech recognition ability. *Audiology & neuro-otology* 9:214-223.
- Kohn J, Aloyz RS, Toma JG, Haak-Frendscho M, Miller FD (1999) Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:5393-5408.
- Koizumi S, Contreras ML, Matsuda Y, Hama T, Lazarovici P, Guroff G (1988) K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC 12 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8:715-721.
- Kong YY, Cruz R, Jones JA, Zeng FG (2004) Music perception with temporal cues in acoustic and electric hearing. *Ear and hearing* 25:173-185.
- Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Molecular and cellular biology* 17:1201-1211.
- Kral A, O'Donoghue GM (2010) Profound deafness in childhood. *The New England journal of medicine* 363:1438-1450.
- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Molecular biology of the cell* 10:1851-1857.
- Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE (2003) Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *The Journal of biological chemistry* 278:24808-24817.
- Lee DS, Lee JS, Oh SH, Kim SK, Kim JW, Chung JK, Lee MC, Kim CS (2001) Cross-modal plasticity and cochlear implants. *Nature* 409:149-150.
- Lefebvre PP, Malgrange B, Lallemand F, Staecker H, Moonen G, Van De Water TR (2002) Mechanisms of cell death in the injured auditory system: otoprotective strategies. *Audiology & neuro-otology* 7:165-170.
- Lefebvre PP, Malgrange B, Staecker H, Moghadass M, Van de Water TR, Moonen G (1994) Neurotrophins affect survival and neuritogenesis by adult injured auditory neurons in vitro. *Neuroreport* 5:865-868.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS

LITERATURVERZEICHNIS

- axon regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:7537-7547.
- Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience* 19:289-317.
- Li S, Li H, Wang Z (2010) Orientation of spiral ganglion neurite extension in electrical fields of charge-balanced biphasic pulses and direct current in vitro. *Hearing research* 267:111-118.
- Lie M, Grover M, Whitlon DS (2010) Accelerated neurite growth from spiral ganglion neurons exposed to the Rho kinase inhibitor H-1152. *Neuroscience* 169:855-862.
- Lingor P, Tonges L, Pieper N, Bermel C, Barski E, Planchamp V, Bahr M (2008) ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells. *Brain : a journal of neurology* 131:250-263.
- Linthicum FH, Jr., Fayad JN (2009) Spiral ganglion cell loss is unrelated to segmental cochlear sensory system degeneration in humans. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 30:418-422.
- Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297:1190-1193.
- Liu X, Chan CB, Jang SW, Pradoldej S, Huang J, He K, Phun LH, France S, Xiao G, Jia Y, Luo HR, Ye K (2010) A Synthetic 7,8-Dihydroxyflavone Derivative Promotes Neurogenesis and Exhibits Potent Antidepressant Effect. *Journal of medicinal chemistry*.
- Liu X, Chan CB, Qi Q, Xiao G, Luo HR, He X, Ye K (2012) Optimization of a Small Tropomyosin-Related Kinase B (TrkB) Agonist 7,8-Dihydroxyflavone Active in Mouse Models of Depression. *Journal of medicinal chemistry* 55:8524-8537.
- Llorens F, Gil V, del Rio JA (2011) Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:463-475.
- Lord-Fontaine S, Yang F, Diep Q, Dergham P, Munzer S, Tremblay P, McKerracher L (2008) Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 25:1309-1322.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *The Journal of biological chemistry* 269:6884-6891.
- Maher MP, Pine J, Wright J, Tai YC (1999) The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *Journal of neuroscience methods* 87:45-56.
- Maher P, Akaishi T, Abe K (2006) Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:16568-16573.
- Mahoney MJ, Chen RR, Tan J, Saltzman WM (2005) The influence of microchannels on neurite growth and architecture. *Biomaterials* 26:771-778.
- Maira SM, Stauffer F, Schnell C, Garcia-Echeverria C (2009) PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand? *Biochemical Society transactions* 37:265-272.

