

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

Direktor: Prof. Dr. med. H. Scherer

Die Rolle von Hypoxie und Ischämie bei der Entstehung von Hörstörungen

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. med. Birgit Mazurek
geboren am 25.04.1970 in Schwerin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 26.01.2006
Tag der Habilitation: 22.01.2007

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Lenarz
2. Prof. Dr. A.W. Gummer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Hörstörungen	5
1.2. Rolle der Haarzelle bei der Entstehung von Hörstörungen	6
1.2.1. Störungen der Stereozilien und Tip-Links	7
1.2.2. Störung der Kalium-Kanäle.....	8
1.2.3. Veränderung der Glutamat-Ausschüttung	9
1.2.4. Tinnitus.....	10
1.3. Hypoxie und Ischämie	12
1.3.1. Die Rolle von HIF-1	12
1.3.2. Die Wirkung von Hypoxie und Ischämie in der Cochlea.....	15
1.3.3. HIF-1-abhängige Gene	19
1.4. Apoptose und Nekrose	20
1.5. Prestin	22
1.6. Microarray	25
1.7. Problemstellung	27
2. Methoden	30
2.1. Zellkultur	30
2.2. Hypoxie und Ischämie	31
2.3. Apoptose und Nekrose	32
2.4. Isolation und Quantifizierung von Gesamt-RNA	33
2.5. Quantifizierung der mRNA	35
2.6. Microarray-Untersuchung	36
2.6.1. Versuchsaufbau	36
2.6.2. RNA-Präparation für die Microarray-Untersuchungen.....	38
2.6.3. Microarray-Untersuchung	38
2.6.4. Statistik der Microarray-Untersuchungen	40
2.7. mRNA von HIF-1 alpha und Prestin	41
2.8. HIF-1-Aktivität	42
2.9. Statistik	43
3. Ergebnisse	45
3.1. Die organotypische Kultur der Cochlea	45
3.2. Vulnerabilität der Haarzellen gegenüber Hypoxie und Ischämie in der organotypischen Kultur	45
3.3. Einflussfaktoren auf den Haarzellverlust	49
3.3.1. Einfluss der Kalium-Konzentration auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen in der organotypischen Kultur	49
3.3.2. Einfluss der Kalzium-Konzentration auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen in der organotypischen Kultur	52
3.3.3. Wirkung von Magnesium auf die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen.....	55
3.3.4. Wirkung von MK 801 auf die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen	56
3.4. Art des Zelltodes unter Ischämie	58
3.4.1. Apoptose und Nekrose der Haarzellen	58
3.4.2. Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Zelltod.....	61
3.5. HIF-1-Aktivität in der Cochlea	64
3.5.1. HIF-1-Aktivität in der organotypischen Kultur.....	65
3.5.2. HIF-1-Aktivierung unter Hypoxie und Ischämie in Einzelzellkultur.....	66
3.5.3. HIF-1 alpha Protein in der Einzelzellkultur	69
3.6. Genexpression in der Cochlea (mRNA)	72
3.6.1. Statistische Betrachtungen zu den angewandten Microarray-Untersuchungen ..	72

3.6.2. Charakterisierung der Genexpression in der frisch präparierten Cochlea (S1) ..	78
3.6.2.1. Analyse der Gene mit einer hohen Expression im Organ Corti im Vergleich zu Modiolus und Stria vascularis	80
3.6.2.2. Analyse der Gene mit einer mehr als zweimal so hohen Expression im Organ Corti gegenüber Modiolus und Stria vascularis	83
3.6.2.3. Analyse der nur im Organ Corti vorkommenden Gene	84
3.6.2.4. Analyse der Gene mit einer hohen Expression im Modiolus im Vergleich zu Organ Corti und Stria vascularis	86
3.6.2.5. Analyse der Gene mit einer mehr als zweimal so hohen Expression im Modiolus gegenüber Organ Corti und Stria vascularis	88
3.6.2.6. Analyse der nur im Modiolus vorkommenden Gene	90
3.6.2.7. Analyse der Gene mit einer hohen Expression in der Stria vascularis im Vergleich zu Organ Corti und Modiolus	92
3.6.2.8. Analyse der Gene mit einer mehr als zweimal so hohen Expression in der Stria vascularis gegenüber Organ Corti und Modiolus	94
3.6.2.9. Analyse der nur in der Stria vascularis vorkommenden Gene	96
3.6.3. HIF-1 alpha mRNA	99
3.6.4. Charakterisierung der Genexpression unter besonderer Berücksichtigung HIF-1-abhängiger Gene	100
3.6.5. Charakterisierung der Genexpression unter Kultivierung (S2)	103
3.6.5.1. Analyse der Gene, die unter Kultivierung hochreguliert wurden	104
3.6.5.2. Analyse der Gene, die unter Kultivierung runterreguliert wurden	128
3.6.6. Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression (S3)	134
3.6.6.1. Gene, die unter Hypoxie hochreguliert wurden	136
3.6.6.2. Gene, die unter Hypoxie runterreguliert wurden	140
3.6.7. Veränderung von „Prestin“ als Schlüsselgen der äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur der Cochlea	144
3.6.7.1. Veränderung von „Prestin“ in der organotypischen Kultur unter Hypoxie und Ischämie	147
3.6.8. Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene unter Kultivierung und Hypoxie ..	148
4. Diskussion	151
4.1. Vor- und Nachteile des eingesetzten Modells	151
4.2. Mechanismen der Schädigung von Haarzellen durch Hypoxie/Ischämie	152
4.3. Einfluss von Elektrolyten auf die Ischämievulnerabilität von Haarzellen in der organotypischen Kultur	155
4.3.1. Einfluss von Kalium	155
4.3.2. Einfluss von Kalzium	159
4.3.3. Einfluss von Magnesium	161
4.3.4. Protektiver Einfluss von MK 801	162
4.4. Art des Zelltodes unter Ischämie	163
4.5. Rolle der HIF-1-Aktivität	164
4.6. Analyse der Genexpression (mRNA)	167
4.6.1. Charakterisierung der Genexpression in der frisch präparierten Cochlea (S1) ..	167
4.6.2. Veränderung der Genexpression unter Kultivierung (S2)	171
4.6.2.1. Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene unter Kultivierung	174
4.6.3. Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression (S3)	175
4.6.4. Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene unter Hypoxie	177
4.7. Analyse der Prestinexpression	177
5. Schlussfolgerungen für die Protektion von Haarzellen und Ausschau auf zukünftige Untersuchungen	179
6. Zusammenfassung	182

