

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/36534> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Locher, Heiko

Title: Cellular development of the human cochlea and the regenerative potential of hair follicle bulge stem cells

Issue Date: 2015-12-08

A

APPENDIX

SUMMARY
SAMENVATTING
ABBREVIATIONS
LIST OF PUBLICATIONS
ABOUT THE AUTHOR

SUMMARY

The embryonic development of the human cochlea (the organ of hearing) has been investigated for over one hundred years. Still, little is known about the development on a cellular and protein level, which is important to better understand etiologies and pathologies of various types of sensorineural hearing loss. Knowledge of the normal gene expression patterns and cell fate specification in the human cochlea therefore aids the development of gene and cell-based therapeutic strategies.

For this reason, we acquired a series of human fetal cochlea of different stages of gestation and investigated several aspects of the normal development of the human cochlea in **Chapters 2-4**.

Chapter 2 investigated the development of the hair cells and the spiral ganglion neurons. Cochlear hair cells develop out of an undifferentiated epithelium. We showed that, at the 10th week of gestation (W10), all epithelial cells expressed both SOX9 and SOX10 with the addition of SOX2 expression in the prosensory domain. We found the first developing hair cell at W12, coinciding with downregulation of SOX9 and SOX10 in this cell, to be followed later by downregulation of SOX2. Markedly, outgrowing neurites from spiral ganglion neurons were found penetrating into the cochlear duct epithelium prior to the first hair cell differentiation. These neurites directly targeted the hair cells as they developed. Investigating Peripherin expression (in the mature cochlea only expressed in the type-II spiral ganglion neurons), showed that all spiral ganglion neurons expressed this protein in early stages, and that expression gradually diminished and became restricted to the type-II spiral ganglion neurons by 18 weeks. At 20 weeks, the expression profiles in hair cells and spiral ganglion neurons matched the expression patterns of the adult mammalian cochlea.

Chapter 3 investigated a third cochlear cell type, the peripheral glial cell. The adult human cochlea contains three different types of peripheral glial cells: myelinating and unmyelinating Schwann cells and satellite glial cells. In this chapter, we focused on the developmental distribution of the peripheral glial cells and on the onset of myelination of spiral ganglion neurons, one of the prerequisites of normal hearing. We observed glial cells at our earliest investigated stage (W9) in all three neuronal domains: both near central and peripheral processes and at the location of the SGN cell bodies. Glial cells associated themselves with SGN cell bodies from W12 onwards and these satellite glial cells populated the spiral ganglion in a spatiotemporal gradient. In the cochlear nerve, radial sorting and myelination was observed at W22, prior to myelination of the peripheral processes. We proposed

that the three types of glial cells in the human adult cochlea are all derived from the precursor cells observed at W9, and that the observed developmental patterns support a neural crest origin of these cells in the human.

Chapter 4 investigated the development of the stria vascularis and cochlear potassium regulation, including its relation to syndromic and nonsyndromic sensorineural hearing loss. At W12, melanocytes were found migrating into the cochlea and penetrating the basement membrane of the lateral wall epithelium, forming the intermediate cellular layer of the stria vascularis. In the following weeks, these melanocytes tightly integrated with the developing marginal cells, the epithelial cellular layer. We showed the expression of several melanocytic proteins (MITF, SOX10, KIT), potassium regulating proteins (Na^+/K^+ -ATPase, KCNQ1, KCNJ10), and gap junction proteins (GJB2, GJB6, GJA1, GJE1) in this developing structure. All these proteins are known to be involved in different types of hereditary sensorineural hearing loss except GJE1, which could therefore be a potential new associated locus for this disease. Based on the data from Chapters 2-4 and literature on development of hearing in animals we propose that hearing in the human commences between W26 and W28, later than previously suggested.