LITERATURVERZEICHNIS

- Malgrange B, Lefebvre P, Van de Water TR, Staecker H, Moonen G (1996) Effects of neurotrophins on early auditory neurones in cell culture. *Neuroreport* 7:913-917.
- Mantilla CB, Ermilov LG (2012) The novel TrkB receptor agonist 7,8-dihydroxyflavone enhances neuromuscular transmission. *Muscle & nerve* 45:274-276.
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35:65-76.
- Martini R (1994) Myelin-associated glycoprotein is not detectable in perikaryal myelin of spiral ganglion neurons of adult mice. *Glia* 10:311-314.
- Marzella PL, Gillespie LN, Clark GM, Bartlett PF, Kilpatrick TJ (1999) The neurotrophins act synergistically with LIF and members of the TGF-beta superfamily to promote the survival of spiral ganglia neurons in vitro. *Hearing research* 138:73-80.
- McDermott HJ (2004) Music perception with cochlear implants: a review. *Trends in amplification* 8:49-82.
- McGee AW, Strittmatter SM (2003) The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends in neurosciences* 26:193-198.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nature neuroscience* 7:221-228.
- Miller JM, Chi DH, O'Keefe LJ, Kruszka P, Raphael Y, Altschuler RA (1997) Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 15:631-643.
- Mimura F, Yamagishi S, Arimura N, Fujitani M, Kubo T, Kaibuchi K, Yamashita T (2006) Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 281:15970-15979.
- Minase T, Ishima T, Itoh K, Hashimoto K (2010) Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by the ROCK inhibitor Y-27632: a possible role of IP(3) receptors. *European journal of pharmacology* 648:67-73.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews Neuroscience* 10:850-860.
- Miyamoto RT, Hay-McCutcheon MJ, Kirk KI, Houston DM, Bergeson-Dana T (2008) Language skills of profoundly deaf children who received cochlear implants under 12 months of age: a preliminary study. *Acta oto-laryngologica* 128:373-377.
- Moore BC (2003) Coding of sounds in the auditory system and its relevance to signal processing and coding in cochlear implants. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 24:243-254.
- Mou K, Hunsberger CL, Cleary JM, Davis RL (1997) Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons. *The Journal of comparative neurology* 386:529-539.
- Moubarak RS, Sole C, Pascual M, Gutierrez H, Llovera M, Perez-Garcia MJ, Gozzelino R, Segura MF, Iglesias-Guimaraes V, Reix S, Soler RM, Davies AM, Soriano E, Yuste VJ, Comella JX (2010) The death receptor antagonist FLIP-L

LITERATURVERZEICHNIS

- interacts with Trk and is necessary for neurite outgrowth induced by neurotrophins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:6094-6105.
- Mullen LM, Pak KK, Chavez E, Kondo K, Brand Y, Ryan AF (2012) Ras/p38 and PI3K/Akt but not Mek/Erk signaling mediate BDNF-induced neurite formation on neonatal cochlear spiral ganglion explants. *Brain research* 1430:25-34.
- Murray AJ (2008) Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling* 1:re4.
- Murray AJ, Tucker SJ, Shewan DA (2009) cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by Epac and protein kinase A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:15434-15444.
- Nadol JB, Jr., Burgess BJ, Reisser C (1990) Morphometric analysis of normal human spiral ganglion cells. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 99:340-348.
- Nadol JB, Jr., Shiao JY, Burgess BJ, Ketten DR, Eddington DK, Gantz BJ, Kos I, Montandon P, Coker NJ, Roland JT, Jr., Shallop JK (2001) Histopathology of cochlear implants in humans. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 110:883-891.
- Nicholas JG, Geers AE (2007) Will they catch up? The role of age at cochlear implantation in the spoken language development of children with severe to profound hearing loss. *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR* 50:1048-1062.
- Noushi F, Richardson RT, Hardman J, Clark G, O'Leary S (2005) Delivery of neurotrophin-3 to the cochlea using alginate beads. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 26:528-533.
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) p75^{NTR}--live or let die. *Current opinion in neurobiology* 15:49-57.
- O'Leary PD, Hughes RA (2003) Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry* 278:25738-25744.
- O'Leary SJ, Richardson RR, McDermott HJ (2009) Principles of design and biological approaches for improving the selectivity of cochlear implant electrodes. *Journal of neural engineering* 6:055002.
- Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brosamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME (2003) Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:5393-5406.
- Oshima K, Suchert S, Blevins NH, Heller S (2010) Curing hearing loss: Patient expectations, health care practitioners, and basic science. *Journal of communication disorders* 43:311-318.
- Pae HO, Seo WG, Shin M, Lee HS, Kim SB, Chung HT (2000) Protein kinase A or C modulates the apoptosis induced by lectin II isolated from Korean mistletoe, *Viscum album* var. *Coloratum*, in the human leukemic HL-60 cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 22:279-295.
- Park KJ, Grosso CA, Aubert I, Kaplan DR, Miller FD (2010) p75^{NTR}-dependent, myelin-mediated axonal degeneration regulates neural connectivity in the adult brain. *Nature neuroscience* 13:559-566.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current opinion in neurobiology* 11:272-280.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pernet V, Schwab ME (2012) The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell and tissue research* 349:97-104.
- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP (2001) Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35:589-646.
- Pettingill LN, Richardson RT, Wise AK, O'Leary SJ, Shepherd RK (2007) Neurotrophic factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in the auditory system. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 54:1138-1148.
- Pfingst BE, Sutton D (1983) Relation of cochlear implant function to histopathology in monkeys. *Annals of the New York Academy of Sciences* 405:224-239.
- Pirvola U, Arumae U, Moshnyakov M, Palgi J, Saarma M, Ylikoski J (1994) Coordinated expression and function of neurotrophins and their receptors in the rat inner ear during target innervation. *Hearing research* 75:131-144.
- Pirvola U, Hallbook F, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarma M, Ylikoski J (1997) Expression of neurotrophins and Trk receptors in the developing, adult, and regenerating avian cochlea. *Journal of neurobiology* 33:1019-1033.
- Pirvola U, Ylikoski J (2003) Neurotrophic factors during inner ear development. *Current topics in developmental biology* 57:207-223.
- Pirvola U, Ylikoski J, Palgi J, Lehtonen E, Arumae U, Saarma M (1992) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:9915-9919.
- Poduslo JF, Curran GL (1996) Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain research Molecular brain research* 36:280-286.
- Postigo A, Calella AM, Fritsch B, Knipper M, Katz D, Eilers A, Schimmang T, Lewin GR, Klein R, Minichiello L (2002) Distinct requirements for TrkB and TrkC signaling in target innervation by sensory neurons. *Genes & development* 16:633-645.
- Qian MD, Zhang J, Tan XY, Wood A, Gill D, Cho S (2006) Novel agonist monoclonal antibodies activate TrkB receptors and demonstrate potent neurotrophic activities. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:9394-9403.
- Rangappa N, Romero A, Nelson KD, Eberhart RC, Smith GM (2000) Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation. *Journal of biomedical materials research* 51:625-634.
- Reefhuis J, Honein MA, Whitney CG, Chamany S, Mann EA, Biernath KR, Broder K, Manning S, Avashia S, Victor M, Costa P, Devine O, Graham A, Boyle C (2003) Risk of bacterial meningitis in children with cochlear implants. *The New England journal of medicine* 349:435-445.
- Richardson RT, Thompson B, Moulton S, Newbold C, Lum MG, Cameron A, Wallace G, Kapsa R, Clark G, O'Leary S (2007) The effect of polypyrrole with incorporated neurotrophin-3 on the promotion of neurite outgrowth from auditory neurons. *Biomaterials* 28:513-523.
- Richardson RT, Wise AK, Andrew JK, O'Leary SJ (2008) Novel drug delivery systems for inner ear protection and regeneration after hearing loss. *Expert opinion on drug delivery* 5:1059-1076.
- Richardson RT, Wise AK, Thompson BC, Flynn BO, Atkinson PJ, Fretwell NJ, Fallon JB, Wallace GG, Shepherd RK, Clark GM, O'Leary SJ (2009) Polypyrrole-coated electrodes for the delivery of charge and neurotrophins to cochlear neurons. *Biomaterials* 30:2614-2624.

