

# Identifizierung und Charakterisierung von Bmi1 positiven Zellen in der Maus-Cochlea

M. Bassiouni<sup>1</sup>, M. Müller<sup>2</sup>, H. Löwenheim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Elfriede-Aulhorn-Str. 5, 72076 Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Steinweg 13-17, 26122 Oldenburg

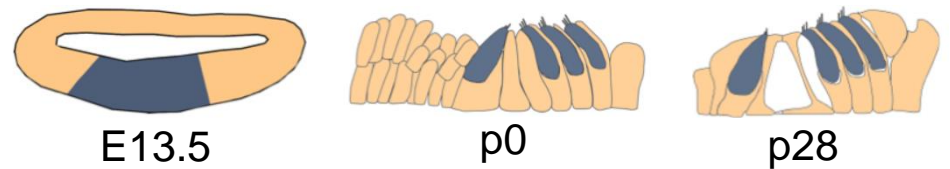


## Einleitung

Das Onkogen Bmi1 ist für das Selbsterneuerungspotential adulter Stammzellen im zentralen und peripheren Nervensystem essentiell<sup>1</sup>. In der Retina wird Bmi1 während der Entwicklung exprimiert<sup>2</sup>. Bmi1 Expression konnte ebenfalls in Otosphären, die aus dem postnatalen Corti'schen Organ der Maus gewonnen wurden, beobachtet werden<sup>3</sup>. Bmi1 könnte auch eine Rolle bei der Regulierung der Selbsterneuerung otischer Stammzellen spielen.

## Material/Methoden

### Bmi1-Expression



#### Immunohistochemie:

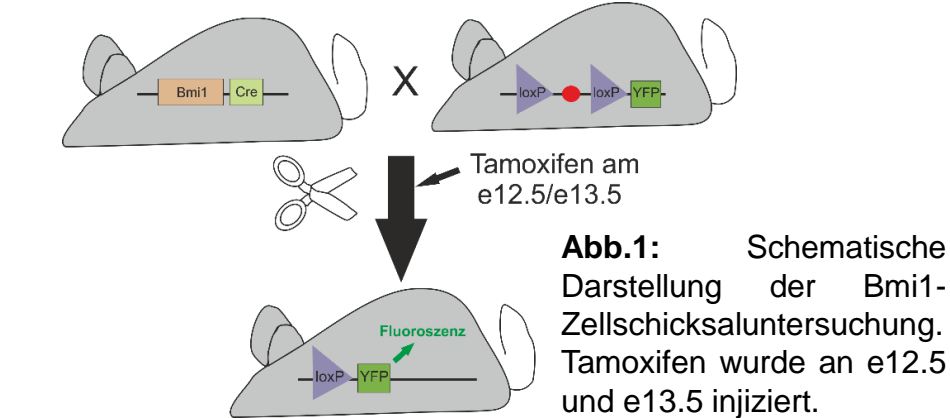
Es wurden die folgenden Antikörper verwendet: Mouse anti-Bmi1 (Abcam), Goat anti-Sox2 (Santa Cruz), Rabbit anti-Myosin7a (Proteus), Mouse anti-Myosin7a (DSHB), Rabbit anti-GFP (Invitrogen).

#### Bmi1-GFP-Reporter:

Es wurde eine Bmi1-GFP-Reporter Mauslinie verwendet. Bei dieser Mauslinie ist das Bmi1-Exon 2 durch GFP ersetzt. Dies führt zu einem Bmi1-Null-Allel<sup>4</sup>.