7. Literatur	186
8. Schema- und Abbildungsverzeichnis	219
9. Tabellenverzeichnis	224
10. Abkürzungsverzeichnis	226
Erklärung	231
Danksagung	232

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Hypoxie/Ischämie auf die organotypische Kultur sowie die daraus resultierenden Veränderungen der Genexpression der neugeborenen Wistar ratte (3.-5. postnataler Tag) untersucht. Die innere Haarzelle ist gegenüber Hypoxie/Ischämie vulnerabler als die äußere Haarzelle. Für die unterschiedliche Vulnerabilität der Haarzellen spielt besonders die Plasmamembran-Kalzium-ATPase (PMCA) eine bedeutende Rolle. Die Aktivierung der Plasmamembran-Kalzium-ATPase kann ein zukünftiger therapeutischer Ansatz zur Protektion von Haarzellen sein.

Elektrolyte haben einen entscheidenden Einfluss auf die Hypoxie/Ischämie-Vulnerabilität von Haarzellen. So führte unter Normoxie als auch unter Ischämie eine Kalium-Erhöhung nicht zu einer Zunahme der Haarzellschädigung. Unter Ischämie hatte im Gegenteil eine Kalium-Konzentration von 70 mM einen stark protektiven Effekt auf die Haarzellen. Magnesium und MK 801 (NMDA-Antagonist) zeigten in der organotypischen Kultur ebenfalls eine Protektion der inneren und äußeren Haarzelle während Hypoxieexposition.

Hypoxie und Ischämie führen zum Zelltod der Haarzellen über Apoptose und Nekrose. Wachstumsfaktoren wie rhEPO, rhIGF-1 und rhEGF verringerten in der organotypischen Kultur die apoptotische und nekrotische Todesrate. Da die Apoptose partiell reversibel ist, kann die Aktivierung oder Blockade bestimmter Signalwege der Apoptose zur Haarzellprotektion oder zum Haarzelltod führen.

Für die Charakterisierung des Profils der Genexpression und ihrer Veränderung durch Kultivierung und Hypoxie wurden Microarray-Untersuchungen (RN U34-Genchip von Affymetrix) verwandt. Die Gewebeprobe von drei Regionen der Cochlea, Organ Corti, Modiolus und Stria vascularis, wurden untersucht. Es wurden drei Gruppen gebildet: Genexpressionsprofil der frisch präparierten Cochlea, Genveränderungen unter

Kultivierung und unter Hypoxie. Interessanterweise sind die typischen Eigenschaften der Cochlea bereits am 3.-5. postnatalen Tag ausgeprägt. Im **Organ Corti** fanden sich besonders Gene, die wesentlich für die Kalzium- und Kalium-Homeostase verantwortlich sind. Im **Modiolus** waren besonders Gene nachweisbar, die für die Entwicklung, die Reifung und die Regulation neuronaler Strukturen verantwortlich sind. In der **Stria vascularis** wurden überwiegend Gene exprimiert, deren Genprodukte der Sicherung der Ionenhomeostase und der Durchblutung sowie dem Schutz vor Radikalen dienen.

Betrachtet man die Veränderungen im **Organ Corti** unter Kultivierung, so zeigten sich bei der Hochregulation starke Genveränderungen im Glukose-Stoffwechsel, bei Cytokinen und einigen speziellen Genen, z. B. der „*Heme oxygenase 1*“ (*Hmox*) und „*Proteinkinase 9*“ (*Mapk9*). Runterreguliert waren besonders Gene der Neurotransmission und der Signaltransduktion. Die stärksten Veränderungen in der Genexpression unter Kultivierung waren im **Modiolus** nachweisbar. Die Genveränderungen in der **Stria vascularis** entsprachen im Wesentlichen der des Organ Corti. Die insgesamt sehr starken Veränderungen in der Genexpression innerhalb von 24 Stunden während der Kultivierung sind einerseits offensichtlich Ausdruck des traumatischen Stresses durch Präparation und Kultivierung, andererseits der normalen Entwicklungsprozesse, die aber unter Kulturbedingungen verändert ablaufen.