LITERATURVERZEICHNIS

- Richter B, Aschendorff A, Lohnstein P, Husstedt H, Nagursky H, Laszig R (2001) The Nucleus Contour electrode array: a radiological and histological study. *The Laryngoscope* 111:508-514.
- Roberson DW, Rubel EW (1994) Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *The American journal of otology* 15:28-34.
- Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, Greenwald J, Kostura MR, Burtnick LD, Stuart DI, Choe S, Jones EY (1999) The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein science : a publication of the Protein Society* 8:2589-2597.
- Rothschild RM (2010) Neuroengineering tools/applications for bidirectional interfaces, brain-computer interfaces, and neuroprosthetic implants - a review of recent progress. *Frontiers in neuroengineering* 3:112.
- Ruttiger L, Panford-Walsh R, Schimmang T, Tan J, Zimmermann U, Rohbock K, Kopschall I, Limberger A, Muller M, Fraenzer JT, Cimerman J, Knipper M (2007) BDNF mRNA expression and protein localization are changed in age-related hearing loss. *Neurobiology of aging* 28:586-601.
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A (2004) Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46:225-251.
- Sarner S, Kozma R, Ahmed S, Lim L (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *Molecular and cellular biology* 20:158-172.
- Scheper V, Paasche G, Miller JM, Warnecke A, Berkingali N, Lenarz T, Stover T (2009) Effects of delayed treatment with combined GDNF and continuous electrical stimulation on spiral ganglion cell survival in deafened guinea pigs. *Journal of neuroscience research* 87:1389-1399.
- Schimmang T, Tan J, Muller M, Zimmermann U, Rohbock K, Kopschall I, Limberger A, Minichiello L, Knipper M (2003) Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss. *Development* 130:4741-4750.
- Schmandke A, Strittmatter SM (2007) ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13:454-469.
- Schmid DA, Yang T, Ogier M, Adams I, Mirakhor Y, Wang Q, Massa SM, Longo FM, Katz DM (2012) A TrkB small molecule partial agonist rescues TrkB phosphorylation deficits and improves respiratory function in a mouse model of Rett syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:1803-1810.
- Schnell L, Schwab ME (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343:269-272.
- Schropel A, von Schack D, Dechant G, Barde YA (1995) Early expression of the nerve growth factor receptor ctrkA in chick sympathetic and sensory ganglia. *Molecular and cellular neurosciences* 6:544-566.
- Sharma A, Dorman MF, Spahr AJ (2002) Rapid development of cortical auditory evoked potentials after early cochlear implantation. *Neuroreport* 13:1365-1368.
- Shepherd RK, Coco A, Epp SB (2008) Neurotrophins and electrical stimulation for protection and repair of spiral ganglion neurons following sensorineural hearing loss. *Hearing research* 242:100-109.

