

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Koch

STUDIE ÜBER DAS WACHSTUMSVERHALTEN VON
INNENOHHR-MELANOZYTEN VON C57/BL6-MÄUSEN
UNTER NORMALEN UND PATHOLOGISCHEN
(AUSWIRKUNG VON GENTAMICIN)
ZELLKULTURBEDINGUNGEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Fabian Ullmann

aus Kassel

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 16.12.2009

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. med. M. Sanchez-Hanke

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Hess

Prüfungsausschuss: 3. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. J. Brandner

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DAS INNENOH.....	1
1.2	VORKOMMEN VON MELANOZYTEN IM INNENOH.....	3
1.2.1	Melanozyten der Cochlea.....	3
1.2.2	Melanozyten des Vestibulums.....	3
1.3	FUNKTIONEN DER MELANOZYTEN IM INNENOH.....	5
1.4	AMINOGLYKOSIDE.....	7
2	MATERIAL.....	9
2.1	MÄUSE.....	9
2.2	KULTURMEDIUM.....	9
2.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	9
2.4	IMMUNHISTOCHEMIE.....	10
2.4.1	Primärantikörper.....	10
2.4.2	Sekundärantikörper.....	10
2.4.3	DNA-Färbung.....	10
2.4.4	Puffer und Lösungen.....	11
2.5	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	11
3	METHODEN.....	13
3.1	PRÄPARATION DER MAUS.....	13
3.2	ZELLKULTUR.....	14
3.2.1	Beschichtung der Kulturschalen.....	14
3.2.2	Ansetzen der Zellkultur.....	14
3.2.3	Umsetzen der Zellen.....	15
3.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE TECHNIKEN.....	17
3.3.1	Vorbereitung der Deckgläser.....	17
3.3.2	Formaldehyd-Fixierung.....	17
3.3.3	Immunhistochemische Färbung.....	18
3.3.4	Auswertung.....	18

3.4	GENTAMICIN-VERSUCH.....	19
3.4.1	„Pooling“ der Zellen.....	19
3.4.2	Inkubation der Zellen mit Gentamicin	19
3.4.3	Melanin-Bestimmung.....	21
3.4.4	Trypanblau-Färbung	21
4	ERGEBNISSE.....	22
4.1	MORPHOLOGIE	23
4.2	IMMUNHISTOCHEMIE	24
4.3	GENTAMICIN-VERSUCH.....	24
4.3.1	Trypanblau-Färbung	24
4.3.2	Melanin-Bestimmung.....	26
5	DISKUSSION.....	27
5.1	ZELLKULTUR	27
5.2	GM-VERSUCH.....	29
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	32
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	33
8	ANHANG	38
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	42
10	DANKSAGUNG	43

1 EINLEITUNG

Schon 1850/51 entdeckte Alfonso Corti (1822-1876) das später nach ihm benannte Hörorgan (Gitter 1990). Im darauf folgenden Jahr beschrieb er, ebenfalls als Erster, Pigmente im Innenohr bei Katzen, welche vorwiegend in der Stria vascularis zu finden waren. Erst ca. 80 Jahre später wurde bestätigt, dass es sich bei der Pigmentierung um Melanin handelt (Wolff 1931).

Melanin wird durch Melanozyten synthetisiert. Melanozyten sind Zellen ekto-dermalen Ursprungs und migrieren in der embryonalen Entwicklungsphase als Melanoblasten von der Rückseite des Neuralleiste durch das Mesenchym zu ihren spezifischen Zielorten (Mayer 1973). Erst dort beginnt die Ausdifferenzierung zu Melanin-produzierenden Melanozyten. Von ihrem Golgi-Apparat werden Vesikel (Melanosomen) abgetrennt, die das für die Melanogenese essentielle Schlüsselenzym Tyrosinase enthalten. Die entstandenen Melanosomen wandeln die Aminosäure Tyrosin in verschiedenen Zwischenschritten mit über 100 involvierten Gen-Produkten in die typisch dunkel gefärbten Melanin-Polymere um. Die im Laufe des Prozesses immer stärker pigmentierten Melanosomen wandern in die Dendriten und können dann von anderen mit ihnen in Verbindung stehenden Zellen (z. B. in der Haut: Keratinozyten; im Innenohr: „marginal cells“, s. u.) aufgenommen werden (Boissy und Nordlund 1997; Tolleson 2005). Späterer Zielort ist nicht nur die Haut. Auch im Auge, genauer in Uvea, Iris und Ziliarkörper (Hu et al. 2006), und in den Meningen finden sich Melanozyten. Ebenfalls nahezu in allen Strukturen des Innenohrs (siehe unten).

1.1 DAS INNENOHHR

Das Innenohr befindet sich in der Pars petrosa des Os temporale. Es besteht aus dem häutigen Labyrinth (Labyrinthus membranaceus), welches die kaliumreiche und natriumarme Endolymphe enthält und wird von dem knöchernen Labyrinth (Labyrinthus osseus) umgeben. Zwischen häutigem und knöchernem Labyrinth befindet sich die Perilymphe, welche im Gegensatz zur Endolymphe reich an Natrium ist und nur wenig Kalium besitzt.

Weiter teilt man das Innenohr in Schnecke (Cochlea) und Vorhof (Vestibulum) mit seinen Bogengängen ein. Die Cochlea dient dazu, die mechanische Energie in Form von Schallwellen bzw. Schwingungen in elektrische Energie in Form von Nervenimpulsen im Sinne einer mechanoelektrischen Transduktion umzuwandeln (Hudspeth 1985). Sie entspricht also dem Hörsinnesorgan. Funktionsorientiert gestaltet sich der Aufbau der Cochlea: Um die Schneckenachse (Modiolus), die Gefäße und Nerven des N. cochlearis enthält, windet sich zweieinhalb Mal die knöcherne Schnecke. Innerhalb des knöchernen Anteils bildet die Scala media durch die Basilar- und Reissner-Membran zwei die Scala media oben und unten umschließende Räume: Die Perilymphe enthaltenden Scala vestibuli und Scala tympani. Beide stehen über das Helicotrema miteinander in Verbindung. In der Scala media (auch als Ductus cochlearis bezeichnet) befinden sich neben der Endolymphe ebenfalls der Sinneszellapparat mit den Haarzellen. An der lateralen Wand der Scala media befindet sich das Ligamentum spirale, welches mit der Stria vascularis verbunden ist: Die Stria vascularis ist zuständig für die Bildung der kaliumreichen Endolymphe. Die Endolymphe ist wiederum Voraussetzung für die Bildung des positiven endocochleären Potentials (Tasaki und Spyropoulos 1959).

Die Cochlea ist durch den Ductus reuniens mit dem Vestibulum verbunden. Durch das Vestibulum werden eine räumliche Orientierung und die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes ermöglicht. Es besteht aus drei Bogengängen (Ductus semicirculares), welche jeweils senkrecht zu einander angeordnet sind. In den Bogengängen befinden sich die Cristae ampullares, die wiederum aus Stütz- und Sinneszellen aufgebaut werden. Die Erregung der Sinneszellen erfolgt durch Winkelbeschleunigungen. Weiterhin findet man im Vestibulum Sacculus, Utriculus und den Ductus endolymphaticus. In Utriculus und Sacculus liegen die Maculae staticae mit ihren Otolithenapparaten. Die Sinneszellen der Otolithenapparate werden durch Linearbeschleunigungen erregt. Hierdurch kann die Stellung des Kopfes im Raum registriert werden. Die Funktion des Ductus endolymphaticus ist bis heute noch nicht eindeutig erklärt.

1.2 VORKOMMEN VON MELANOZYTEN IM INNENOHHR

1.2.1 Melanozyten der Cochlea

In der Cochlea sind Melanozyten vor allem in der Stria vascularis, der Reissner'schen Membran und dem Modiolus zu finden. Die Stria vascularis besteht aus drei Zellschichten: Die „marginal cells“ bilden die Grenzschicht zur Endolymphe der Scala media und sezernieren Kalium aus dem intrastrialen Bereich in die Endolymphe; die „intermediate cells“ sind Melanin produzierende Zellen, also per definitionem Melanozyten; die unterste Schicht wird von den „basal cells“ gebildet. In der gesamten Stria finden sich viele Blutgefäße (La Ferriere 1974) mit denen die Melanozyten durch gap-junctions in Verbindung stehen (Takeuchi et al. 2001). Zellverbindungen über gap junctions werden von den Melanozyten außerdem untereinander, zu den „basal-cells“ und den Fibrozyten des Ligamentum spirale ausgebildet. Connexin 26 (Cx26) spielt bei dem Aufbau der gap junctions die größte Rolle (Kikuchi et al. 2000). Innerhalb der Windungen der Cochlea ist die Häufigkeit des Auftretens von Melanozyten unterschiedlich hoch: In den basalen Windungen der Cochlea sind weniger Melanozyten vorzufinden als in den apikalen Anteilen (Conlee 1989). Die Melanozyten liegen in einer frühen Phase der Entwicklung noch unterhalb der strialen Basalmembran, durchdringen diese später und legen sich zwischen die „marginal cells“ (Hilding und Ginzberg 1977).

1.2.2 Melanozyten des Vestibulums

Im Vestibulum finden sich Melanozyten vor allem im Bereich der Cristae und Maculae, den Bogengängen und ebenfalls in der Pars rugosa des endolymphatischen Sacks. Hier liegen die Melanozyten in einer „dark-cell-area“, die die Ampullae der Bogengänge und die Maculae des Utriculus umgibt (Kimura 1969). Sie werden hier von einem sezernierenden Epithel bestehend aus „epithelial dark cells“ (EDC) bedeckt. Beim Menschen sind morphologisch runde und spindelförmige Nuclei mit klarem Zytoplasma zu erkennen. Das Zytoplasma enthält außerdem braun pigmentierte Melanosomen, einen gut entwickelten Golgi-Apparat und endoplasmatisches

Retikulum. Ähnlich wie in der Stria vascularis besitzen die Melanozyten enge Zellverbindungen in Form von gap junctions, die die Melanozyten untereinander und mit den epithelialen Zellen, hier in Form der EDC (Masuda et al. 1994), verbinden. Hier finden sich vor allem Cx26 und ein geringer Anteil an Connexin 32 (Masuda et al. 2001). Die vestibulären Melanozyten stehen bei mongolischen Gerbils in Kontakt mit Schwann'schen Zellen und myelinisierten Fasern des N. vestibularis (Escobar et al. 1995).

