

# 1. Einleitung

## 1.1. Hörstörungen

Schwerhörigkeit stellt eine weit verbreitete Störung des Hörsystems dar. Schätzungen gehen weltweit von rund 70 Millionen Menschen mit Schwerhörigkeit aus (Tekin et al., 2001). In Deutschland gehören Hörstörungen zu den 10 häufigsten Erkrankungen im Alter (Rieder, 2003). Eine Studie aus Großbritannien zeigt, dass ca. 10 % der über 65-jährigen und ca. 50 % der über 80-jährigen Menschen so stark von Hörstörungen betroffen sind, dass die lautsprachliche Kommunikation beeinträchtigt ist (Davies, 1995). Angesichts der steigenden Lebenserwartung ist zu erwarten, dass die Prävalenz von Hörstörungen allein aufgrund einer Zunahme der Altersschwerhörigkeit in den nächsten Jahren ansteigt. Aber auch bei Jugendlichen ist aufgrund von Freizeitlärm eine zunehmende Hörminderung festzustellen (Zenner et al., 1999).

Im Kindesalter sind bleibende Hörstörungen eher selten. Nach gegenwärtigen Schätzungen liegt ihre Prävalenz in Deutschland mit 1,2 von 1000 Neugeborenen im Vergleich der entwickelten Länder (Gross et al., 2000). In Deutschland werden bei den permanenten kindlichen Hörstörungen 35 % auf eine genetische Ursache und 20 % auf eine erworbene Ursache zurückgeführt. Für 45 % der Betroffenen ist die Ätiologie unklar (nach den Datensätzen des Deutschen Zentralregisters für kindliche Hörstörungen 2001) (Gross et al., 2001).

Tinnitus stellt ebenfalls eine häufige Störung des Hörsystems dar. Personen mit einem Hörverlust weisen signifikant häufiger Tinnitus auf als Personen ohne Hörverlust (Lenarz, 1992). Hesse (2000) gibt in seinen Untersuchungen an, dass 95 % der Tinnituspatienten einen messbaren Hörverlust aufweisen. In Deutschland geht man davon aus, dass 18,7 Millionen Menschen einen Tinnitus erlebt haben und 9,8 Millionen Menschen von Tinnitus betroffen sind. Nach einer epidemiologischen Studie der Deutschen Tinnitusliga werden

aber weniger als 15 % der von einem Tinnitus betroffenen Menschen letztendlich behandlungsbedürftig (Pilgramm et al., 1999).

Zahlreiche Beobachtungen weisen darauf hin, dass Hypoxie (Sauerstoffmangel) und Ischämie (Sauerstoff- und Substratmangel) wesentliche pathogenetische Faktoren für die Entstehung von Hörstörungen sind. Die Mehrzahl der erworbenen Hörstörungen im Säuglingsalter wird mit Infektionen sowie prä-, peri- und postnatalen hypoxisch-ischämischen Episoden in Verbindung gebracht (Gross et al., 2000). Infektionen stehen über die Bildung von Ödemen und Vaskulitiden ebenfalls mit Hypoxie und Ischämie in Verbindung. Durchblutungsstörungen im Innenohr sind sowohl mit Sauerstoff- als auch Substratmangel verbunden. Auch bei intensiver Lärmbelastung kommt es zu einem Sauerstoffmangel (Abfall des Sauerstoffpartialdruckes,  $pO_2$ ) in der Innenohrflüssigkeit Perilymphe (Scheibe et al., 1992).

Wesentliche Mechanismen, die zu Hörstörungen führen können, sind: Haarzellverluste, Störung der Signaltransduktion im Bereich der äußeren und inneren Haarzellen sowie der Spiralganglien. Auslösende Faktoren können mechanische und toxische Störungen sowie auch Hypoxie und Ischämie sein.

## **1.2. Rolle der Haarzelle bei der Entstehung von Hörstörungen**

Die häufigste Ursache der sensorineuralen Schwerhörigkeit ist ein direkter Haarzellschaden (Naumann et al., 1994). An der Haarzelle findet die Signaltransduktion von der mechanischen Schallwelle auf ein elektrisches Signal statt. Sie wird durch eine Auslenkung von Stereozilien nach einem Schallsignal eingeleitet. Dies führt zum Kalium ( $K^+$ )-Einstrom in die Zelle und zur Depolarisation. In deren Folge strömen Kalzium ( $Ca^{2+}$ )-Ionen in die Haarzelle, und Transmitter werden am unteren Pol der Zelle freigesetzt. Die erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zu einer erhöhten Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -

Kanälen, und eine Repolarisation beginnt (Geisler, 2006). Ausgehend von dieser Kaskade sind für die Entstehung von Hörstörungen von besonderer Bedeutung:

- a) Störungen der Stereozilien und ihrer Verbindungen (Tip-Links),
- b) Störung der  $K^+$ -Kanäle,
- c) Veränderung der Glutamat-Ausschüttung.