## Bmi1- Zellschicksaluntersuchung

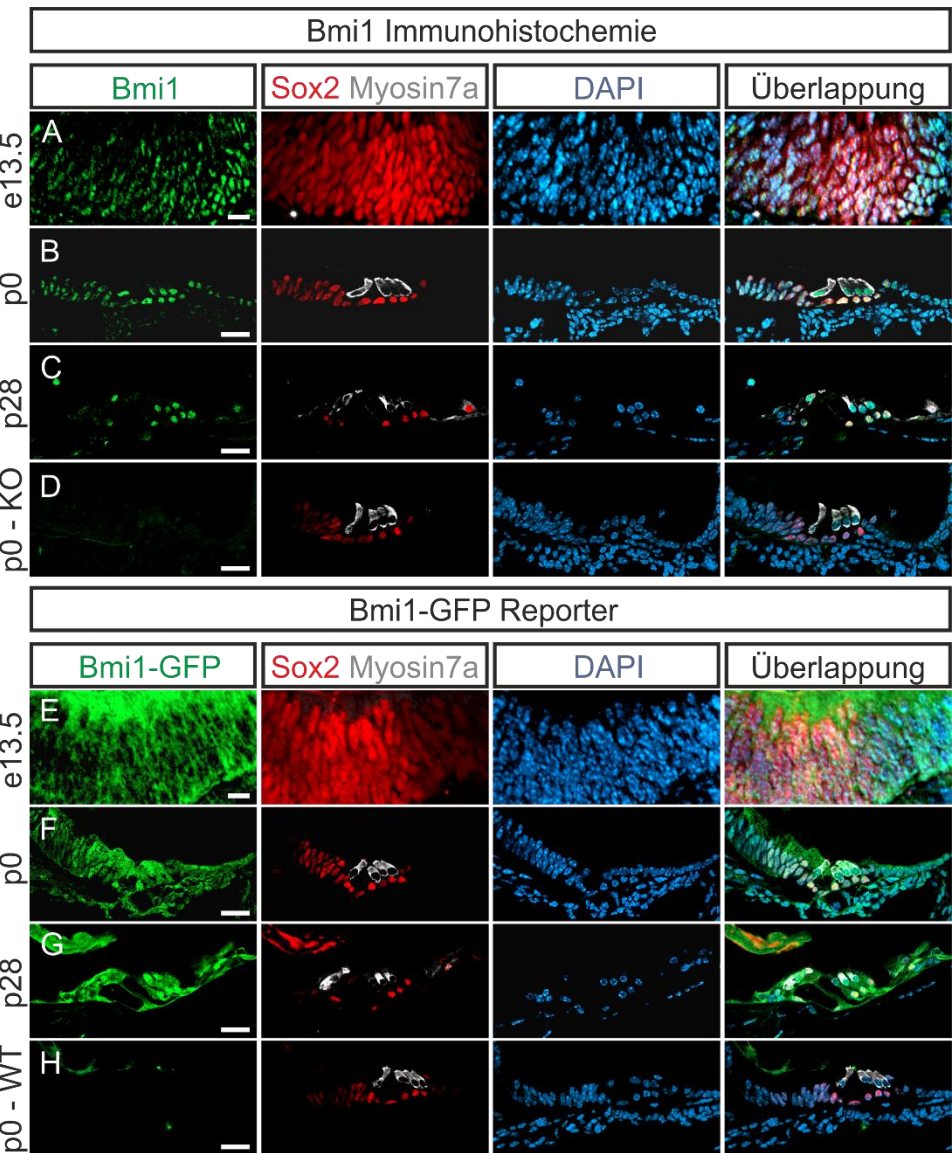
Cre-Linie: Bmi1CreER Lox-Linie: ROSA26<sup>eYFP</sup>



**Abb.1:** Schematische Darstellung der Bmi1-Zellschicksaluntersuchung. Tamoxifen wurde an e12.5 und e13.5 injiziert.

## Ergebnisse

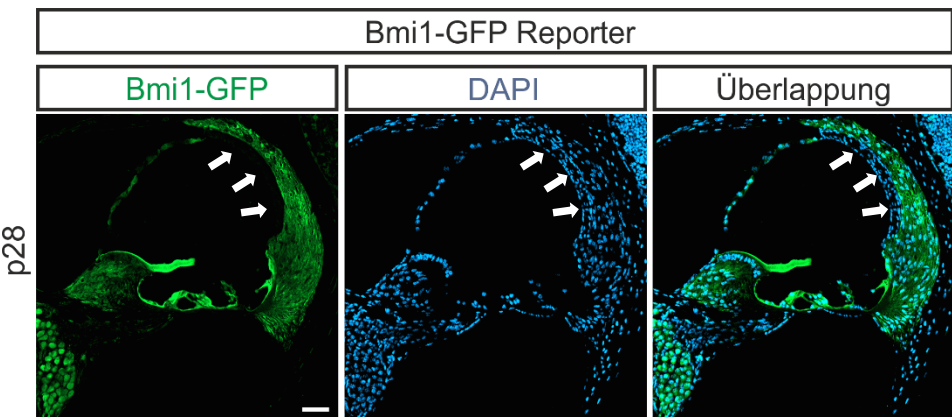
### Bmi1-Expression im Corti'schen Organ



**Abb. 2:** Die Bmi1-Expression wurde im Corti'schen Organ bei drei Entwicklungsstadien untersucht: e13.5 (A, E), p0 (B, F) und p28 (C, G). Immunohistochemische Färbungen wurden an Gefrierschnitten mit einem anti-Bmi1 Antikörper an Wildtyp Mäusen (Bmi1-WT/WT, A-C), sowie mit einem anti-GFP Antikörper an Bmi1-GFP Reporter Mäusen (Bmi1-GFP/WT, E-G) durchgeführt. (D) Cochleae homozygoter Bmi1-GFP (Bmi1-GFP/GFP, hier als KO gekennzeichnet) Mäuse dienen als Negativkontrolle für Bmi1-Immunohistochemie. (H) Cochlea von Wildtyp (Bmi1-WT/WT, als WT gekennzeichnet) Mäuse wurden als Negativkontrolle für die Bmi1-GFP Reporterlinie verwendet. Alle Schnitte wurden zusätzlich mit Sox2 (rot), Myosin7a (grau) und DAPI (blau) gefärbt. Maßstab: 20 µm. (A, E) Bmi1 und Sox2 sind in der prosensorischen Cochlea bei E13.5 exprimiert. Myosin7a wurde nicht detektiert, die Haarzellen in diesem frühen Stadium noch nicht ausdifferenziert. (B, F) Bmi1 wird im differenzierten Corti'schen Organ an p0 exprimiert. Sowohl Haar- als auch Stützzellen sind markiert. (C, G) Bmi1 Protein ist im funktionell reifen Corti'schen Organ an p28 ebenfalls in den Haar- und Stützzellen vorhanden.