1.3 FUNKTIONEN DER MELANOZYTEN IM INNENOHHR

Die Funktionen von Melanozyten in der Haut sind nach heutigem Kenntnisstand gut untersucht und bekannt. Sie dienen dort in erster Linie dem Schutz der Haut vor der UV-Strahlung der Sonne, welche zelltoxisch und dosisabhängig kanzerogen ist. Im Auge scheinen sie ebenso eine Rolle bei der Lichtabsorption und beim Schutz vor freien Radikalen zu spielen. Ganz anders verhält es sich jedoch mit Melanozyten im Innenohr. Deren Funktionen und Bedeutungen sind auch heute noch nicht vollständig geklärt, doch vieles deutet auf eine wichtige Rolle für den Hörsinn und für die Funktion des Vestibularsystems hin.

Fest steht, dass für die normale Entwicklung des Pigment-Systems während der Embryonalphase verschiedene Transkriptionsfaktoren (s. u.) notwendig sind. Sie sind für die Entwicklung und das Überleben der Melanoblasten verantwortlich. Aus Störungen in diesen Bereichen resultieren Krankheiten, die neben einer Hypopigmentation ebenfalls Innenohrstörungen aufweisen. Die Innenohr-Symptomatik kann dabei von einer Beeinträchtigung des Hörens bis zur völligen Taubheit reichen. Zusätzlich kann Schwindel auftreten (Boissy und Nordlund 1997).

Eine dieser Erkrankungen stellt das Waardenburg-Syndrom (WS) dar. Dieses autosomal dominant vererbte Syndrom geht mit einem Mangel an Melanozyten und anderen Neuralleisten-assoziierten Zellen in Innenohr und Haut einher (Tachibana et al. 2003). In Abhängigkeit der verschiedenen Symptome wird es in vier Subtypen unterteilt (WS1, WS2, WS3 und WS4). Allen vier Subtypen ist gemein, dass Mutationen in Genen vorliegen, welche für die Entwicklung und Differenzierung von Melanozyten wichtig sind. Dazu gehören MITF, PAX3, SOX10 und SLUG, welche Transkriptionsfaktoren codieren (Potterf et al. 2000; Pingault et al. 1998). Typisches Symptom der Waardenburg-Syndrome ist neben einer Hypopigmentation ebenfalls eine Taubheit.

Eine weitere Erkrankung, welche mit einer Störung der Melanozytenfunktion einhergeht, stellt die „Harada-Disease“ (auch Vogt-Koyanagi-Harada's Disease) dar. Hier kommt es sehr wahrscheinlich zu einer zellulären Hypersensibilität von Melanozytensensibilisierten Lymphozyten und einer Synthese von Antikörpern, die sich gegen Melanozyten richten. Diese CD4⁺-T-Lymphozyten erkennen spezifisch

Tyrosinase und gp100-Peptide der Melanozyten (Sugita et al. 2006) und bewirken eine Zerstörung der Melanozyten in Uvea, Innenohr, Haut, Haaren und Meningen. Typische Symptome sind neben einer bilateralen Panuveitis, einer exsudativen Netzhautablösung und Kopfschmerzen, eine Beeinträchtigung des Innenohres mit einem sensineuralen Hörverlust, Schwindel und Nystagmus (Ondrey et al. 2006; Kimura et al. 1996; Yoshimoto 1995).

Es existieren weiterhin verschiedene Versuchstiermodelle, welche die Notwendigkeit von Melanozyten im Innenohr für dessen korrekte Funktion verdeutlichen: Bei den Maus-Mutanten „viable dominant spotting“ kommt es durch einen Neuralleisten-Defekt zu einem Fehlen von Melanozyten. In der Cochlea dieser Mutanten ist keine „intermediate-cell“-Schicht zu finden und das endocochleäre Potential, welches bei gesunden Mäusen zwischen +80mV und +100mV liegt, ist hier nahezu null. Dies entspricht einem kompletten Hörverlust (Steel und Barkway 1989). Das endocochleäre Potential wird über die „basal-cells“-Grenze der Stria mit Hilfe der in den „intermediate cells“ vorhandenen Kalium-Kanälen KCNJ 10 (Kir.4.1) gebildet. Kalium wird in den intrastrialen Raum transportiert, wo es von den marginal-cells wieder aufgenommen und in die Endolymphe abgegeben wird (Marcus et al. 2002; Takeuchi et al. 2000). Geschieht dies nicht, entwickelt sich kein Potential.

Ein Vergleich von „microphthalmia mice with no melanocytes“ (mibw/mibw) mit Albinomäusen mit Melanozyten, jedoch ohne Melaninsynthese (c2J7c2J), und einem Wildtyp zeigt, dass die Mäuse des Wildtyps und jene ohne Melanin in Hörschärfe und Aufbau der Stria vascularis normgerecht sind und sich in der Hörschärfe kaum voneinander unterscheiden. Doch bei den Mäusen ohne Melanozyten (mibw/mibw), welchen dementsprechend die „intermediate-cell“-Schicht fehlt, findet sich wieder ein signifikanter Hörverlust (Motohashi et al. 1994).

Auch bei einem Stamm von Meerschweinchen („German waltzing guinea pigs“) stellt man in seiner homozygoten Form (gw/gw) Charakteristika einer Innenohrstörung wie Hörverlust und Desorientierung fest. Histologische Untersuchungen des Innenohres zeigen eine kollabierte Reissner'sche Membran, eine Zerstörung der Scala media und eine Reduzierung der Stria vascularis in Höhe und Breite. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Veränderungen auch durch eine Störung in der Melanozytenfunktion mitverursacht wurden (Jin et al. 2006). Melanozyten im Innenohr besitzen weiterhin protektive Funktionen. Durch zwei Enzyme der

Melanozyten wird die Stria vascularis geschützt: Eine Carboanhydrase versetzt die Zellen in die Lage, CO_2 in HCO_3^- zu konvertieren, und eine Catalase dient der Bekämpfung freier Radikale. Sowohl CO_2 als auch HCO_3^- sind Produkte des starken Zellstoffwechsels in den Mitochondrien der „marginal cells“ (Wangemann et al. 2004). Das Melanin selbst fungiert ebenfalls als Schutz der Melanozyten, z. B. vor H_2O_2 , welches DNA-Schäden hervorrufen kann (Hoogduijn et al. 2004).

1.4 AMINOGLYKOSIDE

Aminoglykoside sind Antibiotika, die sich durch eine bakterizide Wirkung auf bakterielle Erreger auszeichnen. Angriffspunkte sind die 30S- und 70S-Ribosomen und die Zellwände der Erreger. Sie gelten als Breitspektrum-Antibiotika, da sie gegen eine Vielzahl von bakteriellen Erregern wirksam sind: Dazu gehören gramnegative Stäbchen wie Enterobakterien (z. B. *Escherichia coli*, Klebsiellen und *Pseudomonas aeruginosa*), aber auch grampositive Staphylokokken. Meist werden sie bei schweren Infektionen als Kombinationspartner von Penicillinen oder Cephalosporinen eingesetzt. Die intravenöse Gabe wird bevorzugt, da das Antibiotikum bei oraler Gabe kaum resorbiert wird. Es existieren aber auch lokale Anwendungsformen als Gentamicin-Augentropfen oder lokale intratympanale Injektionen (s. u.). Zu den klassischen Nebenwirkungen der Aminoglykoside, wie Gentamicin (GM), Tobramycin oder Streptomycin, zählen die Nephro- und Ototoxizität. Beide Nebenwirkungen resultieren aus einer Anreicherung der Aminoglykoside an bestimmten Lokalisationen (Niere: Tubuluszellen, Ohr: Endo- und Perilymphe).

Die Ototoxizität wird heutzutage auf eine Akkumulation des Aminoglykosids in den Sinneszellen des Innenohres mit darauf folgender Schädigung zurückgeführt (Aran et al. 1999; Hashino et al. 1997). Die Ototoxizität von Aminoglykosiden wird jedoch auch therapeutisch bei der Behandlung des Morbus Menière genutzt. Der M. Menière ist eine Erkrankung, die mit typischen anfallsartigen Symptomen einhergeht: einseitiger Hörverlust, Tinnitus und Drehschwindel. Ursache ist ein endolymphatischer Hydrops mit unbekannter Ätiologie. Durch die intratympanale Applikation von Aminoglykosiden wird eine Reduktion des Schwindels erreicht. Die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen Hörschädigung variiert je nach Präparat und Dosis

(Berryhill und Graham 2002; Quaranta und Piazza 2000; Hirsch und Kamerer 1997).

Bei Untersuchungen der Schädigungen durch Aminoglykoside fällt auf, dass nicht nur die Sinneszellen des Innenohrs in Mitleidenschaft gezogen werden, sondern auch die Melanozyten: Bei Meerschweinchen sind nach i.m.-Injektionen von Gentamicin nicht nur Veränderungen in den EDC des Vestibulums zu finden, sondern auch eine gesteigerte Synthese von Melanosomen durch die dortigen Melanozyten. Der Anstieg der Melanosomenzahl ist dabei abhängig von der GM-Dosis (Yoshihara et al. 1994, 1997; Gratacap et al. 1989). Melanin ist auch *in vivo* dazu fähig, eine GM-Schädigung teilweise zu kompensieren, wie sich im Versuch von Conlee et al. (1995) zeigt. Dort fällt bei Albino-Meerschweinchen nach subkutan injizierter GM-Gabe die Schädigung der Cochlea höher aus als bei Meerschweinchen ohne Melanozytenfunktionsstörung. Das Melanin der Melanozyten ist in der Lage, neben vielen chemischen Verbindungen wie organischen Aminen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, auch Medikamente wie Chloroquin, Benzodiazepine und Aminoglykoside wie Gentamicin und Streptomycin zu binden und zu speichern (Barrenäs et al. 1997; Larrson 1993; Jimbow et al. 1991; Conlee et al. 1989). Diese Eigenschaft des Melanins wurde bei Aminoglykosiden *in vitro* bestätigt (Barza et al. 1976).

Basierend auf diesen beschriebenen Beobachtungen verfolgt diese Doktorarbeit das Ziel, Zellkulturen von Melanozyten zu etablieren, um eine stabile Grundlage für die weitere Erforschung der spezifischen Eigenschaften der Melanozyten *in vitro* zu schaffen. Des Weiteren sollen bereits die Auswirkungen des Aminoglykosids Gentamicin auf Zellzahl und Melaningehalt der Zellkulturen untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 MÄUSE

Es wurden insgesamt 40 weibliche und männliche, erwachsene C57/BL6-Wildtyp-Mäuse verwendet.

2.2 KULTURMEDIUM

Das Kulturmedium hatte folgende Zusammensetzung:

5 % FKS ohne Calcium

1 % HMGS

1 % Penicillin

0,05 mM Calciumchlorid

in 100 ml Medium 154 CF.