### **1.2.1. Störungen der Stereozilien und Tip-Links**

Tip-Links sind feine, extrazelluläre Filamente, die benachbarte Stereozilien miteinander verbinden und auf direktem Weg Transduktionskanäle an der Spitze der Stereozilien öffnen oder schließen. Eine Bewegung in Richtung der längsten Reihe der Stereozilien führt zu einer Dehnung der Tip-Links und Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle auf 100 %. Eine Bewegung in Richtung der kürzesten Reihe der Stereozilien führt zur Entlastung der Tip-Links und zum vollständigen Schließen der Transduktionskanäle. In Ruhelage besteht durch die Restspannung der Tip-Links immerhin noch eine Öffnungswahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle von 10 % (Meyer und Gummer, 2000). Dies kann auch als Korrelat für das so genannte Grundrauschen interpretiert werden. Die Restspannung der Tip-Links wird über das Protein Myosin-VIIa gewährleistet (Kros et al., 2002). Bei Mutationen von Myosin-VIIa werden durch den Verlust der Restspannung die Transduktionskanäle erst bei Auslenkungen von 150 nm langsam eröffnet (Kachar et al., 2000), wodurch Hörstörungen bis hin zum Usher-Syndrom Typ Ib (hochgradige Innenohrschwerhörigkeit, Retinopathia pigmentosa, Störung des Vestibularorgans) hervorgerufen werden können (Resendes et al., 2001).

Bei längerfristiger Abbiegung der Stereozilien setzt ein Adaptationsmechanismus ein. Dann gleitet die Insertionsstelle zur Basis des Tip-Links, wodurch dieser entspannt wird, und die Transduktionskanäle schließen sich. Damit nimmt die Steifigkeit des Haarbündels ab. Ein gegenteiliger Effekt tritt auf, wenn die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration absinkt.

Dann wird die Insertionsstelle des Tip-Links aktiv zurück zur Spitze des Tip-Links geschoben (Holt und Corey, 2000).

Der Verlust der Tip-Links, z.B. durch Lärmeinwirkung, führt bei den äußeren Haarzellen (ÄHZ) zu permanent geöffneten Transduktionskanälen (Meyer et al., 1998). Es kommt zur Dauerdepolarisation, und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt an. Die Folgen sind eine Dauerkontraktion mit Verringerung der cochleären Verstärkerfunktion und eine Verformung des Cortischen Organs, was für die Entstehung von Hörstörungen eine Rolle spielen kann.

Der Verlust der Tip-Links führt bei den inneren Haarzellen (IHZ) ebenfalls zur Dauerdepolarisation und zum Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies bewirkt bei den IHZ eine vermehrte Transmitterfreisetzung und Bildung von Aktionspotentialen, die im Gehirn als Tinnitus wahrgenommen werden können (Meyer und Gummer, 2000). Gleichzeitig kann der Neurotransmitter Glutamat auch exzitotoxisch auf die afferenten Fasern wirken, d. h., es kommt zur Degeneration der Neuronen.

### **1.2.2. Störung der Kalium-Kanäle**

Eine Störung der Transduktion kann neben Stereozilien- und Tip-Link-Schäden auch durch Veränderungen der Ionenkanäle an den Haarzellen hervorgerufen werden.

Die IHZ besitzen mindestens zwei, die ÄHZ mindestens drei Arten von  $\text{K}^+$ -Kanälen (Housley und Ashmore, 1992; Kros und Crawford, 1990). Unter den  $\text{K}^+$ -Kanälen kommt dem KCNQ4-Kanal eine besondere Bedeutung zu. Beisel et al. (2000) konnten zeigen, dass dieser  $\text{K}^+$ -Kanal in IHZ und ÄHZ exprimiert wird. Mutationen des KCNQ4-Kanals führen zu Taubheit und Epilepsie. Bei einigen Mutationen dieses Kanals ist auch Tinnitus beschrieben worden (Coucke et al., 1999; Kubisch et al., 1999). Der KCNQ4-Kanal wird diskutiert als der Kanal, der zur Prävention von progressivem Hörverlust und möglicherweise zur Tinnitusbehandlung beeinflusst werden könnte (Kubisch et al., 1999).