Chapters 5-7 are related to the neural crest stem cells residing in the hair follicle bulge. These cells, first discovered a decade ago, are of strong interest to stem cell researchers as they could serve as a pool of easy accessible stem cells capable of differentiating into multiple cellular lineages (amongst which are neurons and glial cells). Potentially, they could be used to regenerate various cochlear tissues. However, in Chapter 5 and Chapter 6 we showed that a protein (TUBB3) often used in immunohistochemistry to detect a neuron is also expressed both in skin and hair follicle melanocytes in humans. This could indicate that cells from the melanocytic lineage mistakenly were identified as neural crest stem cells. This insight was used in Chapter 7, where we cultured mouse hair follicle bulge explants to investigate expression of TUBB3. Strikingly, cultured cells expressing this protein were not of the neural lineage but rather from the melanoglia lineage. Together, this showed that the proposed neural crest stem cell residing in the hair follicle bulge might need revision. However, as both melanocytes and peripheral glial cells are present and have important functions in the cochlea, hair follicle bulge cells remain a suitable candidate when investigating the regeneration of these tissues.

1
2
3
4
5
6
7
8
A

SAMENVATTING

Al meer dan honderd jaar wordt er onderzoek gedaan naar de embryonale ontwikkeling van de humane cochlea (het gehoororgaan). Er is echter nog steeds weinig bekend over deze ontwikkeling op een cellulair of gen/eiwit-niveau. Deze kennis is van groot belang om de etiologie en pathologie van verschillende typen van sensorineuraal gehoorverlies beter te kunnen begrijpen. Kennis over het normale patroon van genexpressie en celdifferentiatie in de humane cochlea draagt bij aan de ontwikkeling van genetische en op (stam)cel gebaseerde therapieën.

In een serie van humane foetale cochlea's van verschillende stadia van ontwikkeling hebben wij een aantal aspecten van de normale ontwikkeling onderzocht in **Hoofdstukken 2-4**.

Hoofdstuk 2 onderzocht de ontwikkeling van de haarcellen en de spiraal ganglion neuron (SGN). Cochleaire haarcellen ontwikkelen zich vanuit een ongedifferentieerd epitheel. We toonden aan dat in de 10e week van de zwangerschap (W10) alle epitheliale cellen zowel SOX9 en SOX10 tot expressie brengen met daarnaast ook SOX2 expressie in het 'prosensory domain'. De eerste haarcel zagen we zich ontwikkelen in W12, waarbij dit samenging met downregulatie van SOX9 en SOX10 in deze cel, enige weken later gevolgd door downregulatie van SOX2. Opvallend genoeg vonden we ingroei in het cochleaire epitheel door de neuriten van de SGN voorafgaand aan de ontwikkeling van de eerste haarcel. Deze neuriten richtten zich gelijk naar de haarcel zodra deze zich ontwikkelde. Het onderzoeken van Peripherin expressie (wat zich in de volwassen cochlea alleen in de type-II SGN bevindt) toonde aan dat eiwit door alle SGN tot expressie wordt gebracht in de vroege embryonale fasen maar dat deze expressie geleidelijk verminderde en selectief werd voor type-II SGN in W18. Het expressieprofiel in de haarcellen en de SGN kwam in W20 overeen met het bekende patroon van de volgroeide cochlea bij zoogdieren.

Hoofdstuk 3 onderzocht een derde cel type in de cochlea, de 'peripheral glial cell'. De volwassen humane cochlea bevat weer drie verschillende typen van deze cel: gemyeliniseerde en ongemyeliniseerde Schwann cellen en 'satellite glial cells'. In dit hoofdstuk richtten we ons op de verspreiding en differentiatie van deze cellen tijdens de ontwikkeling in de cochlea, en op het ontstaan van myeline rondom de spiraal ganglion neuron: een van de vereisten voor een normale functie van het gehoor. We zagen al gliale cellen in de jongste fase die we onderzochten (W9) in alle drie de neuronale domeinen: zowel rond de centrale en perifere uitlopers als bij de cellichamen van de SGN. Vanaf W12 gingen deze cellen een nauwe relatie

aan met de cellichamen van de SGN en werd het spiraal ganglion middels een spatiotemporele gradient bevolkt. In de nervus cochlearis ontdekte we ‘radial sorting’ en myelinisatie in W22, voorafgaand aan myelinisatie van de perifere SGN uitlopers. Vanwege deze bevindingen achten we het zeer waarschijnlijk dat deze drie type gliale cellen in de humane cochlea allen afkomstig zijn van de voorlopercel die we zagen in W9, en dat deze observaties ook passen bij een neurale lijst oorsprong van deze cellen in de mens.