Im Gegensatz zu den durch die Kultivierung induzierten Veränderungen waren die durch 5 h Hypoxie induzierten Veränderungen sehr gering. Die stärkste Veränderung der Hochregulation in der Genexpression unter Hypoxie zeigte sich im **Modiolus**. Sowohl Wachstumsfaktoren, eine Reihe von Ionenkanälen sowie Gene der Neurotransmission wurden im **Modiolus** hochreguliert.

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) ist ein Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Anpassung von Zellen und Geweben an Hypoxie und Ischämie. In der Cochlea führten Hypoxie und Ischämie zu einer deutlichen und gewebespezifischen Aktivierung von HIF-

1, wobei im **Modiolus** und **Organ Corti** die höchsten Aktivitäten nachweisbar waren. Der HIF-1 alpha mRNA-Gehalt veränderte sich unter Normoxie und Hypoxie nicht und war im **Modiolus** wesentlich niedriger als im **Organ Corti** und in der **Stria vascularis**. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die HIF-1 alpha mRNA-Expression und die Proteinexpression in der Cochlea nicht parallel verlaufen. Demzufolge ist die Regulation von HIF-1 in der Cochlea in der Posttranslationsebene zu vermuten. Protektive therapeutische Ansätze sind nicht über die HIF-1 alpha Aktivierung zu erwarten, sondern eher über die Hoch- oder Runterregulation der Targetgene.

Bei den HIF-1-abhängigen Genen wies die **Stria vascularis** unter Normoxie die höchste Expression der Gene „*Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter, member 1*“ (*Slc2a1*) und „*Insulin-like growth factor binding protein 2*“ (*Igfbp2*) auf. Unter Kultivierung wurden zahlreiche HIF-1-abhängige Gene in der Cochlea hochreguliert. Hochreguliert (≥ 2 fach) wurden die Gene, die im Zusammenhang mit dem Umsatz der Glukose (*Gapdh*), dem Glukosetransport (*Slc2a1*), der Aktivität des Wachstumshormons IGF, mit dem Eisentransport (*Tf, Tfrc*), der Durchblutung bzw. der Elimination von Sauerstoffradikalen stehen. Eine 5 Stunden dauernde Hypoxie führte nur zu einer geringen Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene. Eine mehr als 2fache Erhöhung war bei „*Insulin-like growth factor 2*“ (*Jgf2*) im **Modiolus** nachzuweisen.

Da das Prestin-Gen auf dem neurobiologischen Chip nicht enthalten ist und aufgrund der bedeutenden Rolle von Prestin für die Haarzellfunktion, wurden die Veränderungen der Prestin mRNA-Expression durch schädigende Faktoren mittels RT-PCR untersucht. Der Prestin mRNA-Gehalt im **Organ Corti** der neugeborenen Ratte stieg während der Entwicklung *in vitro* ebenso wie *in vivo* um den Faktor zwei an. Diese Zunahme war mit der Herausbildung eines apikal-basalen Gradienten verbunden, wobei apikal der höchste mRNA-Gehalt vorlag. Ischämie und Hypoxie führen zu einer Abnahme des Prestin mRNA-Gehaltes parallel zum Verlust der äußeren Haarzellen. Dies bestätigt, dass die

Abnahme des Prestin mRNA-Gehaltes als ein Indikator für den Schaden oder Verlust der äußeren Haarzelle angesehen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe neuer Erkenntnisse über die Rolle von Hypoxie/Ischämie in der Cochlea gewonnen, die neue Ansatzpunkte für Therapiemöglichkeiten und Prävention der Hypoxie/Ischämie bedingten Hörstörungen bieten.

8. Schema- und Abbildungsverzeichnis

Schema 1 Tinnitusklassifizierung

Abb. 1 Schematischer Versuchsaufbau der Microarray-Untersuchungen der Cochlea der Serien 1, 2 und 3.

Abb. 2 Darstellung der Microarray-Untersuchung. (Quelle: www.dkfz.de/ibios_old/lectures/bioinf_ss05/rKoenig/FunktionalAnalyse1TB.pdf)

Abb. 3 Kontrollplasmid pGL3 und Reporterplasmid pHBE.

In das Reporterplasmid pHBE sind drei HBE-Bindungsstellen mit einer EcoRI-Kontrollschnittstelle in den Enhancer-Bereich des SV 40-Promotors hineinkloniert worden. Nach Bindung von HIF-1 an die HBEs erfolgt eine im Vergleich zum Kontrollplasmid verstärkte Expression der Luciferase.

Abb. 4 Repräsentative Darstellung der Rhodamine-Phalloidin gefärbten Cochlea-Kultur (apikaler Teil) unter Normoxie (oben) und nach 24 h Hypoxie (unten). Der Strich entspricht 10 μm .