LITERATURVERZEICHNIS

- Shepherd RK, Javel E (1997) Electrical stimulation of the auditory nerve. I. Correlation of physiological responses with cochlear status. *Hearing research* 108:112-144.
- Shibata SB, Budenz CL, Bowling SA, Pfungst BE, Raphael Y (2011) Nerve maintenance and regeneration in the damaged cochlea. *Hearing research* 281:56-64.
- Shibata SB, Cortez SR, Beyer LA, Wiler JA, Di Polo A, Pfungst BE, Raphael Y (2010) Transgenic BDNF induces nerve fiber regrowth into the auditory epithelium in deaf cochleae. *Experimental neurology* 223:464-472.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy* 87:387-406.
- Singh KK, Park KJ, Hong EJ, Kramer BM, Greenberg ME, Kaplan DR, Miller FD (2008) Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nature neuroscience* 11:649-658.
- Smith LK, Vlahos CJ, Reddy KK, Falck JR, Garner CW (1995) Wortmannin and LY294002 inhibit the insulin-induced down-regulation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology* 113:73-81.
- Snyder RL, Middlebrooks JC, Bonham BH (2008) Cochlear implant electrode configuration effects on activation threshold and tonotopic selectivity. *Hearing research* 235:23-38.
- Sobkowicz HM, Loftus JM, Slapnick SM (1993) Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl* 502:3-36.
- Song BN, Li YX, Han DM (2008) Effects of delayed brain-derived neurotrophic factor application on cochlear pathology and auditory physiology in rats. *Chinese medical journal* 121:1189-1196.
- Spencer JP (2008a) Flavonoids: modulators of brain function? *The British journal of nutrition* 99 E Suppl 1:ES60-77.
- Spencer JP (2008b) Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *The Proceedings of the Nutrition Society* 67:238-252.
- Spoendlin H, Schrott A (1989) Analysis of the human auditory nerve. *Hearing research* 43:25-38.
- Staecker H, Kopke R, Malgrange B, Lefebvre P, Van de Water TR (1996) NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *Neuroreport* 7:889-894.
- Svirsky MA, Teoh SW, Neuburger H (2004) Development of language and speech perception in congenitally, profoundly deaf children as a function of age at cochlear implantation. *Audiology & neuro-otology* 9:224-233.
- Takahashi H, Sando I (1990) Computer-aided 3-D temporal bone anatomy for cochlear implant surgery. *The Laryngoscope* 100:417-421.
- Tang Q, Benitez R, Zeng FG (2011) Spatial channel interactions in cochlear implants. *Journal of neural engineering* 8:046029.
- Tang S, Woodhall RW, Shen YJ, deBellard ME, Saffell JL, Doherty P, Walsh FS, Filbin MT (1997) Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Molecular and cellular neurosciences* 9:333-346.
- Tapley P, Lamballe F, Barbacid M (1992) K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7:371-381.
- Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.
- Thompson BC, Moulton SE, Ding J, Richardson R, Cameron A, O'Leary S, Wallace GG, Clark GM (2006) Optimising the incorporation and release of a

LITERATURVERZEICHNIS

- neurotrophic factor using conducting polypyrrole. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 116:285-294.
- Thompson BC, Richardson RT, Moulton SE, Evans AJ, O'Leary S, Clark GM, Wallace GG (2010) Conducting polymers, dual neurotrophins and pulsed electrical stimulation--dramatic effects on neurite outgrowth. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 141:161-167.
- Toesca A (1996) Central and peripheral myelin in the rat cochlear and vestibular nerves. *Neuroscience letters* 221:21-24.
- Tropitzsch A, Kramer B, Frick C, Waldhaus J, Arnold H, Eckhard A, Mueller M, Loewenheim H (2014) Analysis of spiral ganglion neurite outgrowth of the postnatal mouse inner ear using a modification of the Sholl analysis. Manuscript submitted for publication
- Tsai SJ (2007) TrkB partial agonists: potential treatment strategy for major depression. *Medical hypotheses* 68:674-676.
- Tykocinski M, Cohen LT, Pyman BC, Roland T, Jr., Treaba C, Palamara J, Dahm MC, Shepherd RK, Xu J, Cowan RS, Cohen NL, Clark GM (2000) Comparison of electrode position in the human cochlea using various perimodiolar electrode arrays. *The American journal of otology* 21:205-211.
- Tykocinski M, Cowan RS (2005) Poly-vinyl-alcohol (PVA) coating of cochlear implant electrode arrays: an in-vivo biosafety study. *Cochlear implants international* 6:16-30.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389:990-994.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP (2007) Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 103:1355-1367.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP (2008) The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & nutrition* 3:115-126.
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ (2005) The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:808-822.
- Vieira M, Christensen BL, Wheeler BC, Feng AS, Kollmar R (2007) Survival and stimulation of neurite outgrowth in a serum-free culture of spiral ganglion neurons from adult mice. *Hearing research* 230:17-23.
- Vincent S, Settleman J (1997) The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Molecular and cellular biology* 17:2247-2256.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry* 269:5241-5248.
- Volkenstein S, Brors D, Hansen S, Minovi A, Laub M, Jennissen HP, Dazert S, Neumann A (2009) Influence of bone morphogenetic protein-2 on spiral ganglion neurite growth in vitro. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266:1381-1389.