Hoofdstuk 4 onderzocht de ontwikkeling van de stria vascularis en de cochleaire kaliumhuishouding, met een verdieping in syndromale en niet-syndromale typen van sensorineuraal gehoorverlies. In W12 zagen we dat melanocyten migreerden in de cochlea en dat ze penetreerden door het basaalmembraan van het epitheel in de laterale wand, hierdoor zo de intermediare cellulaire laag van de stria vascularis vormend. In de hieropvolgende weken integreerde deze melanocyten zich sterk met de zich ontwikkelende marginale cellen. Hiernaast toonden we het expressieprofiel aan van verschillende melanocyttaire eiwitten (MITF, SOX10, KIT), kalium regulerende eiwitten (Na^+/K^+ -ATPase, KCNQ1, KCNJ10) en gap junction eiwitten (GJB2, GJB6, GJA1, GJE1). Van al deze eiwitten is het bekend dat ze betrokken zijn in verschillende vormen van erfelijke sensorineurale gehoorverliezen behoudens GJE1, wat wellicht mogelijk een nieuw geassocieerde locus voor deze aandoening zou kunnen blijken.

Gebaseerd op alle data van Hoofdstukken 2-4 en kennis over de ontwikkeling van het gehoor bij knaagdieren vangt het menselijk gehoor waarschijnlijk pas aan tussen W26 en W28, later dan vooralsnog frequent wordt aangenomen.

Hoofdstukken 5-7 hebben betrekking op de neurale lijst stamcellen die zich bevinden in de haarfollikel bulge regio. Deze cellen, ruim tien jaar geleden ontdekt, zijn zeer interessant voor stamcelonderzoek omdat ze mogelijk kunnen dienen als een zeer toegankelijk bron van stamcellen die zich nog kunnen differentiëren in verschillende nuttige celtypen (waaronder neuronen en gliale cellen). Potentieel zouden deze cellen dan ook kunnen worden ingezet voor het herstel van verschillende cochleaire weefsels. Echter, in Hoofdstuk 5 en Hoofdstuk 6 lieten we zien dat veelgebruikt eiwit (TUBB3) om neuronen mee aan te tonen middels immunohistochemie ook in expressie komt in melanocyten in de huid of haar bij de mens. Dit heeft als gevolg dat melanocyten wellicht vaker ten onrechte zijn geïdentificeerd als neurale lijst stamcellen. Dit inzicht hebben we vervolgens gebruik in Hoofdstuk 7 om de expressie van TUBB3 te onderzoeken in kweken van de haarfollikel bulge uit de muis. Opvallend genoeg liet dit inderdaad zien dat de gekweekte cellen die TUBB3

tot expressie brachten niet van neurale maar juist van melanogliale oorsprong zijn. Tezamen betekent dit dat het zich bevinden van een neurale lijst stamcel in de haarfollikel heroverwogen zal moeten worden. Echter, omdat zowel melanocyten als gliale cellen wel afzonderlijk voorkomen in de haarfollikel en deze celtypen belangrijke functies hebben in de cochlea blijft de haarfollikel een interessante kandidaat ten aanzien van onderzoek naar weefselherstel.

ABBREVIATIONS

CD	cochlear duct
CN	cochlear nerve
IHC	inner hair cell
KO	Kölliker's organ
NCSC	neural crest stem cell
OC	organ of Corti
OHC	outer hair cell
PGCs	peripheral glial cells
PPs	peripheral processes
SG	spiral ganglion
SGN	spiral ganglion neuron
SNHL	sensorineural hearing loss
ST	scala tympani
SV	scala vestibuli
W#	weeks of gestation
<i>PROTEINS</i>	
aceTUBA	acetylated tubulin
ATP1A1	sodium/potassium-transporting ATPase
COL4	collagen type IV
DCT	dopachrome tautomerase
FN	fibronectin
GJA1	gap junction protein, alpha 1 (connexin 43)
GJB2	gap junction protein, beta 2 (connexin 26)
GJB6	gap junction protein, beta 6 (connexin 30)
GJE1	gap junction protein, epsilon 1 (connexin 23)
KCNJ10	inwardly-rectifying potassium channel subfamily J, member 10
KCNQ10	potassium channel, voltage-gated KQT-like subfamily Q, member 1
LAM	laminin
MBP	myelin basic protein
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MYO7A	myosin VIIa
NGFR	nerve growth factor receptor (p75 ^{NTR})
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PRPH	peripherin
S100B	s100 calcium binding protein B
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (also known as GLUT)
SOX	sry-related HMG box
TUBB3	class III β -Tubulin
TYRP1	tyrosine-related protein 1
TYRP2	tyrosine-related protein 2