Abb. 5 Prozentualer Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) in den 3 cochleären Segmenten nach unterschiedlicher Hypoxiedauer im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Hypoxieexposition erfolgte unmittelbar (oben; 13 h n = 21, 36 h n = 41, Kontrollen n = 36) oder 12 h (unten; 24 h n = 20, 48 h n = 12, Kontrollen n = 17) nach der Präparation. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Abb. 6 Haarzellverlust (%) in der gesamten Cochlea nach 6 bzw. 8 h dauerndem Glukosemangel (n=18), Hypoxie (n = 21) oder Ischämie (Glukosemangel + Hypoxie; n=51) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (n = 19). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Abb. 7 Einfluss der Kalium (K^+)-Konzentration im Medium unter Normoxie auf die Anzahl der inneren (IHZ) und äußeren (ÄHZ) Haarzellen, die in den 3 cochleären Segmenten/100 μm gezählt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (5 mM K^+ , n = 36; 30 mM K^+ , n = 19; 50 mM K^+ , n = 17; 70 mM K^+ , n = 19).

Abb. 8/9 Einfluss der Kalium (K^+)-Konzentration im Medium auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ), die in den 3 cochleären Segmenten nach 3 h (Abb. 8, oben) und 4 h (Abb. 9, unten) Ischämie pro 100 μm gezählt wurden (% zu Kontrollen). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. (Abb. 8: n = 9-11, * p < 0,05; Abb. 9: n = 8-15; ***/*** p < 0,01/0,001/0,001 vs. Ischämie bei 5 mM K^+ im Medium).

- Abb. 10** Wirkung von unterschiedlichen Eosinkonzentrationen (1,5 μM , n = 15; 5 und 10 μM , je n = 9) auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 19). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (**/*** p < 0,05/0,01 vs. Kontrolle).
- Abb. 11** Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) in den 3 cochleären Segmenten nach 36 h Hypoxie ohne (n = 12) und mit Zusatz von 3 mM Magnesium (Mg, n = 6) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (n = 15). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. P < 0,01/0,001 kennzeichnet die Signifikanzen zwischen den beiden Hypoxiegruppen.
- Abb. 12** Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) in den 3 cochleären Segmenten nach 36 h Hypoxie ohne (n = 12) und mit Zusatz von 1 μM (n = 6) bzw. 10 μM MK 801 (n = 8) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (n = 15). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. P < 0,05/0,001 kennzeichnet die Signifikanzen zwischen der unbehandelten und den mit MK 801 behandelten Hypoxiegruppen.
- Abb. 13** Anzahl der inneren (IHZ) und äußeren (ÄHZ) Haarzellen/100 μm in den 3 cochleären Bereichen nach 3 h (n = 5-19) und 4 h Ischämie (n = 6-22) im Vergleich zu den Kontrollen (n = 18-28). Die Proben wurden entweder unmittelbar oder 24 h nach der Ischämie fixiert (**/*** p < 0,05/0,01 vs. unmittelbar). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.
- Abb. 14** Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellkerne/100 μm in den 3 cochleären Segmenten nach 3 h (n = 5-21) und 4 h Ischämie (n = 4-22) im Vergleich zu den Kontrollen (n = 18-28). Die Proben wurden entweder unmittelbar oder 24 h nach der Ischämie untersucht (**/*** p < 0,05/0,01 vs. unmittelbar). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.
- Abb. 15** Anzahl der im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea gezählten inneren und äußeren Haarzellen/100 μm der Kontrollgruppe (n = 22-23) sowie nach 3,5 h Ischämie ohne Wachstumsfaktoren (WF) (n = 30-33), mit rhEPO (n = 8-9), rhIGF-1 (n = 11-12) und rhEGF (n = 9-11). (Mittelwerte \pm Standardfehler; **/*** p < 0,05/0,001 vs. Ischämie ohne WF).
- Abb. 16** Einfluss der Wachstumsfaktoren (WF) auf die Anzahl der nekrotischen (PI-gefärbten) und apoptotischen (ApopTag^R-gefärbten) Kerne, die in den 3 cochleären Segmenten der Kontrollgruppen (n = 18-23) und nach 3,5 h Ischämie ohne WF (n = 26-33) sowie mit rhEPO (n = 8-10), rhIGF-1 (n = 11-12) und rhEGF (n = 4-11) pro 100 μm gezählt wurden (Mittelwerte \pm Standardfehler; **/*** p < 0,05/0,01 vs. Ischämie ohne WF).