LITERATURVERZEICHNIS

- Volkenstein S, Kirkwood JE, Lai E, Dazert S, Fuller GG, Heller S (2012) Oriented collagen as a potential cochlear implant electrode surface coating to achieve directed neurite outgrowth. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269:1111-1116.
- Walsh GS, Krol KM, Crutcher KA, Kawaja MD (1999) Enhanced neurotrophin-induced axon growth in myelinated portions of the CNS in mice lacking the p75 neurotrophin receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:4155-4168.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002a) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002b) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.
- Warchol ME (2011) Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species. *Hearing research* 273:72-79.
- Wei D, Jin Z, Jarlebark L, Scarfone E, Ulfendahl M (2007) Survival, synaptogenesis, and regeneration of adult mouse spiral ganglion neurons in vitro. *Developmental neurobiology* 67:108-122.
- Wiechers B, Gestwa G, Mack A, Carroll P, Zenner HP, Knipper M (1999) A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3033-3042.
- Williams G, Williams EJ, Maison P, Pangalos MN, Walsh FS, Doherty P (2005) Overcoming the inhibitors of myelin with a novel neurotrophin strategy. *The Journal of biological chemistry* 280:5862-5869.
- Wilson BS, Dorman MF (2008a) Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hearing research* 242:3-21.
- Wilson BS, Dorman MF (2008b) Cochlear implants: current designs and future possibilities. *Journal of rehabilitation research and development* 45:695-730.
- Wise AK, Richardson R, Hardman J, Clark G, O'Leary S (2005) Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *The Journal of comparative neurology* 487:147-165.
- Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM (2002) A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nature neuroscience* 5:1302-1308.
- Wysocki M (1999) Trauma head CT interpretation by radiology residents versus staff radiologists. *Radiology* 210:283.
- Xu N, Engbers J, Khaja S, Xu L, Clark JJ, Hansen MR (2012) Influence of cAMP and protein kinase A on neurite length from spiral ganglion neurons. *Hearing research* 283:33-44.
- Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M (2001) RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 276:18977-18983.
- Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S (2005) Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anatomical science international* 80:37-41.
- Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M (2002) The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *The Journal of cell biology* 157:565-570.
- Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature neuroscience* 6:461-467.

LITERATURVERZEICHNIS

- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24:585-593.
- Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *The Journal of biological chemistry* 268:25846-25856.
- Ylikoski J, Pirvola U, Moshnyakov M, Palgi J, Arumae U, Saarma M (1993) Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hearing research* 65:69-78.
- Yu LM, Wosnick JH, Shoichet MS (2008) Miniaturized system of neurotrophin patterning for guided regeneration. *Journal of neuroscience methods* 171:253-263.
- Yu Q, Chang Q, Liu X, Gong S, Ye K, Lin X (2012) 7,8,3'-Trihydroxyflavone, a potent small molecule TrkB receptor agonist, protects spiral ganglion neurons from degeneration both in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 422:387-392.
- Zhou R, Assouline JG, Abbas PJ, Messing A, Gantz BJ (1995) Anatomical and physiological measures of auditory system in mice with peripheral myelin deficiency. *Hearing research* 88:87-97.
- Zorner B, Schwab ME (2010) Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1198 Suppl 1:E22-34.
- Zwolan T, Kileny PR, Smith S, Mills D, Koch D, Osberger MJ (2001) Adult cochlear implant patient performance with evolving electrode technology. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 22:844-849.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Materialien

Software

CorelDRAW® Graphics Suite X4 Version 14.0.0.701 (Corel Corporation™, Ottawa, Ontario, Kanada)
EndNote® X5 Bld 5478 (Thomson Reuters, New York, USA)
ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://www.rsb.info.nih.gov/ij>, JAVA 1.6.0_10 (32-bit))
JMP® 9.0.0 64-bit Version (2010 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)
Microsoft Office Excel™ 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)
Microsoft Office PowerPoint™ 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)
Picasa™ 3.9.0 Build 135.93 (Google Inc., Mountain View, California, USA)
SigmaPlot® 2002 for Windows Version 8.0 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA)
Zeiss – AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland)

Herstellung von Lösungen/Materialien

Messpipette – eppendorf Research 10 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Messpipette – eppendorf Research 100 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Messpipette – eppendorf Research 200 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Messpipette – eppendorf Research 1000 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen – ratiolab® Multirack 0,5 – 20µl (Ratiolab, Dreieich, Deutschland)
Pipettenspitzen – ratiolab® Multirack 1 – 200µl (Ratiolab, Dreieich, Deutschland)
Pipettenspitzen – ratiolab® Multirack 100 – 1000µl (Ratiolab, Dreieich, Deutschland)
Feinwaage – Sartorius Basic (Sartorius-Mechatronik, Göttingen, Deutschland)
Wäge-Spatel
Makro – Pipettierhilfe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Glasflaschen mit Schraubverschluss 100ml, 500ml, 1000ml (Schott AG, Mainz, Deutschland)
Bechergläser 25ml (Schott-AG, Mainz, Deutschland)
Tisch-Vortex - Scientific Industries Vortex-Genie 2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Tisch-Zentrifuge - Heraeus Biofuge pico (Heraeus Medical Components, Hanau, Deutschland)
Greiner Bio-One Cellstar PP-Test tubes, 5ml (Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)

ANHANG

BD Falcons BlueMax, 50ml (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

BD Falcons BlueMax, 15ml (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Präparation/Materialien