### 1.2.3. Veränderung der Glutamat-Ausschüttung

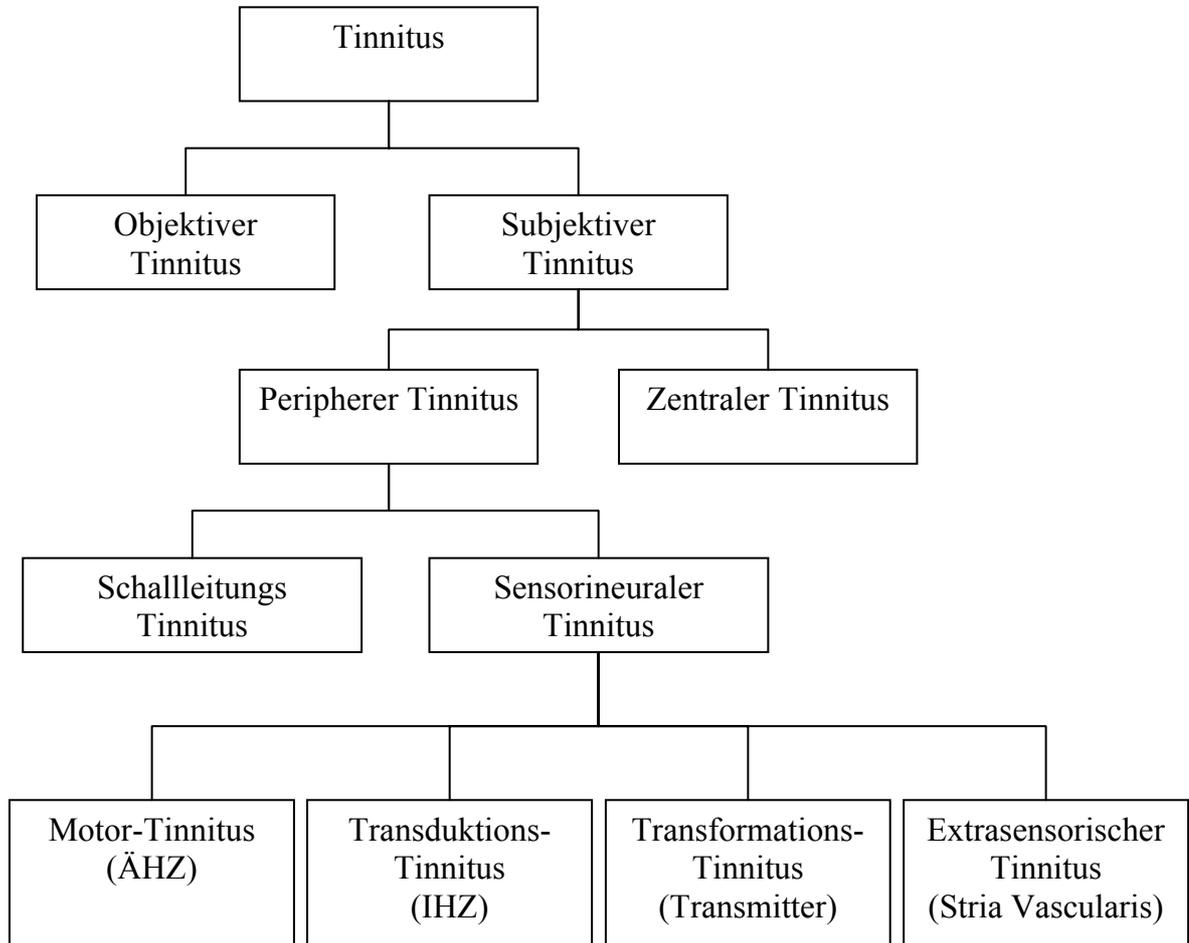
Weitere Möglichkeiten zur Entstehung von Hörstörungen bei der Signaltransduktion sind Störungen im synaptischen Komplex. Die IHZ ist zu 90 % mit myelinisierten Typ I-Neuronen afferent versorgt. Die Efferenzen bilden synaptische Dendriten zu den Afferenzen. Die ÄHZ ist nur zu 5 % afferent versorgt mit unmyelinisierten Typ II-Neuronen. Sowohl die Afferenzen als auch die Efferenzen ziehen bei der ÄHZ zum Zellkörper. Transmitter von Afferenzen ist das Glutamat, von Efferenzen sind es Acetylcholin (ACH), Gammaaminobuttersäure (GABA), Dopamin und noch weitere (Raphael und Altschuler, 2003). Es wird diskutiert, dass Glutamat nicht der einzige afferente Transmitter sein kann (Housley et al., 1999). In diesem Zusammenhang werden Adenosintriphosphat (ATP) Modulierungsfunktionen als Transmitter zugeordnet. Kürzlich sind in der IHZ ellipsenartige Körper, die mit ca. 100 synaptischen Bläschen in enger Verbindung stehen, entdeckt worden. Diese so genannten „Ribbons“ sollen eine kontinuierliche langsame Transmitter-Ausschüttung gewährleisten und besonders effizient bei langen Stimuli arbeiten (Fuchs et al., 2003). Während an den ÄHZ der direkte Glutamat-Rezeptor-Nachweis noch fehlt, sind die Glutamat-Rezeptoren der IHZ gut erforscht (Puel et al., 2002a). Es werden zwei Arten von Glutamat-Rezeptoren unterschieden: die ionotropen und die metabotropen. Die ionotropen Rezeptoren sind mit dem Einstrom von 1- oder 2-wertigen Kationen verbunden und werden in [alpha]-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-, N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und Kainat-Rezeptoren unterteilt. Unter normalen Bedingungen besitzt der AMPA-Rezeptor die größte Aktivität (Puel et al., 2002a). Die metabotropen Rezeptoren entfalten ihre Wirkung über G-Proteine. An den IHZ wurden auch präsynaptische Glutamat-Rezeptoren nachgewiesen, deren Funktion aber noch unklar ist (Matsubara et al., 1996). Pujol et al. (1990) berichteten darüber, dass nach einem Schalltrauma vermehrte Glutamat-Ausschüttung nachweisbar ist, die mit einer