LIST OF PUBLICATIONS

1. Rodríguez-Contreras A, van Hoeve JSS, Habets RLP, Locher H, Borst JGG: **Dynamic development of the calyx of Held synapse.** Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105:5603 – 8.
2. Bruijn J, Duivenvoorden H, Passchier J, Locher H, Dijkstra N, Arts W-F: **Medium-dose riboflavin as a prophylactic agent in children with migraine: a preliminary placebo-controlled, randomised, double-blind, cross-over trial.** Cephalalgia 2010, 30:1426 – 34.
3. Bruijn J, Locher H, Passchier J, Dijkstra N, Arts W-F: **Psychopathology in children and adolescents with migraine in clinical studies: a systematic review.** Pediatrics 2010, 126:323 – 32.
4. Locher H, de Rooij KE, de Groot JCMJ, Doorn R Van, Gruis NA, Löwik CWGM, Chuva de Sousa Lopes SM, Frijns JHM, Huisman MA: **Class III β -tubulin, a novel biomarker in the human melanocyte lineage.** Differentiation 2013, 85:173 – 181.
5. Locher H, Frijns JHM, van Iperen L, de Groot JCMJ, Huisman MA, Chuva de Sousa Lopes SM: **Neurosensory development and cell fate determination in the human cochlea.** Neural Dev 2013, 8:20.
6. Locher H, de Groot JCMJ, van Iperen L, Huisman MA, Frijns JHM, Chuva de Sousa Lopes SM: **Distribution and development of peripheral glial cells in the human fetal cochlea.** PLoS One 2014, 9:e88066.
7. Locher H, Frijns JHM, Huisman MA, Chuva de Sousa Lopes SM: **TUBB3: Neuronal Marker or Melanocyte Mimic?** Cell Transplant 2014, 23:1471 – 3.
8. Locher H, Saadah N, de Groot S, de Groot JCMJ, Frijns JHM, Huisman MA.: **Hair follicle bulge cultures yield class III β -tubulin-positive melanoglial cells.** Histochem Cell Biol 2015:87 – 91.
9. Locher H, de Groot JCMJ, van Iperen L, Huisman MA., Frijns JHM, Chuva de Sousa Lopes SM: **Development of the stria vascularis and potassium regulation in the human fetal cochlea: Insights into hereditary sensorineural hearing loss.** Dev Neurobiol 2015, 75:1219-40.

ABOUT THE AUTHOR

Heiko Locher was born on September 1, 1982 in Amsterdam, the Netherlands. He studied medicine at the Erasmus University of Rotterdam with a focus on otorhinolaryngology during his rotations (*oudste co-schap*), and worked on a clinical trial for pediatric migraine with dr. J.K.J. Bruijn. He obtained his medical degree in 2010.

In addition he finished a two-year research master's program in Neuroscience in 2008 at the Erasmus University under supervision of prof.dr. J.G.G. Borst as well as the Exchange Honours Master of Neurosciences from the Free University of Amsterdam and the Erasmus University. During these years he worked on second-harmonic generation imaging of bulk-endocytosis in the calyx of Held and calcium imaging in the calyx of Held collaterals.

He started working as a PhD candidate in 2010 at the Leiden University Medical Center with prof.dr.ir. J.H.M Frijns as promotor. This research was performed both at the department of Otorhinolaryngology with dr. M.A. Huisman and at the department of Anatomy & Embryology with dr. S.M. Chuva de Sousa Lopes.

In 2014 he started his clinical residency in otorhinolaryngology at the LUMC under supervision of prof.dr.ir J.H.M Frijns and dr. A.G.L. van der Mey.

1
2
3
4
5
6
7
8