2.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Aceton:	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid:	Cascade Biologics, Mansfield, UK
Dispase II:	Boehringer, Mannheim
HMGS:	Cascade Biologics, Mansfield, UK
Eindeckungsmedium:	Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
Laminin:	Sigma, Dreisenhofen
Medium 154 CF:	Cascade Biologics, Mansfield, UK

Paraformaldehyd:	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin 1 M:	Grünenthal, Aachen
Soluene:	Packard Bioscience, Groningen, Niederlande
Triton X -100:	Serva, Heidelberg
Trypanblau (o, 4 %):	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.4 IMMUNHISTOCHEMIE

2.4.1 Primärantikörper

Mart-1/Melan-A:	monoklonaler Antikörper des Kaninchen (NeoMarkers Inc., Fremont, USA), Endverdünnung 1:20
Vimentin GP CP53:	monoklonaler Antikörper des Meerschweinchens (Progen, Heidelberg), Endverdünnung 1:50

2.4.2 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper stammen von der Firma MoBiTec (Göttingen).

Anti-Guinea-Pig:	Alexa 488 IgG (H+L); goat; MoBiTec A 11073; Endverdünnung 1:600
Anit-rabbit:	Alexa 594 F(ab') ₂ ; goat; MoBiTec A 11072; Endverdünnung 1:1000

2.4.3 DNA-Färbung

Die DNA-Färbung erfolgte mittels DAPI (4',6-Diamidin-2',-phenylindol-dihydrochlorid) der Firma Roche Mannheim in einer Verdünnung von 1:5000.

2.4.4 Puffer und Lösungen

Formaldehyd 2 %:	4g Paraformaldehyd auf 200ml PBS
PBS (10x):	160g NaCl, 4g KCl, 23,6g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat), 4g KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat) auf 1l Aqua dest., alle Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA (0,025 %/0,01 %):	Biochrom, Berlin

2.5 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL

Brutschrank:	Heraeus Typ BBD 6220 (Kendro Laboratory Products, Hanau)
Digitalkamera:	Olympus CAMEDIA C-5050 ZOOM (OLYMPUS Optical Co. Europa GmbH, Hamburg)
Feinwaage:	Sartorius BL3100 (Sartorius AG, Göttingen)
Mikroskope:	Leica DMIL, Lichtmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar); Leica MZ6 (Leica Microsystems, Wetzlar), Zeiss Axioplan 2, Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss GmbH, Jena) mit CCD-Kamera Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching)
Objektträger:	76x26x1mm (Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen); Cytoträger 76x26x1mm (Shandon, Pittsburgh, PA, USA)
Petrischalen:	Falcon 35, Tissue Culture Dish, 100x20mm Style; Falcon 35, Tissue Culture Dish, 60x15mm Style; Falcon 35, Tissue Culture Dish, 30x10mm Style (alle

	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France)
Photometer:	Ultrospec 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)
Skalpell:	Cutfix, Surgical Disposable Scalpel (B. Braun AESCULAP, Tuttlingen)
UV-Küvetten:	UV-Küvette mikro 70µl (Brand GmbH, Wertheim)
Wellplatten:	MULTIWELL™ 12 well (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France)
Werkbank:	Heraeus HS12 (Kendro Laboratory Products, Hanau)
Zentrifuge:	Heraeus Labofuge 400e (Heraeus Instruments, Osterode); Cytospin 3 (Shandon, Pittsburgh, USA)

3 METHODEN

3.1 PRÄPARATION DER MAUS

Unter Zuhilfenahme einer Pinzette wurde der Tod der Mäuse durch Genickbruch herbeigeführt. Der Kopf der Maus wurde mittels Skalpell abgetrennt und das Fell entfernt. Durch einen Sagittal-Schnitt wurden zwei Schädelhälften gewonnen und die Gehirnannteile entfernt. Dadurch wurden bereits Teile des Innenohrs sichtbar (siehe Abb. 1a). Mit dem Skalpell wurde das Innenohr vorsichtig herausgelöst (siehe Abb. 1b) und in eine Petrischale mit PBS-Pufferlösung überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Stereomikroskop.

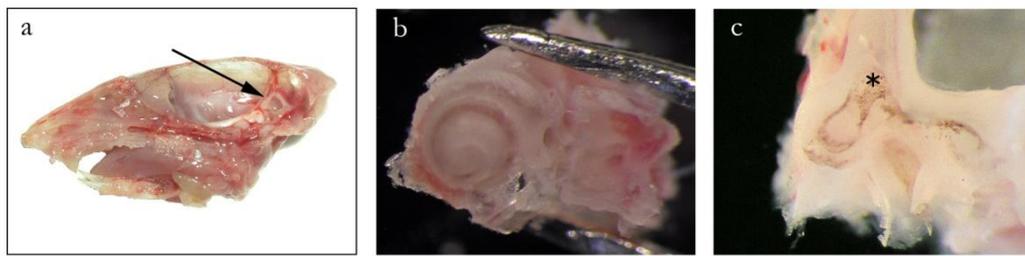


Abb. 1: Stadien der Präparation des Innenohres.

- a: Sagittal-Schnitt des Mausekopfes mit Blick auf die Bogengänge des Vestibulums (Pfeil).
- b: Herausgetrenntes Innenohr mit Blick auf die Cochlea.
- c: Eröffnetes Vestibulum mit Freilegung der Melanozyten (*).

In der Schale wurde bei geringster Vergrößerung durch zwei Pinzetten Vestibulum und Cochlea von Muskel- und anderem Weichteilgewebe getrennt. Weiterhin wurde durch leichte Seitwärtsbewegungen der knöchernen Innenohranteile in der Pufferlösung ein Säubern von Haaren erreicht. Da die Pufferlösung schnell durch Blut und Haaranteile verunreinigt und somit die Präparation erschwert, wurden die Innenohre in eine weitere Schale mit PBS-Pufferlösung (ggf. auch in eine dritte Schale) überführt. Dort wurde die Präparation unter dem Mikroskop mit steigender Vergrößerung fortgesetzt, bis die Innenohre weitgehend frei von Muskelanteilen waren. Der nächste Schritt beinhaltete die Trennung von Cochlea und Vestibulum. Durch leichten Druck mit einer Pinzette am Übergang von Cochlea und Vestibulum brachen beide Anteile auseinander und wurden von da an getrennt voneinander präpariert. Es wurde jeweils eine separate Zellkultur angelegt.

Durch eine Präpariernadel wurde bei dem Vestibulum und bei der Cochlea vorsichtig die knöcherne Wand durchbrochen, so dass ein Zellverband mit pigmentierten Zellen sichtbar wurde (siehe Abb. 1c). Nun wurde die knöcherne Wand entlang dieses Zellverbandes aufgebrochen (z. B. entlang der Bogengänge), um dann mittels Pinzette diesen Verband durch leichten Zug herauszulösen. Dieser Zellverband und der verbliebene Knochenanteil wurden in 3 ml Dispase (entspricht 6 U) gebracht und für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert.

3.2 ZELLKULTUR

3.2.1 Beschichtung der Kulturschalen

Die Kulturschalen und Wellplatten, in welchen man die Zellen kultivierte, wurden mit Laminin beschichtet. Dafür wurde eine auf die jeweilige Schalengröße abgestimmte Menge Laminin-Lösung ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) in die Schale gegeben und für 60 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die verbliebene Menge Laminin-Lösung entnommen und die Schale mit PBS für 2 Minuten gewaschen.

3.2.2 Ansetzen der Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen Schritte waren für Vestibulum und Cochlea identisch, werden aber anhand der Vestibulumzellen dargestellt.

Nach der Inkubation für 24 Std. wurde der komplette Inhalt der Schale (Zellen, Vestibulum-Knochenanteile und Dispase) mit einer Pipette in ein mit 5 ml 10 %igen FKS gefülltes Falconröhrchen überführt und durch starkes auf- und abpipettieren durchmischt. Der Überstand wurde in ein neues Falconröhrchen gegeben, 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert und dekantiert (Abb. 2 a). Das Pellet wurde mit dem Kulturmedium aufgelöst und in eine Kulturschale überführt (Abb. 2 b). Auf den Rest der verbleibenden Anteile im Falconröhrchen gab man 2 ml 0,25 %iges Trypsin und brachte es für 10 min bei 37°C in den Brutschrank (Abb. 2 c), um etwaige Zellen, die

noch mit den Knochenanteilen verbunden waren, zu lösen. Anschließend stoppte man die Trypsinierung durch Zugabe von 5 ml 10 %igen FKS (Abb. 2 d). Erneut kam es zur Durchmischung durch Auf- und Ab-Pipettieren, Übertragen des Überstandes in ein neues Falconröhrchen, welches wieder zentrifugiert (Abb. 2 e) und dekantiert wurde. Anschließend folgte das Aussäen des Pellets (Abb. 2 f).

Auch der Rest im zweiten Falconröhrchen, welcher den größten Anteil an Knochenanteilen besaß, wurde nun komplett angelegt (Abb. 2 g).

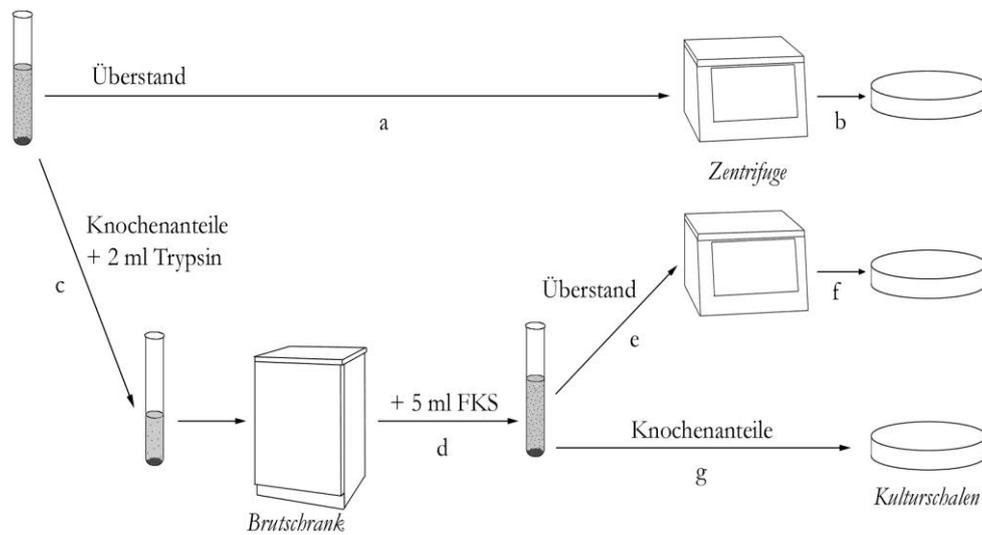


Abb. 2: Schematische Darstellung des Proziedere für das Ansetzen der Zellkulturen

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. Nach 5 Tagen wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt. Die weiteren Medienwechsel erfolgten alle drei Tage.

