

**Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen**

set



Projekt

Entwicklung eines auf Stammzellen basierten Modells des Innenohres: *In-vitro*-Modell für die Prüfung von Medikamenten zur Behandlung von Innenohrerkrankungen

PD Dr. Hubert Löwenheim, Universität Tübingen

04/2011 – 09/2012



3R reduce
refine
replace

Mainzer Landstraße 55
60329 Frankfurt/Main
Telefon 069-2556-1226
www.stiftung-set.de
info@stiftung-set.de

www.stiftung-set.de

Entwicklung eines auf Stammzellen basierten Modells des Innenohres: *In-vitro*-Modell für die Prüfung von Medikamenten zur Behandlung von Innenohrerkrankungen

Innenohrschwerhörigkeit ist die häufigste Sinneserkrankung und die dritthäufigste chronische Erkrankung der Menschheit. In Deutschland sind 12 Millionen Menschen betroffen. Die sozialen und ökonomischen Notwendigkeiten zur Entwicklung rationaler Therapien von Schwerhörigkeit sind unmittelbar evident. Trotzdem konnten bisher keine Medikamente zur Behandlung der sensorischen Schwerhörigkeit entwickelt werden. Die heutigen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich auf die prothetische Versorgung mit Hörgeräten. Diese Versorgung erreicht jedoch nur einen Teil der Betroffenen und ist im Ergebnis häufig unbefriedigend. Rationale, auf pharmakologischen Wirkstoffen basierende Therapien, die auf die zugrunde liegenden biologischen Ursachen abzielen, gibt es nicht. Diesem erheblichen Forschungsbedarf zur Wirkstoffentwicklung steht ein ebenso erheblicher Mangel an validierten Ersatzmethoden für Tierversuche gegenüber. Die wenigen Ansätze zur Wirkstoffentwicklung finden daher leider bereits auf der Ebene des Screenings und meist nur im Rahmen von Tierversuchen statt.

Die Gründe hierfür liegen in Lage und Bau des Innenohres selbst begründet. Das Innenohr liegt im Knochen des Felsenbeins und ist anatomisch sehr schwer zugänglich. Die Architektur des Sinnesorgans ist komplex und experimentell nur schwer zu handhaben. Darüber hinaus stehen die Zellen des Innenohres in einer nur sehr geringen Anzahl zur Verfügung. Insgesamt ist Forschung am Innenohr also technisch deutlich erschwert. Seit einigen Jahren ist jedoch bekannt, dass aus dem Innenohr Stammzellen isoliert werden können. Diese Stammzellen werden als otische Stammzellen bezeichnet, können *in vitro* vermehrt und zu bestimmten Zelltypen des Innenohres differenziert werden. Hieraus ergibt sich ein Lösungsansatz, der mit Fortschritten im Sinne des 3R Prinzips einhergeht.

Positive & negative Selektion otischer Stammzellen durch **Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)**

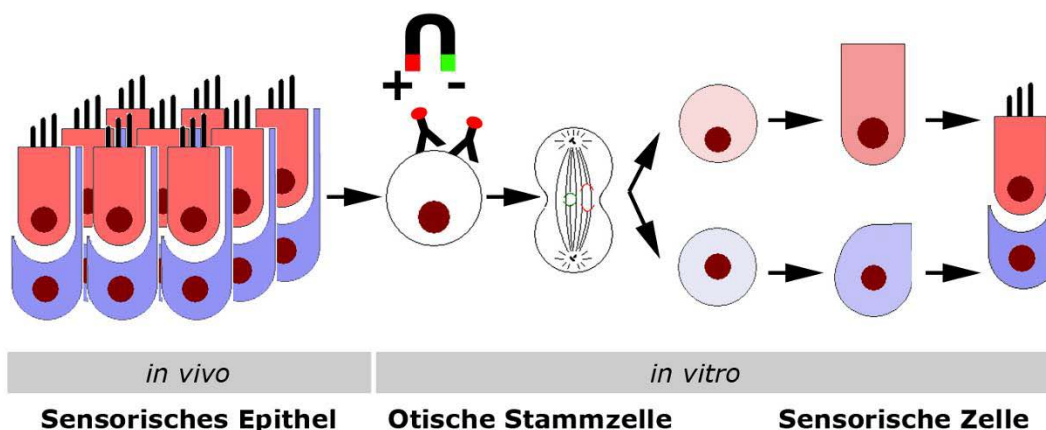


Abb.1: Im beantragten Projekt sollen verschiedene Oberflächen exprimierte Epitope dazu genutzt werden, die Stammzellen im sensorisch-auditorischen Epithel der Maus – dem Corti'schen Organ – durch Antikörper zu identifizieren und zu markieren. Mit Hilfe einer magnetisch aktivierten Zellsortierung werden die Stammzellen daraufhin isoliert, propagiert und abschließend wieder differenziert.