Dendritenschwellung einhergeht. Dieselben Effekte wurden mit Glutamat-Analoga erzeugt, sie konnten mit Glutamat-Antagonisten wie z. B. MK 801 gehemmt werden. Es wird angenommen, dass es über die NMDA-Rezeptoren zu einem exzessiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) kommen kann (Ehrenberger und Felix, 1995). AMPA- und Kainat-Rezeptoren bewirken über den Natrium ( $\text{Na}^+$ )- und Wassereinstrom eine Zellschwellung. Zusätzlich kann die Zelle über die Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des endoplasmatischen Retikulums geschädigt werden.

#### **1.2.4. Tinnitus**

Tinnitus ist definiert als subjektive Wahrnehmung eines Geräusches bei Fehlen einer äußeren Geräuschquelle. In der Regel geht Tinnitus mit einer Hörstörung einher, kann aber auch als unabhängiges Symptom auftreten. Prinzipiell können ein *objektiver* und ein *subjektiver* Tinnitus unterschieden werden (Zenner, 1998). Der objektive Tinnitus, der sowohl vom Patienten als auch vom Untersucher wahrgenommen wird, ist in der Regel einer eindeutigen Diagnostik und Therapie zugänglich. Der viel häufigere subjektive Tinnitus wird nur vom Patienten wahrgenommen und wird in eine *periphere* Form (Schalleitungstinnitus und sensorineuraler Tinnitus) sowie in eine *zentrale* Form eingeteilt. Um mögliche Mechanismen der Entstehung des peripheren sensorineuralen Tinnitus zu betonen, hat Zenner diese eingeteilt in den Motor-Tinnitus (Typ I), Transduktions-Tinnitus (Typ II), Transformations-Tinnitus (Typ III) und den extrasensorischen Tinnitus (Typ IV) unterteilt (Zenner, 1998). Während beim Motor-Tinnitus Störungen im Bereich der ÄHZ angenommen werden, ordnet man dem Transduktions-Tinnitus Störungen der IHZ zu. Beim Transformations-Tinnitus werden Störungen im Bereich der Transmitterausschüttung angenommen. Störungen im Bereich Stria vascularis oder der Gefäße der Cochlea werden als Ursache für den extrasensorischen

Tinnitus vermutet (Schema 1). Der experimentelle Nachweis dieser verschiedenen Formen steht noch aus.