3.2.3 Umsetzen der Zellen

Das Umsetzen der Zellen erfolgte, wenn die Kultur mindestens eine Konfluenz von 70 – 80 % aufwies.

Aus der Schale bzw. aus dem Well wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 1 ml PBS für 2 Minuten gespült. Nach Entfernung des PBS gab man im Anschluss

1 ml der EDTA/Trypsin-Lösung hinzu, um die Melanozyten vom Boden zu lösen. Mittels Pasteur-Pipette nahm man ein wenig der Lösung auf, „spritze“ damit die Zellen vom Boden ab und überführte diese in ein Falconröhrchen, in dem sich 5 ml 10 %iges FKS befand. Danach wurde nochmals mit 2 ml FKS nachgespült. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 2 ml Kulturmedium aufgelöst. Das Medium-Zell-Gemisch wurde, wie auch beim Anlegen der Zellen, in eine mit Laminin-beschichtete Schale überführt.

3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE TECHNIKEN

Um die Zellen der Zellkultur immunhistochemisch mit Antikörpern zu färben, mussten die Zellen auf den Deckgläsern vorliegen. Dazu waren die im Folgenden beschriebenen Punkte durchzuführen.

3.3.1 Vorbereitung der Deckgläser

Die Deckgläser wurden, ebenso wie die Zellkultur-Schalen, mit Laminin beschichtet. Vor der eigentlichen Beschichtung mussten die Deckgläser mit Aceton „angeraut“ werden, um eine bessere Bindung des Laminins an der Oberfläche der Deckgläser herzustellen. Hierzu wurden diese einzeln mit einer Pinzette für ca. 15 – 30 Sekunden in Aceton getaucht und anschließend mit PBS nachgespült. Danach legte man sie in eine neue Zellkultur-Schale.

Lagen alle Deckgläser in der Schale, wurden sie, wie in Kapitel 3.2.1 „Beschichtung der Kulturschalen“ dargestellt, beschichtet.

Nach Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.3 „Umsetzen der Zellen“ beschrieben, auf die Deckgläser überführt. Nach ca. 5 – 7 Tagen war meist eine ausreichende Konfluenz der Zellen auf den Deckgläsern erreicht und somit genügend Material vorhanden, um die Zellen zu färben.

3.3.2 Formaldehyd-Fixierung

Um alle Lebensvorgänge abzustoppen, strukturelle Veränderungen zu verhindern und Zellen für die nachfolgende Färbung zu stabilisieren, wurde eine Fixierung mit 2 % Formaldehyd in PBS durchgeführt.

Dazu entnahm man die Deckgläser mit einer Pinzette von den Zellkultur-Schalen und brachte sie auf einen Träger. Dieser Träger wurde samt den Deckgläsern für 10 Minuten in Formaldehyd 2% gebracht und anschließend 5 min. in Ammoniumchlorid. Danach wurde zweimal 5 min. in PBS gewaschen und die Deckgläser 15 min. lang mit Triton X-100 behandelt. Die Triton-Behandlung war notwendig, da Antikörper, wie beispielsweise der Mart-1/Melan-A-Antikörper, an intrazelluläre

Antigene banden. Die Lipiddoppelschicht der Zellen bildete jedoch eine natürliche Barriere und verhinderte somit diese Bindung. Die Behandlung mit Triton X-100 führte zur Bildung von kleinen Löchern in der Membran und somit zur Überwindung der Barriere. Die Deckgläser wurden direkt im Anschluss immunhistochemisch gefärbt.

3.3.3 Immunhistochemische Färbung

Auf die Deckgläser wurde der jeweilige Primärantikörper gegeben und für 30 min. in einer „feuchten Kammer“ inkubiert. Nach zweimaligen, 10 min. langen Waschen in PBS wurde der Sekundärantikörper, wiederum in der „feuchten Kammer“, für 30 min. aufgebracht. Danach wurden die Deckgläser mit PBS abgespült, 5 min. in diesem gewaschen und anschließend für die DNA-Färbung 1 min. mit DAPI inkubiert. Auch hiernach wurde zweimalig für 10 min. mit PBS und einmal für 5 min. mit Aqua dest. gewaschen. Schließlich wurden die Deckgläser mit Fluoromount-G eingedeckelt, über Nacht bei RT und anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Jeder Färbedurchgang wurde mit mindestens einer Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dabei wurde ein Negativ-Kontroll-Antikörper (rabbit, 1:100) auf das Deckglas gegeben und dieses anschließend mit den Sekundär-Antikörpern inkubiert.

3.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit einem Zeiss Immunfluoreszenzmikroskop.

3.4 GENTAMICIN-VERSUCH

Für den Gentamicin-Versuch wurden insgesamt 30 Kulturschalen vorbereitet. Diese inkubierte man mit zwei unterschiedlich hohen Gentamicin-Konzentrationen für 4 Tage. Im Anschluss wurde die Trypanblau-Färbung für die Zellzählung durchgeführt und die Melanin-Konzentrationen bestimmt.

3.4.1 „Pooling“ der Zellen

Um eine möglichst große Zellausbeute zu erlangen, wurden die Zellen von verschiedenen Mäusen „gepoolt“. Dies bedeutet, dass Zellen gleichen Ursprungs (Vestibulum oder Cochlea), maus- und altersunabhängig von den Kulturschalen abgelöst, zusammen vermischt und neu angelegt wurden. Auf diesem Wege entstand aus insgesamt 16 Mausekulturen jeweils für Vestibulum und Cochlea eine neue „gepoolte“ Zellkultur, welche dann Generationen von P_0 bis P_2 beinhaltete. Diese Zellkultur wurde gleichmäßig auf 30 Zellkulturschalen (15 Kulturschalen von Zellen vestibulären Ursprungs und 15 Kulturschalen von Zellen cochleären Ursprungs) verteilt.

3.4.2 Inkubation der Zellen mit Gentamicin

Für die Ermittlung einer passenden Gentamicin-Konzentration wurde die Studie (Isefuku et al. 2003) als Orientierung verwendet.

Kulturschale	Zell-Ursprungsort	GM-Konzentration (µg/ml)
1-2	Vestibulum	Ø (Kontrolle)
3-4	Vestibulum	10
5-6	Vestibulum	200
7-8	Cochlea	Ø (Kontrolle)
9-10	Cochlea	10
11-12	Cochlea	200
Wiederholungsversuch:		
13-15	Vestibulum	Ø (Kontrolle)
16-18	Vestibulum	10
19-21	Vestibulum	200
22-24	Cochlea	Ø (Kontrolle)
25-27	Cochlea	10
28-30	Cochlea	200

Tabelle 1: GM-Konzentrationen der Kulturschalen

Das Gentamicin wurde zusammen mit dem Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Am 2. Tag des Versuches wurde das Kulturmedium inkl. Gentamicin erneuert. Am Tag 4 endete der Versuch mit Entnahme des Mediums, Spülen mit PBS und Ablösen der Zellen. Die Zellen wurden für jede Kulturschale in ein separates Tube überführt. Nach Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes eines Tubes wurde das Pellet in 200 µl PBS gelöst und jeweils auf 2 neue Tubes verteilt. Demnach entfielen für die Melanin-Bestimmung und die Trypanblau-Färbung jeweils 100 µl der Zellsuspension.

3.4.3 Melanin-Bestimmung

Zu Beginn wurde eine Eichkurve für natürliches Melanin erstellt, mit Hilfe der man später die Melaninkonzentrationen der Proben ablesen konnte. Hierfür wurde eine Stammlösung angesetzt (1 mg/ml), das Melanin in Soluene gelöst und verdünnt (von 0,5 µg/ml bis 40µg/ml). Die Zellproben wurden bei 900 rpm für 3 min. zentrifugiert und dekantiert. Das Pellet wurde mit 220 µl Soluene gelöst und in ein Eppendorf-Tube überführt.

Die Tubes kamen nun für 2 Std. bei 50°C in ein Wasserbad. Nach kurzem Abkühlen der Proben wurden die Extinktionen im Vergleich zu Soluene bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen.

3.4.4 Trypanblau-Färbung

Die Lebensfähigkeit von Zellen konnte durch eine Trypanblaufärbung geprüft werden. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau passiert defekte Zellmembranen toter Zellen, diffundiert in das Cytosol und färbt die Zellen tiefblau. Unter dem Mikroskop erschienen deswegen tote Zellen blau, lebende Zellen hell. Für die Trypanblau-Färbung wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in ein Tube überführt. Hinzu kamen 360 µl PBS und 270 µl Trypanblau. Diese Lösung wurde bei 37°C für 5 min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl und die Anzahl der blau markierten Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4 ERGEBNISSE

Das Ziel der Etablierung einer Zellkultur von Melanozyten aus dem Innenohr von Mäusen wurde bei 38 von 45 Kulturansätzen erreicht. Während der Anfangsphase der Doktorarbeit scheiterten 4 Versuche und weitere 3 Kulturen waren mit einem Pilz befallen.

Der zu Beginn durchgeführte Versuch, das bereits etablierte Schafmodell auf Mäuse zu übertragen, scheiterte. Aus diesem Grund wurden das Kulturmedium angepasst und die Kulturbedingungen verändert. Das Kulturmedium „Melanocyte Growth Medium“ (Promo Cell, Heidelberg) wurde durch ein Medium auf Basis des „154 CF“ (Cascade Biologics, Mansfield, UK) ersetzt (siehe 1.2. „Kulturmedium“). Aus dem Antibiotika-Anteil, bestehend aus Penicillin und Gentamycin, wurde Gentamycin ersatzlos gestrichen, um eine Beeinflussung des Gentamycin-Versuches zu vermeiden. Der Calcium-Anteil wurde auf 0,05 mM gesenkt. Die Kulturbedingungen änderte man zunächst durch die Verwendung von CO₂-Schalen vom Typ „lumox DISH 50 HYDROPHILIC“ (Greiner bio-one, Frickenhausen). Diese sollten eine bessere Versorgung der Melanozyten mit CO₂ garantieren, da der Schalenboden aus CO₂-diffundierbarem Material bestand. Diese Maßnahme wurde jedoch wieder verworfen, da diese bei der Zellkultur keine Vorteile gegenüber den normalen Kulturschalen zeigten. Der Durchbruch gelang mit der Beschichtung der Kulturplatten mit Laminin. Hierdurch kam es zu einer starken Steigerung von erfolgreichen Zellkulturen und einem schnelleren Wachstum der Melanozyten. War eine ausreichende Konfluenz für das Passagieren einer Kultur vor den Änderungen erst nach 2 bis 3 Wochen erreicht, war dies nach den genannten Änderungen nach 5 bis 7 Tagen möglich.