- Abb. 17** Korrelation zwischen der Anzahl der Haarzellen und den PI- and ApopTag®-gefärbten Kernen, die im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea/100 µm gezählt wurden. Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen verwendet. (Kontrolle und Ischämie mit und ohne Wachstumsfaktoren).
- Abb.18** Erythropoetin-Rezeptor-Bande in Organ Corti (OC), Stria vascularis (SV), Modiolus (MOD) im Vergleich zur Leber.
- Abb. 19** Expression der Vektoren pGL3 (weiß) und pHRE (schwarz) in der Explant-Kultur von Stria vascularis (SV), Organ Corti (OC) und Modiolus (MOD) in Normoxie und Hypoxie (gemessen in RLE = relativen Lumineszenzeinheiten, Mittelwert ± Standardfehler, n = 11-15). Die Kulturen wurden direkt nach der Hypoxie (24 h) transfiziert (* p < 0,001 vs. SV).
- Abb. 20** Kinetik der HIF-1-Aktivität in den Einzelzellkulturen der drei Cochleagewebe Stria vascularis (SV), Organ Corti (OC) und Modiolus (MOD) nach 6 h, 13 h, 24 h und 36 h Hypoxie. Angegeben ist der Quotient aus pHRE/pGL3 unter Normoxie und Hypoxie (Mittelwerte ± Standardfehler; n = 4-6 für jede Hypoxiezeit; * p < 0,05 vs. 6 h; # p < 0,05 im Vergleich zu SV).
- Abb. 21** Einfluss von Hypoxie und Ischämie auf die HIF-1-Aktivierung in der Einzelzellkultur von Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV). Die Untersuchung erfolgte im kompletten Medium (Hypoxie), in Elektrolytlösung mit Glukose (Hypoxie) und Elektrolytlösung ohne Glukose (Ischämie). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler (n = 4-6).
- Abb. 22** Zytochemische Identifikation von HIF-1 alpha in Einzelzellkulturen von Stria vascularis (SV), Cortischem Organ (OC) und Modiolus (MOD) in Kulturen nach 24-stündiger Normoxie oder Hypoxie. (a) SV, Normoxie; (b) SV, Hypoxie; (c) SV, 60 Minuten nach Hypoxie; (d) OC, Normoxie; (e) OC, Hypoxie; (f) OC, 60 Minuten nach Hypoxie; (g) MO, Normoxie; (h) MO, Hypoxie; (i) MO, 60 Minuten nach Hypoxie. Dabei wurden normoxische Kulturen mit Kulturen, die einer Hypoxie von 24 h ausgesetzt waren und direkt nach Hypoxieende fixiert wurden, sowie mit Kulturen, die einer 24 h Hypoxie ausgesetzt waren aber 60 min nach Hypoxieende fixiert wurden, verglichen.
- Abb. 23** Korrelation der normierten Signale von zwei Aliquotes des Organ Corti.
- Abb. 24** Korrelation der normierten Signale des Organ Corti der Proben P2 und P4.
- Abb. 25** Korrelation der normierten Signale der „housekeeping“ Gene in den Proben P1 und P2-P4 von Organ Corti.
- Abb. 26** Variation der normierten Signale der Proben P2 und P4 des Organ Corti.

- Abb. 27** Analyse der Signifikanzschwelle der normierten Signale des Organ Corti (P2).
- Abb. 28** Histogramm der Absolutwerte (oben) und der log 2-Werte (unten) der normierten Signale des Organ Corti (P2).
- Abb. 29** Ergebnis der Berechnung von hierarchischen Clustern der neugeborenen Ratte in den Regionen Organ Corti, Stria vascularis und Modiolus. Rot = hohe Expression, blau = niedrige Expression, gelb = mittlere Expression.
- Abb. 30** Gene, die über der 90. Perzentile im Organ Corti exprimiert wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, andere Gene = weiß.
- Abb. 31** Gene im Organ Corti (OC), deren normierte Signale mehr als doppelt so hoch exprimiert wurden wie in Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV).
Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): *Atp2b2, Slc10a1*,
Wachstums- und Überlebensgene (2): *Igf2, Igfbp3*,
Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): *Rab3a, Slc1a3*.
- Abb. 32** Gene, die nur im Organ Corti als „present“ bewertet wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellblau.
- Abb. 33** Gene, die über der 90. Perzentile im Modiolus exprimiert wurden. Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau.
- Abb. 34** Gene, die im Modiolus mindestens doppelt so hoch exprimiert wurden wie im Organ Corti und der Stria vascularis.
Wachstums- und Überlebensgene (2): *Cnp1, Egr1, Igf2, Mag, Nr4a1, Plp, Ednrb, Mapk9, Prnp, Vcam1, Ctsk*,
Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): *Snca*.
- Abb. 35** Gene, die nur im Modiolus exprimiert wurden. Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellgrau, andere Gene = weiß.
- Abb. 36** Gene, die in der Stria vascularis hoch exprimiert wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1) = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene (2) = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3) = hellblau.
- Abb. 37** Gene, die in der Stria vascularis signifikant höher exprimiert wurden als im Organ Corti und im Modiolus.
Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): *Atp1a1, Atp1b2, Atp1b3*,

Wachstums- und Überlebensgene (2): *ApoE*, *Fgfr1*, *Fgfr4*, *Igf1*, *Igfbp2*, *Nnat*, *Pou3f4*, *Serpine2*, *Sod3*, *Tf*,

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): *Ghul*.