**Schema 1** Tinnitusklassifizierung

Wie könnte Tinnitus im synaptischen Komplex entstehen? Puel et al. (2002b) beschrieben nach einem akustischen Schaden eine Zunahme von mRNA („messenger ribonucleic acid“) für NMDA-Rezeptoren und metabotrope Rezeptoren. Die vermehrte Ausschüttung von ACH, GABA und Dopamin über die Efferenzen soll über einen m3-cholinergen Rezeptor zur Überexpression von Glutamat-Rezeptoren und zu massiver Glutamat-Ausschüttung führen, die z.B. über vermehrte Aktionspotenziale Tinnitus

bewirken kann. Gleichzeitig wirkt die Glutamat-Ausschüttung anfänglich als trophischer Faktor und führt zum Heranwachsen der Efferenzen an den Zellkörper der IHZ.

### **1.3. Hypoxie und Ischämie**

Hypoxie bedeutet Sauerstoffmangel im Gewebe. Sie wird hervorgerufen durch eine Störung im Verhältnis von Sauerstoff-Angebot und Sauerstoff-Verbrauch. Hierbei kommt es zu einem Abfall des  $pO_2$  im Gewebe. Ischämie hingegen beinhaltet eine verminderte Durchblutung im Gewebe. Insgesamt ist Ischämie ein viel komplexerer Vorgang als Hypoxie, da unterschiedliche Substrate vermindert bereitgestellt und Stoffwechselprodukte nicht ausreichend eliminiert werden. Ischämie führt in der Regel auch zu schwereren Schäden als Hypoxie, da durch den Substrat- bzw. Glukosemangel die anaerobe Glykolyse beeinträchtigt ist (Gross, 2005).

Die akute Reaktion auf Hypoxie ist besonders an  $pO_2$ -sensitiven Zellen ausgeprägt (Gross, 2005). In diesen Zellen befinden sich in den Membranen sauerstoffsensitive  $K^+$ -Kanäle, die bei Hypoxie gehemmt werden und zur Membrandepolarisation führen. Die Folgen sind  $Ca^{2+}$ -Einstrom, Neurotransmitterfreisetzung und Aktivierung afferenter Fasern, Mitochondrien-Dysfunktionen und Umschaltung auf anaerobe Glykolyse. Anders hingegen bei der chronischen Hypoxie; diese ist mit einer Veränderung der Genexpression verbunden (Gross, 2005). Im Innenohr ist sowohl mit dem Auftreten von akuter als auch chronischer Hypoxie zu rechnen.

#### **1.3.1. Die Rolle von HIF-1**

Der wichtigste Regulator der Genexpression bei Anpassung an eine Hypoxie/Ischämie ist der Transkriptionsfaktor HIF-1, dessen Aktivität über molekularen Sauerstoff und spezifische Prolinhydroxylasen reguliert wird (Semenza, 1999; Wenger und Gassmann,

1997; Wiesener und Maxwell, 2003). HIF-1 gehört zur Familie der bHLH-PAS-Proteine (Basische Helix-Loop-Helix- und PER-ARNT-SIM-Homologie-Domäne). Prinzipiell sind Transkriptionsfaktoren Proteine, welche die Anbindung der RNA-Polymerasen an den Promotor eines Gens und damit die RNA-Synthese regulieren. HIF-1 ist ein Heterodimer, das aus HIF-1 alpha und HIF-1 beta besteht. HIF-1 beta ist identisch mit ARNT („aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“), einem Protein, das als Dimerisierungspartner für verschiedenste Proteine auftritt (Semenza, 1999). HIF-1 alpha ist beim Menschen auf dem Chromosomen 14q21-q24 lokalisiert. Es besteht aus 15 Exons, die von 14 Introns unterbrochen werden (Iyer et al., 1998).

In den letzten Jahren sind weitere HIF-Transkriptionsfaktoren gefunden worden, HIF-2 alpha und HIF-3 alpha (Gu et al., 1998; Tian et al., 1998). Beide dimerisieren ebenfalls mit ARNT. Es wird vermutet, dass HIF-1 alpha eher eine allgemeine Rolle in der Hypoxiesignalkette und Transkription spielt, während HIF-2 alpha und HIF-3 alpha mehr spezialisierte Funktionen übernehmen. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass HIF-1 alpha und HIF-1 beta in den meisten Geweben exprimiert werden, während HIF-2 alpha und HIF-3 alpha ein eher begrenztes, organspezifisches Expressionsmuster zeigen (Eckardt et al., 2003; Kietzmann et al., 2001).