In den Zellkulturen waren neben Melanozyten auch Fibroblasten und epitheliale Zellen zu finden. Versuche, Monokulturen von Melanozyten zu etablieren, scheiterten an einem fehlenden Wachstum der Melanozyten ohne das Vorhandensein von Fibroblasten. Die epithelialen Zellen ließen sich nicht Passagieren. Die Melanozyten lagen zusammen mit Fibroblasten und epithelialen Zellen ohne erkennbare Anordnung in den Kulturen vor. Die Kulturen ließen sich für 3 bis 4 Generationen passagieren. In der 4. Passage waren meist keine Melanozyten mehr vorhanden.

4.1 MORPHOLOGIE

Die Melanozyten lagen zu Beginn der Kultivierung hauptsächlich als bipolare Zellen mit länglich geformten Somata vor. Nach einigen Tagen waren häufiger auch tripolare und wenige dendritische Melanozyten zu finden, welche runde Somata besaßen. Die dendritischen Fortsätze waren fein und liefen spitz zu. Melaninpigmente waren weder durch das Lichtmikroskop noch durch das Doppelkontrastmikroskop zu erkennen. Im Doppelkontrastmikroskop imponierten die Melanozyten durch helle Somata und ließen sich so gut von den Fibroblasten unterscheiden. Morphologische Unterschiede zwischen Melanozyten vestibulären Ursprunges und cochleären Ursprunges bestanden nicht.

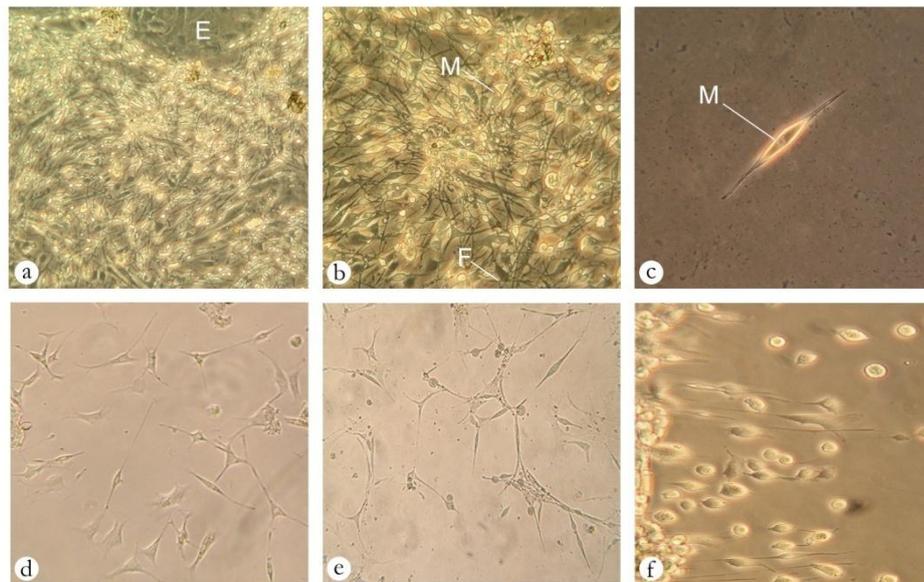


Abb. 3: *obere Reihe*: (a) Blick auf eine Zellkultur mittels Doppelkontrastmikroskop. Melanozyten sind durch helle, leuchtende Somata erkennbar. Epitheliale Zellen (**E**) liegen nur in frühen Zellkulturen vor. (b) Melanozyten (**M**) bilden mit Fibroblasten (**F**) diffuse Netze. (c) Ein einzelner Melanozyt mit bipolarem Erscheinungsbild. *untere Reihe*: Unter dem Lichtmikroskop lassen sich cochleäre (d) und vestibuläre (e) anhand der Morphologie nicht voneinander unterscheiden. (f) Unmittelbar nach Kultivierung der Melanozyten haben diese zunächst runde bis ovale Somata und keine dendritischen Ausläufer.

4.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Die Melanozyten waren bei der immunhistochemischen Färbung positiv für den Mart-1/Melan-A-Antikörper und ebenfalls positiv für den Antikörper von Vimentin GP CP53.

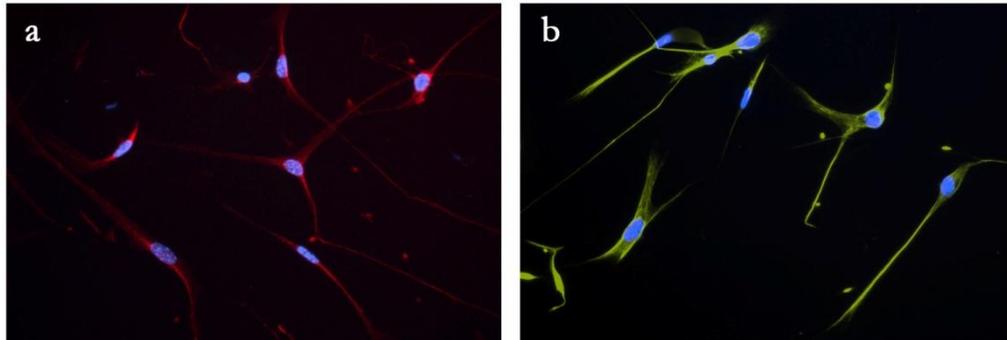


Abb. 4: Immunhistochemische Färbung der Melanozyten.

(a): Mart-1/Melan-A (rot)

(b): Vimentin (grün)

Kernfärbung mit DAPI (blau) dargestellt.

4.3 GENTAMICIN-VERSUCH

4.3.1 Trypanblau-Färbung

a) Vestibulum

Die Zellzahl in tausend pro ml zeigte bei den Zellen der Vestibulum-Kulturen bei einer GM-Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zunächst einen Anstieg. Die Zellzahl verminderte sich jedoch bei der höheren GM-Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf einen Wert, welcher unter der Kontrollgruppe ohne GM-Zusatz lag. Simultan zu den Ergebnissen der Zellzahlen änderten sich die prozentualen Anteile der toten Zellen. Auch deren Zahl stieg zunächst bei der GM-Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ an und fiel bei der höchsten GM-Konzentration unter den Wert der Kontroll-Kultur.

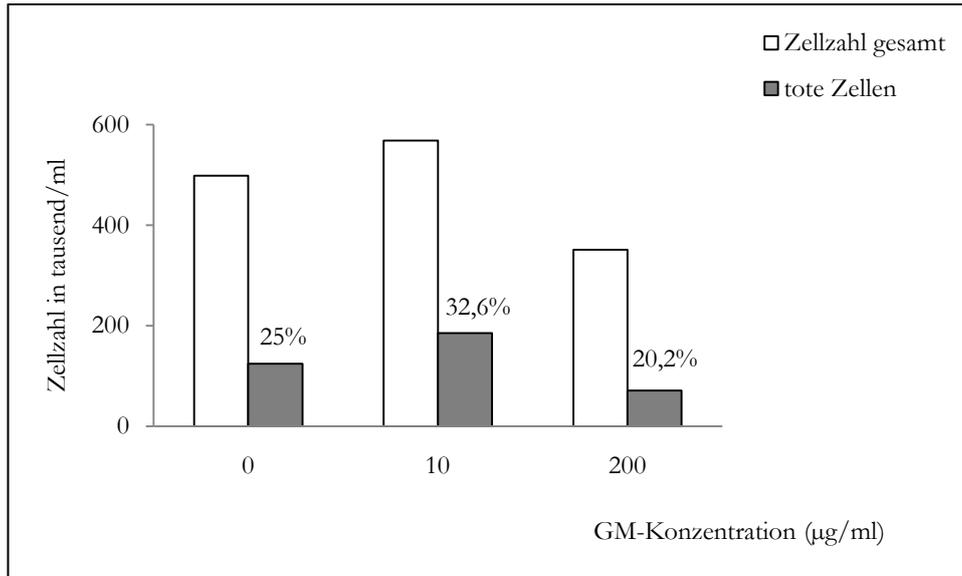


Abb. 4: Vestibulum: Zellzahlen in tausend/ml im Verhältnis zur Gentamicin-Konzentration (µg/ml) mit Prozentsatz der toten Zellen an der Gesamtzellzahl der Zellen.

b) Cochlea

Bei der Cochlea zeigen sich ähnliche Resultate wie bei dem Vestibulum, wobei die Zellzahl insgesamt unter dem Niveau des Vestibulums lag.

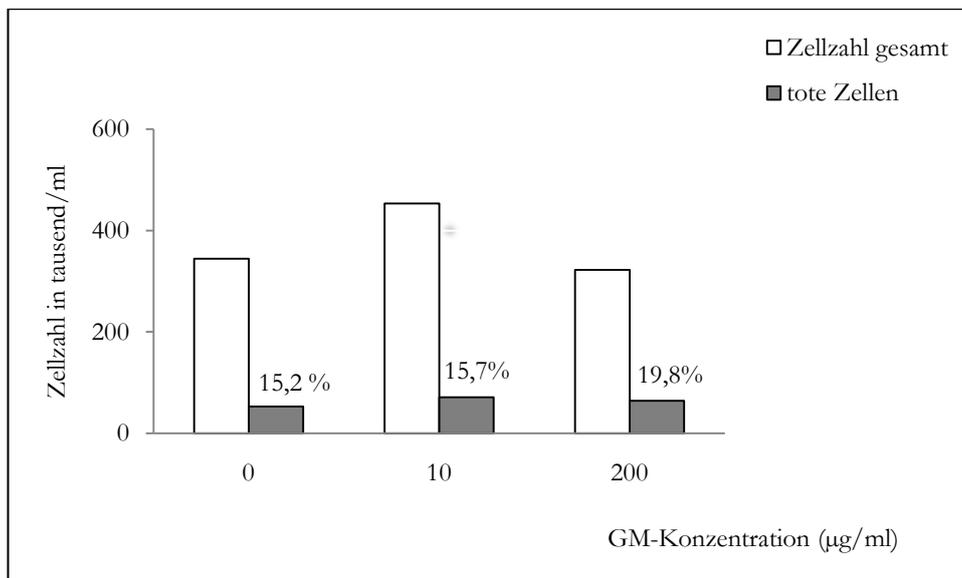


Abb. 5: Cochlea: Zellzahlen in tausend/ml im Verhältnis zur Gentamicin-Konzentration (µg/ml) mit Prozentsatz der toten Zellen an der Gesamtzellzahl der Zellen.