Einmal-Handschuhe Ansell Hygrip Micro-touch Latex Powder-Free M, L (Ansell, München, Deutschland)

große Schere (FST – ToughCut Straight 17.5cm)

kleine Schere (FST – Wagner Scissors Straight 12cm)

Spring Scissors (FST – Straight 8cm / tip diameter 0.05mm)

Pinzette (FST – Dumont #3 Standard tip / 0.17mm x 0.10mm / 12cm)

Pinzette (FST – Dumont #55 Inox / 0.05mm x 0.02mm / 11cm)

Pinzette (FST – Dumont #5 Inox / 0.05mm x 0.02mm / 11cm)

Pinzette (FST – Graefe forceps, narrow pattern with serrated tips Curved / 16cm)

Mikroschere (FST – No. 15000-00)

Greiner Bio-One Cellstar Gewebekulturschale 94/16mm (Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)

Greiner Bio-One Cellstar Gewebekulturschale 60/16mm (Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)

Spritzenkanülen, 0,4mm x 19mm (BD Microlance, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Präparation/Lösungen

Neurobasal® Medium (Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland)

L-Glutamin (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland)

B27 Supplement (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland)

Penicillin (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA)

Hepes Hanks-Lösung (hanks buffered salt solution, Universitätsapothek Tübingen)

Ethanol S 99% EU VG (SAV Liquid Production GmbH)

Tiere

NMRI-Mäuse im Alter von 4-6 Tagen (P4-6) – (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland)

ANHANG

Mikroskope und Zubehör

Leica MZ6 (Leica, Heerbrugg, Schweiz)
Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss®, Göttingen, Deutschland)
Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss®, Göttingen, Deutschland)

Immunfluoreszenzmarkierung/Materialien

licht-undurchlässige Inkubationskammer
Messpipetten – eppendorf Research 10 - 1000 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen – ratiolab® Multirack 0,5 – 1000µl (Ratiolab, Dreieich, Deutschland)
Feinwaage – Sartorius Basic (Sartorius-Mechatronik, Göttingen, Deutschland)
Wäge-Spatel
Macro – Pipettierhilfe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Glasflaschen mit Schraubverschluss 100ml, 500ml, 1000ml (Schott AG, Mainz, Deutschland)
Tisch-Vortex - Scientific Industries Vortex-Genie 2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Tisch-Zentrifuge - Heraeus Biofuge pico (Heraeus Medical Components, Hanau, Deutschland)
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Deckgläser - 24x60mm / Glasdicke 0,13-0,17mm (R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland)
BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
Triton (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Zellstoff
Aluminiumfolie

Immunfluoreszenzmarkierungen/Antikörper

NF-200 (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA)
GFAP (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA)
DAPI (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA)
AlexaFluor 488 (Molecular Probes®, Eugene, USA)
AlexaFluor 546 (Molecular Probes®, Eugene, USA)

Immunfluoreszenzmarkierungen/Lösungen

ANHANG

Fluor-Save™ Reagent Calbiochem.-Novabiochem. Corp.(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Triton® X-100 (Merck KgaA, ,Darmstadt, Deutschland)
PBS (Phosphat buffered saline PBS tablets, Gibco®/Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
BSA (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA)
Roti®-Histofix 4% Formaldehydlösung (Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland)
Aqua bidest. - Millipore-Filteranlage/Abgabe bei 18,2 MΩ / 25°C (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland)

Sonstiges

Kühlschrank Liebherr Premium (Liebherr®, Biberach an der Riß)
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV Systec (Systec GmbH, Wetterberg, Deutschland)
CO₂ HERAcell® (Heraeus®, Hanau, Deutschland)
Sterilbank HERAsafe® (Heraeus®, Hanau, Deutschland)
Autoklavierband Comply™ Steam Indicator Tape (3M™, St. Paul, Minnesota, USA)
Lichtquelle Zeiss KL 1500 LCD (Carl Zeiss®, Göttingen, Deutschland)
Lichtquelle Leica KL 1500 LCD (Leica, Heerbrugg, Schweiz)
Eismaschine Scotsman® AF 100 (Scotsman ICE Systems, Mailand, Italien)
Wärme und Magnetrührplatte RH basic IKAMAG® (IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Deutschland)
Trockenschrank wtc binder (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
Kulturkammern – BD BioCoat™ (BD Biosciences®, Heidelberg, Deutschland)

Verwendete Substanzen

rhBDNF (R&D Systems®, Minneapolis, Minnesota, USA)
7,8-DHF (TCI Chemicals, Tokyo, Japan)
K252a (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA)
InSolution™ Y27632 Calbiochem® (Merck KgaA, ,Darmstadt, Deutschland)
InSolution™ LY294002 Calbiochem® (Merck KgaA, ,Darmstadt, Deutschland)
InSolution™ KT5720 Calbiochem® (Merck KgaA, ,Darmstadt, Deutschland)
InSolution™ H-89 Calbiochem® (Merck KgaA, ,Darmstadt, Deutschland)
InSolution™ Wortmannin Calbiochem® (Merck KgaA, ,Darmstadt, Deutschland)
rrMAG/Fc Chimera (R&D Systems®, Minneapolis, Minnesota, USA)