Die Transkription von HIF-1 alpha erfolgt in der Regel unabhängig von Hypoxie. Bei chronischen hypoxischen Zuständen wurde aber eine erhöhte Transkription beschrieben (Semenza, 2000). Die Transkription von HIF-1 alpha lässt sich über Kinasen, Insulin, Wachstumsfaktoren („Insulin-like growth factor“, IGF-1) und Nervenwachstumsfaktoren (NGF) modulieren (Gross, 2005). Hervorzuheben ist, dass die HIF-1 alpha-mRNA-Expression und Proteinexpression nicht parallel verlaufen. Die generelle Aussage, dass die Proteinsynthese unter hypoxischen Bedingungen vermindert ist, trifft für die Synthese von HIF-1 alpha und ARNT nicht zu (Gorlach et al., 2000).

Die Regulation des HIF-1 alpha-Proteingehaltes erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System. Die Aktivität von HIF-1 alpha ist unter normoxischen Bedingungen aufgrund des ständigen Abbaus im Proteosom extrem niedrig. Unter hypoxischen Bedingungen werden der Abbau gehemmt und HIF-1 alpha stabilisiert (Ivan et al., 2001). HIF-1 alpha gelangt dann in den Zellkern und bildet dort nach Bindung mit HIF-1 beta den HIF-1-Komplex. Nach Bindung an den Promotor wird die Zielgenexpression eingeleitet. Der begrenzende Faktor für die HIF-1-Aktivität ist der zelluläre Gehalt von HIF-1 alpha. Bei einer Hypoxieexposition mit weniger als 6 % Sauerstoff-Gehalt steigt die HIF-1-alpha-Expression exponentiell an (Jiang et al., 1996). Der Vorteil der Regulation von HIF-1 alpha über den Abbau ist, dass der für die Hypoxie notwendige Adaptationsfaktor sofort zur Verfügung steht und nicht erst unter Energieverbrauch synthetisiert werden muss. Zu den HIF-1-Zielgenen gehören Gene, deren Produkte an der Regulation des Energiestoffwechsels, des Zelltodes, der Angiogenese, der Erythropoese, der Zellproliferation und des Katecholaminstoffwechsels beteiligt sind (Gross, 2005). Um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren, bindet HIF-1 an „hypoxia response element“ (HRE) Sequenzen des Promotors. Darüber hinaus ist ein Multiprotein-Komplex nötig, der neben HIF-1 mindestens aus einem benachbarten Transkriptionsfaktor und P300/CREB besteht. In der carboxy-terminalen Hälfte des HIF-1 alpha befinden sich zwei Transaktivierungsdomänen (TAD-N und TAD-C), über die unter Hypoxie die Co-Aktivatoren wie p300, CBP, SRC-1 und TIF 2 wirken. Dabei ist der Redoxzustand von TAD-C für die Interaktion von HIF-1 alpha und CBP/p300 zuständig (Jiang et al., 1997). Auch unter normoxischen Bedingungen können divalente Ionen wie Cobaltchlorid und Eisenchelatoren wie Desferrioxamin über eine Interaktion mit TAD-C eine HIF-Aktivierung bewirken (Wang und Semenza, 1993).

### **1.3.2. Die Wirkung von Hypoxie und Ischämie in der Cochlea**

Der cochleäre Hauptenergielieferant ist Glukose, die im Citratzyklus und in der Atmungskette vollständig zu ATP, Wasser und Kohlendioxid umgesetzt wird (Puschner und Schacht, 1997b; Tian et al., 1998). Der größte Teil der für die Zellfunktion der Cochlea benötigten Energie wird aus der aeroben Glykolyse und der anschließenden oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette gewonnen. Die Bereitstellung der Glukose erfolgt über das vaskuläre System der Cochlea und die Glukosetransporter (GLUT) (Ferrary et al., 1987; Ito et al., 1993). GLUT 1 spielt bei der Überwindung der Blut-Perilymph-Schranke eine bedeutende Rolle (Ito et al., 1993). So ist GLUT 1 vorwiegend in den Marginalzellen der Stria vascularis nachgewiesen, wo er den Glukosetransport in das intrastriale Kompartiment und damit an die Haarzellen vermittelt. Ein weiterer insulinunabhängiger Carrier, GLUT 5, ließ sich an den ÄHZ nachweisen (Geleoc et al., 1999; Nakazawa et al., 1995).