- Abb. 38** Gene, die nur in der Stria vascularis exprimiert wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellblau.
- Abb. 39** Expression von HIF-1-abhängigen Genen in der organotypischen Kultur von Cortischem Organ (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) unter Normoxie. Die Analyse erfolgte mittels Microarray (Affymetrix). Dargestellt sind die normierten Signale in logarithmischer Form. Folgende Gene erreichen im OC und MOD nicht die statistische Signifikanz von $p < 0,04$: *Pdgfra*, *Vegfb*, *Hmox1*, *Nos2*, *Trfc*. In der SV ist *Trfc* „marginal“ ($p = 0,054$).
- Abb. 40** Cochleogramm für die inneren (grau) und äußeren (weiß) Haarzellen (IHZ/ÄHZ) nach 5 h Hypoxie (% zur Normoxie). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 9-13$).
- Abb. 41** Totale RNA (oben) und Prestin mRNA (unten) in den 3 cochleären Segmenten während der Kultivierung *in vitro*. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$). * $p < 0,001$ vs. sofort; # $p < 0,01$ vs. apikal bzw. medial.
- Abb. 42** Totale RNA (oben) und Prestin mRNA (unten) in den 3 cochleären Segmenten während der Entwicklung *in vivo* am 3. (weiß), 5. (grau) und 7. (schwarz) postnatalen Tag. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$). * $p < 0,05$ vs. 3. Tag; # $p < 0,01$ vs. apikal.
- Abb. 43** Veränderung der HIF-abhängigen Gene in der organotypischen Kultur von Organ Corti (OC), Stria vascularis (SV) und Modiolus (MOD) unter Kultivierung.
- Abb. 44** Veränderung der HIF-abhängigen Gene in der organotypischen Kultur von Organ Corti (OC), Stria vascularis (SV) und Modiolus (MOD) unter Hypoxie.
- Abb. 45** Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Vulnerabilität von äußeren (ÄHZ) und inneren (IHZ) Haarzellen und bei Hypoxie und Ischämie.
- Abb. 46** Zusammenfassung der spezifischen Genexpression in der frisch präparierten Cochlea (S1) im Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und in der Stria vascularis (SV). (Quelle Cochlea: anatomy.iupui.edu/Earf04/cochlea.jpg)

9. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1** Rolle von Hypoxie/Ischämie für den neurosensorischen Tinnitus.
- Tabelle 2** Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) unter ischämischen Bedingungen und einer K^+ -Konzentration von 70 mM im Medium ohne Blocker oder mit Linopiridin, KB-R7943 bzw. Eosin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (% gegenüber Werten ohne Blocker bei 70 mM K^+ unter Normoxie).
- Tabelle 3** Anzahl der gezählten inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) pro 100 μ m unter Normoxie und Ischämie ohne (Kontrollen) und mit unterschiedlichen Thapsigargin-Konzentrationen [Mittelwert \pm Standardfehler (n)].
- Tabelle 4** Anzahl der gezählten inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) pro 100 μ m unter Ischämie ohne (Kontrollen) und mit unterschiedlichen Eosin-Konzentrationen [Mittelwert \pm Standardfehler (n)].
- Tabelle 5** Korrelationsanalyse der normierten Signale von Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) unter den Bedingungen Normoxie, Kultivierung und Hypoxie.
- Tabelle 6** Korrelationsanalyse der normierten Signale der „housekeeping“ Gene von Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) zwischen Normoxie (P1) und Kultivierung (P2/P4).
- Tabelle 7** Differentielle Genexpression in den Regionen Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV).
- Tabelle 8** HIF-1 alpha mRNA-Expression in Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) in Normoxie. Gegenübergestellt sind die Microarray-Daten (normierte Signale) und die Werte der quantitativen RT-PCR.
- Tabelle 9** HIF-1-abhängige Zielgene, die auf dem RN U34-Chip enthalten sind.
- Tabelle 10** Anzahl der hoch- und runterregulierten Gene unter Kultivierung.
- Tabelle 11** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Kohlenhydratstoffwechsel.
- Tabelle 12** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Wachstumsfaktoren.
- Tabelle 13** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Cytokine.
- Tabelle 14** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der Kinasen.
- Tabelle 15** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Redoxstoffwechsel.
- Tabelle 16** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Apoptose.
- Tabelle 17** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der Transkriptionsfaktoren.

- Tabelle 18** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Stress-Proteine und Peptide.
- Tabelle 19** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der Phosphodiesterasen.
- Tabelle 20** Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der „anderen“ Gene.
- Tabelle 21** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Wachstum und Zytoskelett.
- Tabelle 22** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Ionenkanäle.
- Tabelle 23** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Neurotransmission.
- Tabelle 24** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Signaltransduktion.
- Tabelle 25** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Apoptose.
- Tabelle 26** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Transportproteine.
- Tabelle 27** Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Proteinsynthese.
- Tabelle 28** Anzahl der hoch- und runterregulierten Gene unter Hypoxie (5 h).
- Tabelle 29** Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Wachstumsfaktoren.
- Tabelle 30** Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Transkriptionsfaktoren.
- Tabelle 31** Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Ionenkanäle.
- Tabelle 32** Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Neurotransmission.
- Tabelle 33** Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Apoptose.
- Tabelle 34** Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Wachstum/Zytoskelett.
- Tabelle 35** Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Apoptose.
- Tabelle 36** Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Cytokine.
- Tabelle 37** Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Redoxstoffwechsel.
- Tabelle 38** Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Signaltransduktion.
- Tabelle 39** Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Transkriptionsfaktoren.
- Tabelle 40** Effekt der Hypoxie (38 h) auf den Prestin mRNA Gehalt des Organ Corti.