Bei den cochleären Kulturen lagen die Zellzahlen unter denen des Vestibulums, un-

abhängig der GM- Konzentration. Es zeigte sich jedoch ein ähnliches Bild. Bei der GM-Konzentration 10 µg/ml stieg die Zellzahl an, die jedoch bei der höchsten GM-Konzentration von 200 µg/ml wieder unter die Zellzahlen der Kontrollkulturen fiel.

4.3.2 Melanin-Bestimmung

Für die Melanin-Bestimmung wurden getrennt für die Vestibulum- und Cochlea-Kulturen die jeweiligen Mittelwerte der Zellzahlen und der Melanininghalte ermittelt. Diese wurden wiederum in Verhältnis zueinander gesetzt und der Melanininghalt in µg/1000 Zellen errechnet.

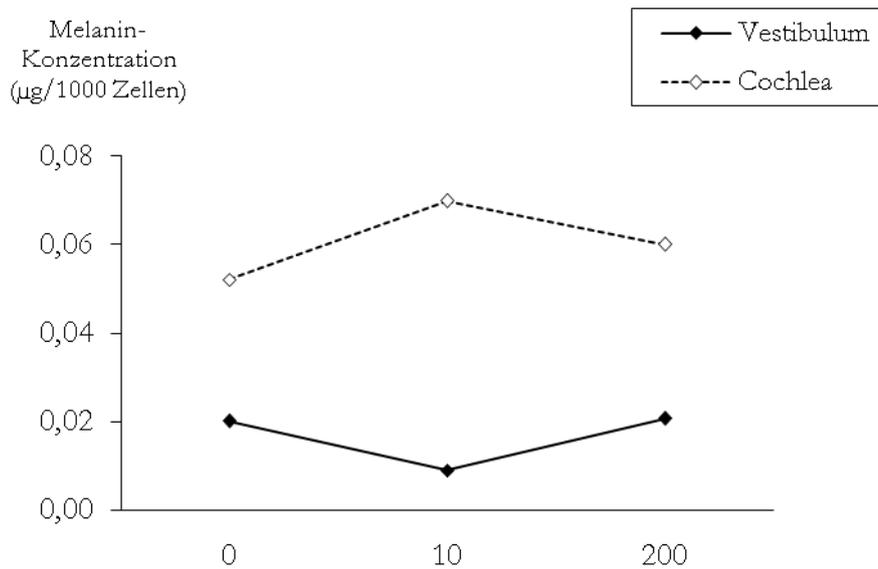


Abb. 6: Mittelwerte der Melaninkonzentrationen/1000 Zellen in Abhängigkeit der Gentamicin-Konzentrationen. Vergleich zwischen Cochlea und Vestibulum.

Es zeigte sich, dass die Kulturen der Cochlea unabhängig von den GM-Konzentrationen einen höheren Melanininghalt pro 1000 Zellen besaßen als die Kulturen des Vestibulums. Erkennbar war weiterhin, dass sich die Melanininghalte der Kulturen bei den mit GM versetzten Zellkulturen für Cochlea und Vestibulum gegensätzlich entwickelten: Sah man bei der Cochlea-Kultur einen Anstieg bei einer GM-Konzentration von 10 µg/ml, fiel diese bei der Vestibulum-Kultur ab. Bei der GM-Konzentration von 200 µg/ml wiederum fiel der Melanininghalt der cochleären Zellen wieder ab und stieg bei den vestibulären Zellen an.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal erfolgreich Zellkulturen von Melanozyten aus dem Innenohr von Mäusen etabliert und die Auswirkungen des ototoxischen Aminoglykosids Gentamicin auf Zellzahl und Melaningehalt der Zellkulturen untersucht. Durch die Zellkulturen ist nun die Grundlage geschaffen, weitergehende Untersuchungen an Melanozyten *in vitro* durchzuführen, um der Frage nach der Funktion der Melanozyten im Innenohr nachzugehen. Diese ist zu diesem Zeitpunkt weiterhin weitgehend ungeklärt. Ein erster Schritt in diese Richtung stellt der bereits hier durchgeführte Gentamicin-Versuch dar, bei welchem den Zellkulturen zwei unterschiedliche GM-Konzentrationen durch das Nährmedium zugeführt wurden. Weiterführende Ergebnisse könnten mittels Untersuchungen mit der patch-clamp-Methode, der Applikation von UV-Licht und der Behandlung mit anderen ototoxischen Substanzen erforscht werden. Solche Untersuchungen scheiterten bisher an der schweren Zugänglichkeit der Melanozyten im Felsenbein.

5.1 ZELLKULTUR

Wichtigste Rolle bei der Etablierung der Zellkulturen spielte die Verwendung bzw. die Beschichtung der Kulturschalen mit Laminin. Laminin, zu der Familie der Glykoproteine gehörend, besitzt einen wichtigen Stellenwert bei der Migration von Melanozyten und anderen „neuralcrest-derived cells“ an ihren Zielort (Calof und Lander 1991). Das Vorkommen von Laminin ist vielfältig, da es Bestandteil der extrazellulären Matrix des Bindegewebes ist und somit auch im Innenohr, z. B. in der Basilmembran und der Reissner'schen Membran in der Cochlea, zu finden ist (Rodgers et al. 2001). Mittels Laminin gelang bereits die Kultivierung von Schwann'schen Zellen (Honkanen et al. 2007), von Melanozyten des Auges (Smith-Thomas et al. 1996) und von pluripotenten Mesenchymzellen (Griffith und Sanders 1991). Im Innenohr von Mäusen scheint das Laminin ebenfalls ein wichtiger Faktor zu sein, der sich positiv auf das Überleben und/oder die Proliferation der Melanozyten auswirkt. Auf das Wachstum der Fibroblasten der Zellkulturen dieser Versuchsreihe indes schien Laminin keine oder zumindest nur geringe Auswirkungen zu haben. In den vorliegenden Zellkulturen war es nicht möglich, Monokulturen aus Me-

lanozyten zu etablieren. Die Melanozyten waren, unabhängig des vestibulären oder cochleären Ursprungs, nicht in der Lage, ohne Fibroblasten zu überleben. Gelang dies bei vestibulären Melanozyten des Schafes zumindest nach mehrmaligen Passagieren in späteren Zellkultur-Generationen (Sanchez-Hanke et al. 2006), scheiterten bei den Mauskulturen jegliche Versuche. Melanozyten scheinen demnach in Wachstum und/oder Aktivität von Fibroblasten maßgeblich beeinflusst zu werden. Andere Studien zeigten hier sowohl eine positive Beeinflussung der Fibroblasten auf Melanozyten anhand einer Steigerung der Tyrosinase-Aktivität (Smith-Thomas et al. 2001; Balafa et al. 2005) als auch eine negative Beeinflussung im Sinne einer Inhibition des Wachstums und der Differenzierung an Lokalisationen, an denen keine ausgeprägte Pigmentierung zu finden ist, wie z. B. an den Innenseiten der Hände und Füße (Yamaguchi et al. 2004).

Die Morphologie der Melanozyten in Kultur unterschied sich maßgeblich von beobachteten Zellen *in vivo*. *In vivo* zeichnen sich die Melanozyten durch viele dendritische Zellausläufer aus, beinhalten zahlreiche Melanosomen und sind stark pigmentiert (Masuda et al. 1995). Auch in anderen Zellkulturen imponieren sie als polydendritische, stark pigmentierte Zellen, z. B. bei menschlichen konjunktivalen Melanozyten (Hu et al. 2007). Im Gegensatz dazu lagen in den hier untersuchten Kulturen die Melanozyten hauptsächlich als bi- und tripolare dendritische Zellen vor, die untereinander keine oder nur wenig Zellverbindungen einzugehen schienen. Das Phänomen der unterschiedlichen Morphologie der Melanozyten im Vergleich von *in vivo* zu *in vitro* ist dabei bei epidermalen Melanozyten ein häufig beobachtetes Phänomen. Auch Sanchez-Hanke et al. (2006) beschrieb dies bei vestibulären Melanozyten des Schafes. Ursachen dafür könnten die veränderten Bedingungen einer Zellkultur gegenüber dem Innenohr sein, welche bestimmte Wachstumsvoraussetzungen nicht bieten.

Auffällig bei den Zellkulturen der Maus war, dass makro- und mikroskopisch in den Kulturen keine Melaninpigmente zu erkennen waren, obwohl diese bei der Präparation sichtbar waren (siehe Abb. 1). Somit musste zum eindeutigen Nachweis der Melanozyten eine immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen Marker (Mart-1/Melan-A) durchgeführt werden. Fraglich bleibt, warum sich keine Melaninpigmente zeigten, obwohl diese in anderen Zellkulturen zu finden waren (siehe oben).

Möglicherweise kommt es durch die veränderten Bedingungen in Kultur zu einem Fehlen spezifischer Faktoren, welche die Melanogenese bei cochleären und vestibulären Melanozyten der Maus anregen. Solch ein spezifischer Faktor könnte beispielsweise Melanotropin sein. Melanotropin (auch MSH oder „Melanozyten stimulierendes Hormon“) ist ein Neuropeptid, welches in dem Hypophysenvorderlappen synthetisiert wird. Eine Beeinflussung der Pigmentierung wurde bereits 1916 von Allen und von Atwell beschrieben, jedoch auch in neueren Untersuchungen (Kadekaro et al. 2003). Ebenso könnte der Calcium-Anteil des Nährmediums von 0,05 mM eine Rolle spielen. Calcium, welches zwar nicht essentiell für die Melanogenese ist, scheint jedoch einen wichtigen Stellenwert bei der Modulation der Melanogenese auf einen Stimulus wie UV-Licht (Carsberg et al. 1994) zu haben. In vergleichbaren Studien zeigte sich ein kontroverses Bild: Buffey et al. (1991) beschrieb bei einem Anstieg von intrazellulärem Calcium eine verminderte Aktivität der Tyrosinase und dadurch einen reduzierten Melaningehalt in Melanozyten. Meyer zum Gottesberge (1988) geht jedoch von einer Steigerung der Melanogenese durch Calcium aus. Spätere Versuche könnten anhand verschiedener Calcium-Konzentrationen in Kultur dieser Fragestellung nachgehen.