ANHANG

8.2 Verzeichnis der verwendeten Protokolle

Standardprotokoll für die Färbung von Spiralganglionpräparaten der Maus (P4-6)

Inkubationslösung	Inkubationszeit	Wiederholungen	Verdünnung
4% PFA	20 min		
Permeabilisierungspuffer (PB)	5 min		
Blockierungspuffer (BB)	60 min		
NF-200 anti mouse in Reaktionspuffer (RB)	über Nacht		0,319
GFAP anti rabbit in RB			0,319
Permeabilisierungspuffer	15 min	3x	
goat anti-mouse Alexa 488 in RB	60 min		0,597
goat anti-rabbit Alexa 546 in RB			0,597
Permeabilisierungspuffer	15 min	3x	
DAPI in PB	20 min		0,111
Permeabilisierungspuffer	5 min		
Eindecken mit Eindeckmedium für Fluoreszenzpräparate: Fluor Save™			
Lagerung in Dunkelheit bei +4°C			

Herstellung des Kulturmediums

Menge	Einheit	Substanz
9,43	ml	Neurobasal
0,2	ml	B-27 Supplement
0,25	ml	L-Gln
0,1	ml	Hepes
0,602	mg	Penicillin

Herstellung von 70%igem Ethanol

Menge	Einheit	Substanz
700	ml	Ethanol 99%
300	ml	Aqua bidest.

ANHANG

Herstellung des Blockierungspuffers (BB) 1% BSA

Menge	Einheit	Substanz
10	ml	PB
10	mg	BSA

Herstellung des Reaktionspuffers (RB)

Menge	Einheit	Substanz
5	ml	PB
5	ml	BB

Herstellung des Permeabilisierungspuffers (PB)

Menge	Einheit	Substanz
500	ml	Aqua bidest
1	Tablette	PBS
0,2	ml	Triton X-100

ANHANG

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Cochlea-Implantats und dessen Position <i>in situ</i>	3
Abbildung 2: Graphische Darstellung des Spiralganglions und dessen Nervenfortsätzen in einer mit einem CI versorgten Cochlea.....	10
Abbildung 3: TrkB-Signalweg (modifiziert nach Minichiello et al. 2009).....	15
Abbildung 4: Mechanismen der neurotrophinvermittelten Inhibition des Neuritenwachstums	18
Abbildung 5: p75 ^{NTR} -Signalweg (modifiziert nach Kaplan & Miller, 2003)	20
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung eines Spiralganglionexplantats	31
Abbildung 7: Bearbeitung durch ImageJ.....	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der adaptierten Sholl-Analyse	35
Abbildung 9: Verteilungsmuster der Daten am Beispiel von 25 ng/ml BDNF	37
Abbildung 10: Wachstumsverhalten eines Gewebeexplantats einer Spiralganglionkultur	38
Abbildung 11: Zeitabhängigkeit für BDNF.....	40
Abbildung 12: Dosisabhängigkeit BDNF.....	41
Abbildung 13: Vergleich des Wachstumsverhaltens im Vergleich einzelner Windungen	42
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Angriffspunkte einzelner Inhibitoren innerhalb des TrkB-Signalwegs.....	43
Abbildung 15: Tyrosinkinaseinhibitor K252a.....	44
Abbildung 16: Graphische Darstellung der mittleren effektiven Konzentration für K252a	45
Abbildung 17: Proteinkinase A-Inhibitor H-89.....	46
Abbildung 18: Proteinkinase A-Inhibitor KT5720	47
Abbildung 19: Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY294002.....	48
Abbildung 20: Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin.....	49
Abbildung 21: 7,8-Dihydroxyflavon	51
Abbildung 22: Einfluss von K252a auf 7,8-Dihydroxyflavon.....	53
Abbildung 23: Induktion eines inhibitorischen Umfelds durch MAG.....	55

ANHANG

Abbildung 24: Graphische Darstellung der mittleren effektiven Konzentration von MAG-Fc	56
Abbildung 25: 7,8-Dihydroxyflavon im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld	58
Abbildung 26: Der ROCK-Inhibitor Y27632	59
Abbildung 27: Y27632 im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld.....	61
Abbildung 28: Kombination aus Y27632 und 7,8-Dihydroxyflavon	63
Abbildung 29: Kombination aus Y27632 und 7,8-Dihydroxyflavon im MAG-induzierten inhibitorischen Umfeld	64

ANHANG

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grenzen eines Cochlea-Implantats. Eingeschränkte Interaktion zwischen Stimulationselektrode und Nervengewebe	8
Tabelle 2: Verwendete Substanzen und deren Funktion in Bezug auf die beteiligten Signalwege	25

PUBLIKATIONEN

9 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

9.1 Vorträge

Culture model of neurotrophin mediated regulation and stimulation of neurite outgrowth in mouse cochlear spiral ganglia

Anke Tropitzsch, **Benedict Kramer**, Marlies Knipper, Marcus Müller, Jörg Waldhaus, Hubert Löwenheim

11. Symposium des Hörforschungszentrums Tübingen, Bad Liebenzell, 2010

Regulation des Neuritenwachstums im Spiralganglion der Cochlea durch neurotrophe Faktoren