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACH	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ÄHZ	Äußere Haarzelle
AMPA	Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ApopTag®	Insitu DNA End labeling Assay
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH-PAS-	Basische Helix-Loop-Helix- und PER-ARNT-SIM-Homologie-Domäne
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
Ca ²⁺	Kalzium
cGMP	3,5-Guanylmorphosphat
CO ₂	Kohlendioxid
DA	Dopamin
DLU	Digital light unit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EST	Expressed sequence tag
ET1	Endothelin 1
EZK	Einzelzellkultur
F-Aktin	Filamentäres Aktin
GABA	Gammaaminobuttersäure
G-Aktin	Globuläre Aktin-Monomere
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT5	Glukosetransporter 5
h	Stunde
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HRE	Hypoxie response element
IHZ	Innere Haarzelle
iNOS	Induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase
K ⁺	Kalium
MOD	Modiolus
mRNA	Messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthasen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
n.s.	Nicht signifikant
OC	Organ Corti
PCR	Polymerase chain reaction
PI	Propidiumiodid
PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck

rhEGF	Recombinant human epithelial growth factor
rhEpo	Recombinant human erythropoetin
rhIGF-1	Recombinant human insulin-like growth factor
RLE	Relative Lumineszenzeinheit
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SERCA	Smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase
SLC 26	Sulfat-Anionen-Austauscher ähnliche Proteine
SV	Stria vascularis
TNF	Tumor necrosis factor
u. a.	Unter anderem
VK	Variationskoeffizient
WF	Wachstumsfaktoren
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

GENE

Adora2b	Adenosine A2B receptor
Apoe	Apolipoprotein E
Arrb2	Arrestin, beta 2
ATF2	Activating transcription factor
Atp1a1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
Atp1b1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide
Atp1b3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3 polypeptide
Atp2a3	ATPase, Ca ²⁺ transporting
Atp2b2	ATPase, Ca ²⁺ transporting, plasma membrane 2, auch als Pmca2 bekannt
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl2	B-cell cll/lymphoma 2
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor
Birc2	Baculoviral IAP repeat containing 2
Bmyc	Brain expressed myelocytomatosis oncogene
C3	Komplementfaktor 3
C4a	Komplementfaktor 4a
C9	Complement component 9
Cacna1e	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1E subunit
Cacnb2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
Calm1	Calmodulin 1
Casp2	Caspase 2
Casp3	Caspase 3
Capn3	Calpain 3
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
Cebpb	CCAAT-enhancer binding protein beta
Chrm2	Cholinergic receptor, muscarinic 2
Chrna9	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 9
Chrna7	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7
Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator

Ckb	Creatine kinase, brain
Clcn3	Chloride channel 3
Cnp1	Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1
Crem	cAMP response element modulator
Ctsk	Cathepsin K
Drd1a	Dopamine receptor 1A
Et-1	Endothelin-1
Ednrb	Endothelin receptor type B
Eef2	Eukaryotic translation elongation factor 2
Egr1	Early growth response 1
Eno2	Enolase 2, gamma
Enpp2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
Fas ligand	TNF superfamily, member 6
Fez1	Fasciculation and elongation protein zeta 1
Fez2	Fasciculation and elongation protein zeta 2
Fgf2	Fibroblast growth factor
Fgf5	Fibroblast growth factor 5
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1
Fgfr4	Fibroblast growth factor receptor 4
Fos11	Fos-like antigen 1
Gabbr1	GABA B receptor 1
Gabt1	GABA Transporter protein
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gfap	Glia fibrillary acidic protein
Glul	Glutamine synthetase 1
Gmfb	Glia maturation factor, beta
Gnao	Guanine nucleotide binding protein, alpha o
Gpr51	G protein-coupled receptor 51
Gria4	Glutamate receptor, ionotropic, 4
Grm6	Glutamate receptor, metabotropic 6
Gsta5	Glutathion-S-transferase A5
Hk1	Hexokinase 1
Hmox1	Heme oxygenase 1
Hspa1a/b	Heat shock protein 1a/b
Hspa1a	Heat shock protein 1a
Hsp70	Heat shock protein 70
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1
Igf1	Insulin-like growth factor 1
Igf2	Insulin-like growth factor 2
Igfbp1	Insulin-like-growth factor binding protein 1
Igfbp2	Insulin-like growth factor binding protein 2
Igfbp3	Insulin-like growth factor binding protein 3
Il15	Interleukin 15
Il1b	Interleukin 1 beta
Il6	Interleukin 6
Il8	Interleukin 8
Irf-1	Interferon regulatory factor 1
Jak2	Januskinase 2
Jgflr	Insulin-like growth factor 1 receptor
Jun	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)