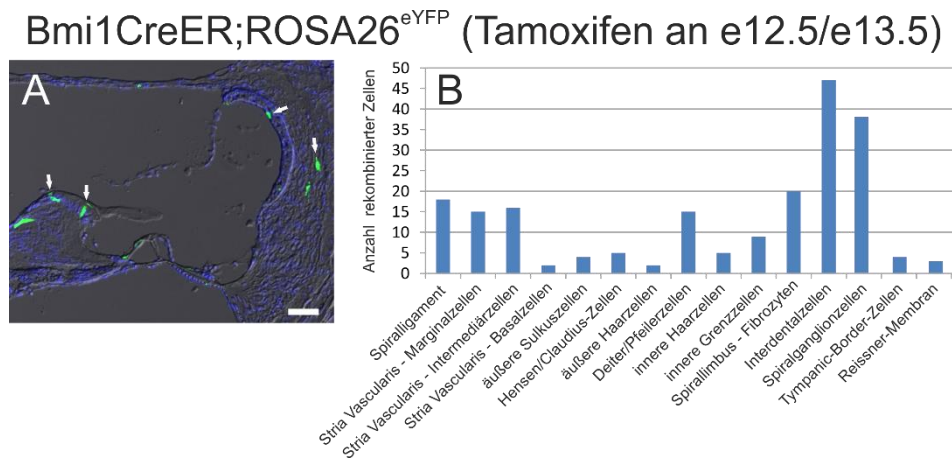
## Ergebnisse

### Bmi1-Expression in der funktionell reifen Cochlea



**Abb. 3:** Bmi1-GFP Expression blieb in der funktionell reifen Cochlea an p28 bestehen, wohingegen Bmi1-GFP in der Stria vascularis herunterreguliert war (weiße Pfeile). Maßstab: 50 µm.

## Bmi1- Zellschicksaluntersuchung



**Abb. 4:** Bmi1-Zellschicksaluntersuchung

Männliche Bmi1CreER Mäuse wurden mit weiblichen ROSA26<sup>eYFP</sup> Mäusen gekreuzt. An den Tagen e12.5 und e13.5 wurde den schwangeren Weibchen Tamoxifen intraperitoneal injiziert, um eine Rekombination in doppelt transgenen Bmi1CreER;ROSA26<sup>eYFP</sup> Mäusen zu induzieren.

(A) Gefrierschnitt einer Cochlea (p21) einer Bmi1CreER; ROSA26eYFP Maus. Die weißen Pfeile zeigen auf die grün fluoreszierenden eYFP positiven Zellen in unterschiedlichen Regionen der Cochlea. DAPI markiert die Zellkerne blau. Maßstab: 50 µm.

(B) Anzahl rekombinierter Zellen in 4 aufeinanderfolgenden mid-modiolaren Gefrierschnitten der Cochlea einer Bmi1CreER; ROSA26eYFP Maus. Eine Rekombination ist am häufigsten in den Interdentalzellen des Limbus spiralis zu erkennen. Dies könnte auf eine stärkere Bmi1-Protein Expression in deren Vorläuferzellen zum Zeitpunkt der Tamoxifeninduktion hindeuten.

## Zusammenfassung

- Bmi1-Expression findet sich während der embryonalen und postnatalen Entwicklung im sensorischen Epithel.
- Bmi1-Expression bleibt in der funktionell reifen Cochlea am postnatalen Tag (p) 28 bestehen.
- Bmi1-Expression findet sich nicht in der Stria vascularis.
- Cre-vermittelte Rekombination konnte in allen differenzierten Zelltypen der funktionell reifen Cochlea an p21 nachgewiesen werden.

## Schlussfolgerungen

- Bmi1 ist ubiquitär in der Cochlea exprimiert.
- Bmi1-positive Vorläuferzellen haben die Fähigkeit, zu verschiedenen Innenohr-Zelltypen *in vivo* zu differenzieren.
- Die funktionelle Bedeutung von Bmi1 ist unklar. Eine mögliche Bedeutung für Stammzellregulation analog zu neuronalen Stammzellen muss geprüft werden.

## Literatur

[1] Park I, Morrison SJ, Clarke MF. "Bmi1, stem cells, and senescence regulation". J Clin Invest. 2004;113(2):175–179.  
[2] Chatoo W, Abdouh M, Duparc RH, Bernier G. Bmi1 distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development. Stem Cells. 2010;28:1412-1423.  
[3] Waldhaus J, Cimerman J, Gohlke H, et al. Stemness of the organ of Corti relates to the epigenetic status of sox2 enhancers. PloSOne. 2012. 7(5):e36066.  
[4] Hosen N, Yamane T, Manja Muijtjens, et al. Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of Bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. Stem Cells. 2007;25:1635–1644.