Benedict Kramer, Anke Tropitzsch, Marlies Knipper, Marcus Müller, Hubert Löwenheim

IZKF Promotionskolleg Tübingen, 2010

Culture model of neurotrophin mediated regulation and stimulation of neurite outgrowth in mouse cochlear spiral ganglia

Benedict Kramer, Anke Tropitzsch, Marlies Knipper, Marcus Müller, Jörg Waldhaus, Hubert Löwenheim

12. Symposium des Hörforschungszentrums Tübingen, Bad Liebenzell, 2011

Neurotrophin mediated stimulation of neurite outgrowth in mouse spiral ganglion model

Benedict Kramer, Claudia Frick, Marcus Müller, Marlies Knipper, Hubert Löwenheim, Anke Tropitzsch

Thirteenth Triennial Meeting of The International Otopathology Society (a.k.a. The Schuknecht Society), Boston, 2013

PUBLIKATIONEN

9.2 Posterpräsentationen

Culture model of neurotrophin mediated regulation and stimulation of neurite outgrowth in mouse cochlear spiral ganglia

Benedict Kramer, Anke Tropitzsch, Marlies Knipper, Marcus Müller, Hubert Löwenheim
47th Inner Ear Biology Workshop Prag, 2010

Untersuchungen zur Regulation des Neuritenwachstums im Spiralganglion des Innenohrs über den p75NTR Signalweg

Benedict Kramer, Anke Tropitzsch, Marlies Knipper, Marcus Müller, Hubert Löwenheim
Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 2010

Stimulation des Neuritenwachstums im Spiralganglion des Innenohrs durch Neurotrophine und selektive TrkB-Liganden

Anke Tropitzsch, **Benedict Kramer**, Marlies Knipper, Marcus Müller, Hubert Löwenheim
Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 2010

Stimulation of neurite outgrowth of the cultured spiral ganglion by neurotrophins and selective TrkB ligands

Anke Tropitzsch, Marlies Knipper, **Benedict Kramer**, Marcus Müller, Hubert Löwenheim
11th International Conference on Cochlear Implants (CI) and Other Implantable Auditory Technologies, 2010

Organotypisches Kulturmodell von Spiralganglienzellen der Maus zur Stimulation des Neuritenwachstums durch Peptidomimetika

Anke Tropitzsch, Marlies Knipper, **Benedict Kramer**, Marcus Müller, Hubert Löwenheim
27. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phoniatrie und Pädaudiologie e.V., Aachen, 2010

Stimulation of neurite outgrowth of spiral ganglion cells in the organotypic culture model of mouse by neurotrophins and TrkB ligands

A. Tropitzsch, **B. Kramer**, M. Knipper, M. Müller, H. Löwenheim
Symposium „Regenerative Medicine“ der nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina, Tübingen 2011

Peptid-Nanomatrix als Träger für siRNA zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen und sensorischen Nervensystems

M. Baur, H. Hartmann, A. Tropitzsch, **B. Kramer**, M. Müller, H. Löwenheim, L. Schindler, B. Schloschauer, R. Spohn, U. Wank, J. Waldhaus, K.-H. Wiesmüller

PUBLIKATIONEN

2. BMBF-Symposium Medi-WING – Medizintechnik im BMBF-Förderprogramm WING, Nürnberg, 2012

Neurotrophin mediated stimulation of neurite outgrowth in a mouse spiral ganglion model

Benedict Kramer, Marcus Müller, Marlies Knipper, Hubert Löwenheim, Anke Tropitzsch

49th Inner Ear Biology Workshop Tübingen, 2012

Modulation des BDNF induzierten Neuritenwachstum im organotypischen Maus Spiralganglion-Modell

M. Müller, A. Tropitzsch, **B. Kramer**, C. Frick, H. Löwenheim

85. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. in Dortmund, 2014

Modulation of BDNF mediated neurite outgrowth in a mouse spiral ganglion model

M. Müller, A. Tropitzsch, **B. Kramer**, C. Frick, H. Löwenheim

37th MidWinter Meeting of the Association of Research in Otolaryngology, San Diego, 2014

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

10 Selbstständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere eidesstattlich, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert. Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erworben. Auch habe ich keinen weiteren Promotionsversuch an einer Universität im In- oder Ausland unternommen.

11 Danksagung

Für das Zustandekommen dieser Arbeit war die Geduld und Hilfe vieler Menschen nötig. Ich möchte mich bei den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe bedanken, allen voran Prof. Dr. Hubert Löwenheim, Dr. Anke Tropitzsch, PD Dr. Marcus Müller, Dr. Jörg Waldhaus, Claudia Frick und Dr. Karina Gültig, die stets mit einem offenen Ohr für alle meine Anliegen zur Verfügung standen. Auch bei allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei dieser Arbeit wurde die statistische Beratung des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Dr. Blumenstock bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Promotionskolleg des „Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung“ (IZKF), die mich sowohl finanziell als auch methodisch bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die in den Momenten, wo es schwer fiel, Licht am Ende des Tunnels zu sehen, immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir die nötige Motivation zum Weiterarbeiten gegeben haben.