Das Forschungsvorhaben zielt darauf ab, ein auf otischen Stammzellen des Innenohres basierendes *In-vitro*-Modell zu entwickeln und zu standardisieren. Dieses *In-vitro*-Modell wird als „Mini-Ohr“ bezeichnet. In diesem Projekt soll eine systematische Suche nach Zelloberflächen-Markern durchgeführt werden, die es ermöglichen sollen, otische Stammzellen anzureichern und anschließend zu Innenohrzellen zu differenzieren (Abb. 1). Hierzu soll das Verfahren der magnetisch aktivierten Zellsortierung verwendet werden (engl. MACS, Magnetic Activated Cell Sorting). Als Parameter wird zum einen die Kapazität zur Bildung von Stammzellsphären (Abb. 2A) untersucht. Zum anderen soll das Differenzierungspotential der sortierten Zellen vergleichend analysiert werden (Abb. 2B-D).

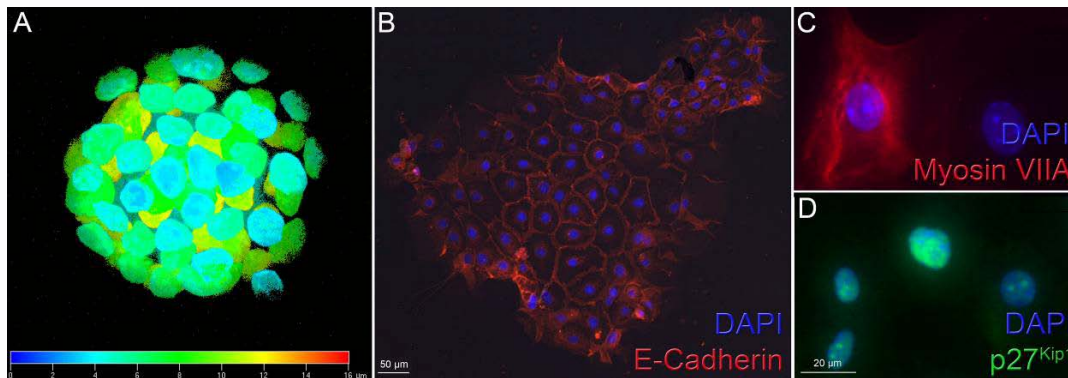


Abb. 2: Die aus dem Corti´schen Organ isolierten Stammzellen bilden Sphären (A) und lassen sich in E-Cadherin-positiven epithelialen Inseln (B) zu so genannten „Mini-Ohren“ differenzieren. Diese enthalten Myosin-VIIa-positive (C) haarzell- und p27Kip1-positive (D) stützcellartige Zellen.

In Bezug auf das 3R-Konzept ergeben sich durch die im Projekt durchzuführende Entwicklung des Verfahrens folgende Verbesserungen: (1) Replacement: Wegfall von Tierversuchen, um die Wirksamkeit eines Medikaments im Screening nachzuweisen. (2) Reduction: Reduktion des Tierversuchs durch eine effizientere Nutzung der isolierten Zellen für die Stammzellkultur. (3) Refinement: Durch die Ermittlung pharmakologischer Daten *in vitro* lassen sich Überdosierungen und damit unerwünschte Nebenwirkungen im Tierversuch vermeiden. Darüber hinaus können die Versuchsbedingungen *in vitro* im Vergleich zur *In-vivo*-Situation gezielter kontrolliert werden und kommen dennoch den *In-vivo*-Bedingungen sehr nahe. Das Verfahren soll einen Beitrag zur Entwicklung von Methoden leisten, die eine Wirkstoffentwicklung für die Innenohrschwerhörigkeit nach dem 3R-Konzept erlauben.

Projektleiter



PD Dr. Hubert Löwenheim

Jahrgang 1964. Studium Humanmedizin an der Goethe Universität Frankfurt am Main. Ab 1992 Arbeitsgruppenleiter am Hörforschungszentrum der Universitätsklinik Tübingen. Habilitation 2006 in Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen. Seit 2009 dort Stellvertretender Ärztlicher Direktor. Forschungsschwerpunkt ist die Regenerative Medizin.

Mitarbeiter



Dr. Jörg Waldhaus

Jahrgang 1977. Studium Biologie TH Darmstadt 1998-2005. Doktorand im Labor für Regenerative Medizin am Hörforschungszentrum der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik in Tübingen. Promotion 2010 zum Thema „Regenerationsbiologische Untersuchungen am Innenohr der Maus“. Seit Januar 2011 wissenschaftlicher Mitarbeiter.



Corinna Gleiser

Jahrgang 1978. Studium Agrar-Biologie an der Universität Stuttgart-Hohenheim 2000-2005. Seit 2006 Doktorandin am Anatomischen Institut der Universität Tübingen und dem Hörforschungszentrum der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik. Dissertations-Thema: Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von Aquaporinen im Innenohr.

Ausführende Institution

Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Hörforschungszentrum an der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik
Elfriede-Aulhorn-Straße 5
72076 Tübingen

Förderungslaufzeit

01.04.2011 - 30.09.2012