Junb	Jun-B oncogen
Kcne1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1
Kcnj1	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1
Kcnj11	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11
Kcnj16	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16
Mag	Myelin-associated glycoprotein
Maob	Monoamine oxidase B
Mapk9	Mitogen-activated protein kinase 9
Mapt	Microtubule associated protein tau
Mbp	Myelin basic protein
Mbz	Myelin protein zero
Mcl-1	Myeloid cell leukaemia sequence 1
Mif	Macrophage migration inhibitory factor
Mtap2	Microtubule associated protein 2
Mt1a	Metallothionein
Nefh	Neurofilament heavy polypeptide
Neud4	Neuronal d4 domain family member
Nfl	Neurofibromatosis 1
Nip3	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 3
Nnat	Neuronatin
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible
Npy	Neuropeptide y
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
Nrxn2	Neurexin 2
Ntf3	Neurotrophin-3
Ntrk2	Neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2
Nxph4	Neurexophilin 4
Oprk1	Opioid receptor kappa 1
P53	Tumor protein 53
Pbp	Phosphatidylethanolamine binding protein
Pcp4	Purkinje cell protein 4
Pdap1	PDGFA associated protein 1
Pde4b	Phosphodiesterase 4b
Pdgfa	Platelet-derived growth factor, alpha
Pdgfb	Platelet-derived growth factor, B polypeptide
Pdgfra	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Penk-rs	Preproenkephalin, related sequence
Plp	Proteolipid protein
Pmca2	ATPase, Ca ²⁺ transporting, plasma membrane 2, auch als Atp2b2 bekannt
Pou3f4	POU domain, class 3, transcription factor 4
Prkez	Protein kinase C, zeta
Prnp	Prion protein
Rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family
RG:621458	Neurofilament light polypeptide
RGD:61922	Sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide
RGD:628710	Voltage-gated channel like 1
Rhoip3	Rho interacting protein 3
S100a1	S100 calcium binding protein A1
S100b	S 100 protein, beta polypeptide
Scn3a	Sodium channel, voltage-gated, type III, alpha polypeptide

Selp	Selectin, platelet
Ser2	Serpine 2
Serpin2	Serine proteinase inhibitor, clade E, member 2
Slc1a2	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
Slc1a3	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3
Slc2a1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
Slc2a3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
Slc6a3	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3
Slco1a4	Solute carrier organic anion transporter family, member 1a4
Smad1	SMAD, mothers against DPP homolog 1
Snca	Synuclein alpha
Sncg	Synuclein gamma
Sod3	Superoxide dismutase 3
Stx12	Syntaxin 12
Stxbp1	Syntaxin binding protein 1
Sult2A2	Sulfotransferase family 2, member 2 (predicted)
Syt3	Synaptotagmin 3
Tac1	Tachykinin1
Tf	Transferrin
Tfrc	Transferrin receptor
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2
Thra	Thyroid hormone receptor alpha
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
Vdac1	Voltage-dependent anion channel 1
Vegfb	Vascular endothelial growth factor B
Vgf	VGF nerve growth factor inducible

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Scherer möchte ich sehr herzlich danken für die freundliche und wohlwollende Förderung und Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Arbeit. Seine hohe wissenschaftliche und menschliche Kompetenz waren überaus motivierend für das Zustandekommen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Gross gilt mein ganz besonderer und herzlicher Dank für die freundliche Unterstützung meiner wissenschaftlichen Aktivitäten. Seine wissenschaftliche Kompetenz und sein menschlicher Stil haben die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht. Bei der Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten und deren Auswertung stand er mir stets mit anregenden Diskussionen zur Seite.

Herrn Prof. Dr. B. Klapp möchte ich sehr herzlich für seine wohlwollende und von nachhaltigem Interesse geprägte Unterstützung meiner Arbeit danken. Aufmerksam und zurückhaltend beratend begleitete er meinen beruflichen und wissenschaftlichen Werdegang.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Ing. (FH) H. Haupt, die durch ihre Ideen, Anmerkungen und wertvollen Hinweise sowie den außerordentlich bereichernden wissenschaftlichen Gedankenaustausch das Ergebnis der Arbeit entscheidend mitgeprägt hat.

Für die unermüdliche Unterstützung bei der Laborarbeit und für die von nicht selbstverständlichem Einsatz geprägte Zusammenarbeit danke ich Frau N. Amarjargal, Frau A. Machulik, Frau J. Fuchs, Frau M. Descher und Frau R. Moller auf das herzlichste.

Herrn Dr. Kuban und Frau Dr. Ungethüm danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung bei der Auswertung und Bearbeitung der Microarray-Daten.

Bei Frau Dr. E. Winter, Frau Dr. C. Rheinländer und Herrn Dr. F. Fuchs möchte ich mich herzlich bedanken, die im Rahmen ihrer Promotionsarbeiten mit ganzem Einsatz die Labortätigkeiten unterstützten.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tinnituszentrums der Charité, die mich in vielfältiger Weise bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann und meinen Eltern für die vielfältige Unterstützung, Motivation und das immerwährende Verständnis während der Fertigstellung dieser Arbeit.