5.2 GM-VERSUCH

Der Gentamicinversuch sollte darstellen, in wieweit die bereits erforschte Ototoxizität des Aminoglykosids auf das Innenohr (siehe Einleitung) auch im Zusammenhang mit der Funktion bzw. dem Vorhandensein der Melanozyten im Innenohr steht. Dazu wurden neben einer Kontrollkultur jeweils für Vestibulum und Cochlea zwei unterschiedliche GM-Konzentrationen verwendet. Nach vier Tagen wurden die Kulturen jeweils nach Zellzahl (tote Zellen im Verhältnis zur Gesamt-Zellzahl) und Melaningehalt untersucht und in Verhältnis gesetzt. Orientierung zur Höhe der GM-Konzentration und Versuchsaufbau gab die Veröffentlichung von Isefuku et al. (2003), der den Effekt des Gentamicins auf Zellproliferation von kultivierten „osteoblast-like-cells“ untersuchte. Ähnliche Studien im Bezug auf Innenohre oder Melanozyten existierten zu diesem Zeitpunkt nicht.

Der bei der Zellzählung durchgeführte Vergleich der Gesamt-Zellzahl mit der Anzahl der toten Zellen erbrachte für Cochlea und Vestibulum uneinheitliche Ergebnisse. Bei beiden Kulturen kam es durch die niedrigere GM-Dosis zu einem Anstieg der Zellzahl und durch die hohe GM-Dosis von 200µg/ml zu einem Abfall der Zellzahl unter die Werte der Kontrollkulturen ohne GM-Zusatz. Hier schien GM demnach in geringen Dosen einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation zu besitzen und diesen Effekt in höheren Dosen umzukehren und die Proliferation zu hemmen. Unter Betrachtung der Zelltod-Rate schienen die Zellen des Vestibulums anfälliger für Zellschädigungen durch den niedrigeren GM-Zusatz zu sein als die Zellen der Cochlea, bei denen sich die Anzahl der toten Zellen unabhängig der GM-Konzentration kaum veränderte. Ein möglicher Erklärungsansatz fand sich bei der Beobachtung des Melaningehalts.

Der Melaningehalt lag bei den Zellen des Vestibulums in den Kulturen ohne GM-Zusatz bei 10,04 µg/ml (oder 0,02µg/1000 Zellen) und bei den Zellen der Cochlea bei 17,93µg/ml (oder 0,05µg/1000 Zellen). Somit war in diesen Kontrollkulturen der Melaningehalt bei den cochleären Zellen annähernd doppelt so hoch wie bei den verglichenen vestibulären Zellen. Da Melanin als protektiver Faktor in der Lage ist, GM zu binden und somit teilweise zu inaktivieren (siehe Einleitung), ist es denkbar, dass der höhere Melaningehalt der cochleären Zellen eine größere Zellschädigung in ähnlicher Höhe wie bei den vestibulären Zellen verhindert hat. Da die Gesamtheit aller Zellen einer Zellkultur untersucht wurde und nicht separat die Zellzahlen für Fibroblasten und Melanozyten, war es nicht möglich zu bestimmen, welchen Anteil diese an den Ergebnissen hatten.

Warum aber war der Melaningehalt in den cochleären Zellkulturen höher? Möglicherweise hat dies mit der schützenden Funktion der Melanozyten im Innenohr zu tun. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielen sowohl das Melanin als auch die Melanozyten in der Cochlea eine protektive Rolle, beispielsweise gegenüber Lärm. Lärm ist in der Lage, die Melanozyten zu einer vermehrten Synthese von Melanin anzuregen (Conlee et al. 1986, 1988; Gratton und Wright 1992). Ähnliche Beobachtungen wurden für das Vestibulum unter vergleichbaren Stressoren noch nicht beschrieben. Es ist möglich, dass die cochleären Melanozyten durch die häufigere Aussetzung schädigender Faktoren zu einer größeren Melanogenese angeregt wurden und diese Eigenschaft in Kultur beibehielten.

Ist GM neben der Beeinflussung der Zellzahlen auch in der Lage die Melanogenese im Innenohr zu beeinflussen? Yoshihara et al. (1994, 1997) beobachtete in vivo genau diesen Effekt. Dort kam es nach systemischer GM-Gabe zu einem Anstieg des Melaningehaltes. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen unterschiedliche Reaktionen auf die GM-Zugabe. Größten Einfluss auf die Melanogenese hatte hier die Konzentration von 10 µg/ml GM, während bei 200 µg/ml GM die Ergebnisse ähnlich der Kontrollkulturen ausfielen. Bei den cochleären Zellen könnte der Anstieg auch mit der protektiven Funktion zu tun haben. Der Abfall bei den vestibulären Zellen ist am ehesten mit der hohen Zelltod-Rate zu erklären. Diese war bei der GM-Konzentration von 10 µg/ml mit 32,6 % am höchsten. Dementsprechend kann dies auf einen größeren Anteil von toten Melanozyten hinweisen. Hier fehlen Vergleichswerte, da ähnliche Untersuchungen bisher nicht existieren.

Abschließend lässt sich sagen, dass es durch die etablierten Zellkulturen von Melanozyten aus dem Innenohren der Maus nun möglich geworden ist, weitere Versuche an Melanozyten in vitro durchzuführen, um die Frage nach deren Funktionen weiter zu klären. Versuche könnten zeigen, inwieweit sich die Melanozyten des Innenohrs zur weiteren Melanogenese anregen lassen. Denkbare Induktoren wären hierbei UV-Strahlung (Friedmann et al. 1990) oder Melanotropin, die sich bei Melanozyten-Kulturen der Haut bereits etabliert bzw. bewährt haben. Weiterhin unterstützen die Ergebnisse die Theorie der protektiven Funktion des Melanins bzw. der Melanozyten, vor allem in der Cochlea.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Melanozyten finden sich nicht nur in der Haut, sondern kommen ebenfalls im Innenohr vor. Dort sind ihre Funktionen noch nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials durch sekretorische und resorbative Eigenschaften und eine protektive Funktion gegenüber Noxen, wie ototoxischen Medikamenten, durch eine Anreicherung der Noxen im Melanin. Ziel der Arbeit war es, Melanozyten aus dem Innenohr von Mäusen zu kultivieren und diese Kulturen zu standardisieren. Dies sollte eine stabile Grundlage für die weitergehende Untersuchung über die Wirkung des ototoxischen Medikaments Gentamicin auf Zellzahl und Melaningehalt dieser Zellen schaffen.

Material und Methode: Insgesamt wurden bei 40 C57/BL6-Wildtyp-Mäusen die Innenohre und daraus die Zellverbände entnommen und jeweils separate Zellkulturen für das Vestibulumgewebe und für das Cochleagewebe angelegt. Im Anschluss konnten die Zellkulturen mit zwei verschiedenen Gentamicin-Konzentrationen inkubiert werden. Nach 4 Tagen wurden die Zellzahlen für vitale und letale Zellen und die Melaninkonzentrationen der Kulturen bestimmt.

Es ist gelungen, cochleäre und vestibuläre Melanozyten der Maus zu kultivieren und zu passagieren. Zum Erfolg der Kultivierung trugen die Beschichtung der Kulturschalen mit Laminin und Anpassungen des Kulturmediums bei. Die Kultivierung der Melanozyten war ebenfalls abhängig von der Anwesenheit von Fibroblasten. Die Melanozyten konnten anhand immunhistochemischer Färbung identifiziert werden. Zellmorphologisch ließen sich mikroskopisch keine Unterschiede zwischen Melanozyten vestibulären und cochleären Ursprungs feststellen. Der Melaningehalt bei den cochleären Kulturen lag im Mittel höher als bei den vestibulären Kulturen. Niedrige Gentamicin-Konzentrationen schienen das Zellwachstum anzuregen, hohe Konzentrationen hemmten das Zellwachstum. Gentamicin schien nur wenig Einfluss auf den Melaningehalt zu haben.

Durch die erfolgreiche Kultivierung ist es in Zukunft möglich, die Funktionen der Melanozyten und des Melanins im Innenohr in-vitro weiter zu erforschen. Aufgrund der separaten Zellkultur von Cochlea- und Vestibulum-Melanozyten könnten z. B. sekretorische Unterschiede mit Hilfe der „patch-clamp-Methode“ dargestellt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Allen BM. The results of extirpation of the anterior lobe of the hypophysis and of the thyroid of *Rana pipiens* larvae. *Science* 1916; *49*: 755-758.

Aran JM, Erre JP, Lima da Costa D, Debbah I, Dulong D. Acute and chronic effects of aminoglycosides on cochlear hair cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999; *884*: 60-8.

Atwell WJ. On the nature of the pigmentation changes following hypophysectomy in the frog larva. *Science* 1916; *49*: 48-50.

Barza M, Baum J, Kane A. Inhibition of Antibiotic Activity In Vitro by Synthetic Melanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1976; *Vol. 10, No. 3*: 569-570.

Berryhill WE, Graham MD. Chemical and physical labyrinthectomy for Menière's disease. *Otolaryngol Clin North Am* 2002; *35(3)*: 675-82.

Boissy RE, Nordlund JJ. Molecular Basis of Congenital Hypopigmentary Disorders in Humans: A Review. *Pigment Cell Res* 1997; *10*: 12-24.

Buffey JA, Hill SE, Bleehen SS, Thody AJ, Mac Neil S. Evidence for a calcium/calmodulin involvement in density-dependent melanogenesis in murine B16 melanoma cells. *Pigment Cell Res* 1991; *4(3)*: 112-9.

Conlee JW, Abdul-Baqi KJ, McCandless GA, Creel DJ. Differential susceptibility to noise-induced permanent threshold shift between albino and pigmented guinea pigs. *Hear Res* 1986; *23(1)*: 81-91.

Conlee JW, Abdul-Baqi KJ, McCandless GA, Creel DJ. Effect of aging in normal hearing loss and noise-induced threshold shift in albino and pigment guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1988; *106*: 64-70.

Conlee JW, Bennett ML, Creel DJ. Differential Effects of Gentamicin on the Distribution of Cochlear Function in Albino and Pigmented Guinea Pigs. *Acta Otolaryngol* 1995; *115*: 367-374.

Conlee JW, Parks TN, Schwartz IR, Creel DJ. Comparative anatomy of melanin pigment in the stria vascularis. Evidence for a distinction between melanocytes and intermediate cells in the cat. *Acta Otolaryngol* 1989; *107(1-2)*: 48-58.

Corti A. Recherches sur l'organe de l'ouïe mammifères. Première partie. *Z Wiss Zool* 1851; *3*: 109-169.

Gratacap B, Attard A, Laurent A, Stoebner P, Smirou D, Charachon R. An experimental study with control and kanamycin-intoxicated coloured guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol* 1989; *246*: 235-237.

Gratton MA, Wright CG. Hyperpigmentation of chinchilla stria vascularis following acoustic trauma. *Pigment Cell Res* 1992; *5(1)*: 30-37.

Hashino E, Shero M, Salvi RJ. Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res* 1997; *777(1-2)*: 75-85.

Hilding DA; Ginzberg RD. Pigmentation of the stria vascularis. The contribution of neural crest melanocytes. *Acta Otolaryngol* 1977; *84(1-2)*: 24-37.

Hirsch BE, Kamerer DB. Role of chemical labyrinthectomy in the treatment of Menière's disease. *Otolaryngol Clin North Am* 1997; *30(6)*: 1039-49.

Hoogduijn MJ, Cemeli E, Ross K, Anderson D, Thody AJ, Wood JM. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. *Exp Cell Res* 2004; *294(1)*: 60-7.

Hu DN, McCormick SA, Seedor JA, Ritterband DC, Shah MK. Isolation, purification and cultivation of conjunctival melanocytes. *Exp Eye Res* 2007; *84(4)*: 655-62.

Hudspeth AJ. The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science* 1985; *230(4727)*: 745-52.

Isefuku, Shuji; Joyner, Clive J.; Simpson, A. Hamish R. W.. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 2003; *17(3)*: 212-216.

Jin Z, Mannström P, Skjönsberg A, Järlebark L, Ulfendahl M. Auditory function and cochlear morphology in the German waltzing guinea pig. *Hear Res* 2006; *219*: 74-84.

Kadekaro AL, Kanto H, Kavanagh R, Abdel-Malek ZA. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 2003; *994*: 359-65.

Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; *32(1)*: 163-6.

Kimura H, Ohashi N, Aso S, Watanabe Y. Clinical Study of the Role of Melanocytes in the Inner Ear of Patients with Harada's Disease. *ORL* 1996; *58*: 233-237.

Kimura RS. Distribution, structure and function of dark cells in the vestibular labyrinth. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1969; *78*: 542-561.

Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; *282(2)*: C403-7.

Masuda M, Usami S, Yamazaki K, Takumi Y, Shinkawa H, Kurashima K, Kunihiro T, Kanzaki J. Connexin 26 distribution in gap junctions between melanocytes in the human vestibular dark cell area. *Anat Rec*. 2001 Feb 1; *262(2)*:137-46 2001; *262(2)*: 137-46.

Masuda M, Yamazaki K, Kanzaki J, Hosoda Y. Ultrastructure of melanocytes in the dark cell area of human vestibular organs: functional implications of gap junctions, isolated cilia, and annulate lamellae. *Anat Rec* 1994; *240(4)*: 481-91.

Mayer TC. The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol*. 1973; *34(1)*: 39-46.

Meyer zum Gottesberge AM. Imbalanced calcium homeostasis and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol Suppl* 1988; *460*: 18-27.

Motohashi H, Hozawa K, Oshima T, Takeuchi T, Takasaka T. Dysgenesis of melanocytes and cochlear dysfunction in mutant microphthalmia (mi) mice. *Hear Res*. 1949; *80(1)*: 10-20.

Ondrey FG, Moldestad E, Mastroianni MA, Pikus A, Sklare D, Vernon E, Nusenblatt R, Smith J. Sensorineural hearing loss in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Laryngoscope* 2006; *116(10)*: 1873-6.

Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 1998; *18(2)*: 171-3.

Potterf SB, Furumura M, Dunn KJ, Arnheiter H, Pavan WJ. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet* 2000; *107(1)*: 1-6.

Quaranta A, Piazza F. Menière's disease: diagnosis and new treatment perspectives. *Recenti Prog Med* 2000; *91(1)*: 33-7.

Sanchez Hanke, M; Kief, S; Leuwer, R; Koch, U; Moll, I; Brandner J M. In vitro Isolation and Cell Culture of Vestibular Inner Ear Melanocytes. *Audiol Neurotol* 2005; *10*: 191-200.

Steel KP, Barkway C. Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development*. 1989; *107(3)*: 453-63.

Sugita S, Takase H, Taguchi C, Imai Y, Kamoi K, Kawaguchi T, Sugamoto Y, Futagami Y, Itoh K, Mochizuki M. Ocular infiltrating CD4+ T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease recognize human melanocyte antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; *47(6)*: 2547-54.

Tachibana M, Kobayashi Y, Matsushima Y. Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. *Pigment Cell Res* 2003; *16(5)*: 448-54.

Takeuchi S, Ando M, Kakigi A. Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J* 2000; *79(5)*: 2572-82.

Takeuchi S, Ando M, Sato T, Kakigi A. Three-dimensional and ultrastructural relationships between intermediate cells and capillaries in the gerbil stria vascularis. *Hear Res* 2001; *155(1-2)*: 103-12.

Tasaki I, Spyropoulos CS. Stria vascularis is a source of endochlear potential. *J Neurophysiol* 1959; *22*: 149-155.

Wolff D. Melanin in the inner ear. *Arch Otolaryngol* 1931; *14*: 195-211.

Yoshihara T, Kaname H, Ishii T, Igarashi M. Effect of Gentamycin on Vestibular Dark Cells and Melanocytes: An Ultrastructural and Cytochemical Study. *ORL* 1994; *56*: 24-30.

Yoshihara T, Mita N, Satoh M, Kaname H, Morita M, Ishii T, Igarashi M. Effect of Gentamycin on the Melanosomes in the Stria Vascularis of the pigmented Guinea Pig: An Ultrastructural Study. *Acta Otolaryngol* 1997; 528: 25-29.

Yoshimoto Y. Clinical study of the role of melanocytes in the inner ear of patients with Harada's disease. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1996; 58(4): 233-7.

8 Anhang

Ergebnisse Trypanblau-Färbung:

Zellkultur-Nr.		Gentamycin-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Zellzahl gesamt	Zellzahl gefärbt	Zellzahl/ml	gefärbte Zellen/ml
1	Vestibulum	0	82	27	205000	67500
7	Vestibulum	0	93	30	232500	75000
13	Vestibulum	0	292	64	730000	160000
14	Vestibulum	0	197	41	492500	102500
15	Vestibulum	0	333	87	832500	217500
2	Vestibulum	10	144	61	360000	152500
8	Vestibulum	10	261	88	652500	220000
16	Vestibulum	10	323	139	807500	347500
17	Vestibulum	10	345	66	862500	165000
18	Vestibulum	10	64	17	160000	42500
3	Vestibulum	200	93	34	232500	85000
9	Vestibulum	200	126	47	315000	117500
19	Vestibulum	200	66	8	165000	20000
20	Vestibulum	200	221	24	552500	60000
21	Vestibulum	200	197	29	492500	72500

Tabelle 2.1: Auflistung der vestibulären Zellen nach Zellkultur und Gentamicinkonzentration mit bestimmter Gesamtzellzahl und Anzahl gefärbter Zellen.

Zellkultur-Nr.		Gentamycin-Konzentration (µg/ml)	Zellzahl gesamt	Zellzahl gefärbt	Zellzahl/ml	gefärbte Zellen/ml
4	Cochlea	0	155	43	387500	107500
10	Cochlea	0	235	32	587500	80000
22	Cochlea	0	110,0	12	275000	30000
23	Cochlea	0	96,0	7	240000	17500
24	Cochlea	0	93,0	11	232500	27500
5	Cochlea	10	272	48	680000	120000
11	Cochlea	10	281	73	702500	182500
25	Cochlea	10	104,0	6	260000	15000
26	Cochlea	10	129,0	6	322500	15000
27	Cochlea	10	121,0	9	302500	22500
6	Cochlea	200	88	20	220000	50000
12	Cochlea	200	261	75	652500	187500
28	Cochlea	200	74,0	8	185000	20000
29	Cochlea	200	155,0	16	387500	40000
30	Cochlea	200	67,0	9	167500	22500

Tabelle 2.2: Auflistung der cochleären Zellen nach Zellkultur und Gentamicinkonzentration mit bestimmter Gesamtzellzahl und Anzahl gefärbter Zellen.

Ergebnisse der Melanin-Bestimmung:

Zellkultur-Nr.		Gentamycin-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Extinktion	Melanin-Gehalt ($\mu\text{g/ml}$)
1	Vestibulum	0	0,110	13,99
7	Vestibulum	0	0,210	28,54
13	Vestibulum	0	0,070	8,17
14	Vestibulum	0	0,014	0,031
15	Vestibulum	0	0,014	0,031
2	Vestibulum	10	0,051	5,41
8	Vestibulum	10	0,142	18,65
16	Vestibulum	10	0,017	0,47
17	Vestibulum	10	0,025	1,17
18	Vestibulum	10	0,014	0,03
3	Vestibulum	200	0,026	1,78
9	Vestibulum	200	0,214	29,12
19	Vestibulum	200	0,026	1,78
20	Vestibulum	200	0,035	3,09
21	Vestibulum	200	0,017	0,47

Tabelle 3.1: Auflistung der vestibulären Zellen nach Zellkultur und Gentamicinkonzentration mit den gemessenen Extinktionen und daraus bestimmtem Melanin-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$.

Zellkultur-Nr.		Gentamycin-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Extinktion	Melanin-Gehalt ($\mu\text{g/ml}$)
4	Cochlea	0	0,156	20,68
10	Cochlea	0	0,175	23,45
22	Cochlea	0	0,075	8,9
23	Cochlea	0	0,216	26,41
24	Cochlea	0	0,084	10,21
5	Cochlea	10	0,236	32,32
11	Cochlea	10	0,190	25,63
25	Cochlea	10	0,238	32,61
26	Cochlea	10	0,234	32
27	Cochlea	10	0,260	35,8
6	Cochlea	200	0,239	32,75
12	Cochlea	200	0,212	28,83
28	Cochlea	200	0,024	1,49
29	Cochlea	200	0,090	11,08
30	Cochlea	200	0,170	22,7

Tabelle 3.2: Auflistung der cochleärer Zellen nach Zellkultur und Gentamicinkonzentration mit den gemessenen Extinktionen und daraus bestimmtem Melanin-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung bzw. Abbildungen
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
CK	Zytokeratin
Cx	Connexin
DAPI	4', 6-Diamidin-2',-phenylindol-dihydrochlorid
EDC	epithelial dark cells
EP	Endocochleäres Potential
FKS	Fetales Kälberserum
GM	Gentamycin
GP	guinea pig
HMGS	Human Melanocyte Growth Supplement
min.	Minuten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle

10 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. M. Sanchez-Hanke für die Überlassung des Themas, für die Vermittlung der Präparationsmethode der Innenohre und den fachlichen Beistand.

Für die Unterstützung im Zellbiologischen Labor möchte ich vor allem PD Dr. J. Brandner und Sabine Kief danken, welche mir bei Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin danke ich S. Franke und meiner Familie für die ausgiebige Unterstützung abseits des Labors.

Eidstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, das ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Fabian Ullmann