Da Glykolyse und oxidative Phosphorylierung die Hauptwege der ATP-Bildung in der Cochlea sind, haben Hypoxie und Ischämie einen starken Einfluss auf den cochleären Energiemetabolismus. In Anoxie kommt es innerhalb von Sekunden zum Absinken des endocochleären Potentials (Konishi et al., 1961). Eine Ursache dafür könnte der hohe Sauerstoffbedarf der Stria vascularis sein. Während der ATP Spiegel in der Endolymphe während Hypoxie konstant bleibt und infolge Lärmbelastung sogar ansteigt (Munoz et al., 2001), führt Ischämie zum Absinken des ATP-Spiegels im Organ Corti bis auf 10 % des Normalwertes und die endocochleären Prozesse kommen zum Erliegen (Thalman et al., 1972). Da ATP intrazellulär überwiegend als Energielieferant von Ionenpumpen wirkt, beeinflusst ein ATP-Abfall vor allem die Aufrechterhaltung der funktionsbestimmenden Ionengradienten. ATP scheint aktiv in die Endolymphe sezerniert zu werden, wahrscheinlich ist es an der Regulation des endocochleären Potentials beteiligt (Munoz et al., 2001).

An isolierten ÄHZ konnte gezeigt werden, dass der ATP-Gehalt der Zellen bei reinem Glukoseentzug um 25 % sinkt, bei Hemmung der Glykolyse, Glykogenolyse und Glukoneogenese mittels der 2-Deoxy-Glukose-Methode sogar um 65 % (Puschner und Schacht, 1997b). Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass freie oder als Glykogen gespeicherte Glukose der Hauptlieferant für die Energie der ÄHZ ist. Da kein 100 %iger ATP-Abfall zu verzeichnen war, ist anzunehmen, dass auch andere Energie liefernde Substrate wie Kreatinphosphat, Aminosäuren und Ketonkörper existieren.

Die Besonderheit der Gefäßversorgung der Cochlea scheint von großer Wichtigkeit für hypoxische und ischämische Schädigungen der Cochlea zu sein. Die Regulation der Durchblutung in der Cochlea ist sehr fein abgestimmt und funktionelle Störungen haben eine große Auswirkung. Die arterielle Versorgung erfolgt über die Arteria cerebelli inferior anterior aus der Arteria basilaris weiter über die Arteria labyrinthi (Lyon und Payman, 2000). Von besonderer Bedeutung ist, dass die weitere periphere Versorgung der Cochlea in Form von verschiedenen funktionellen Endarterien erfolgt. Die Hauptversorgung (bis auf den basalen Teil der Cochlea über die Arteria vestibulocochlearis) erfolgt über die Arteria spiralis modioli. Weitere wichtige Gefäße sind die Stria vascularis und die Prominentia spiralis. So erfolgt bei experimenteller Unterbindung der Modiolusgefäße ein Verlust der Haarzellen, nicht jedoch eine Schädigung der Stria vascularis. Bei Perfusionsstörungen der Stria dagegen degeneriert diese ohne Untergang der Sinneszellen. Bei Durchtrennung der Arteria labyrinthi kommt es dann zur fast vollständigen Degeneration des Innenohres (Kiesewetter et al., 1988; Lehnhardt, 1994). Aufgrund der Nerveninnervation lässt sich das Gefäßsystem der Cochlea in einen *medialen*, sympathisch innervierten und in einen *peripheren* Bereich ohne sympathische Innervation einteilen (Nakashima et al., 2003). Beim peripheren Anteil, dem Bereich der Stria vascularis und Prominentia spiralis, könnten demnach die Endothelzellen, die Perizyten, das NO-System und ET-1 von besonderer Relevanz sein.

Eine Hörstörung, bei der Hypoxie und Ischämie besonders diskutiert werden können, ist die Altersschwerhörigkeit. Ausgehend von audiologischen und histologischen Befunden hat Schuknecht (1955; 1964) vier Grundtypen von Altersschwerhörigkeit herausgearbeitet.

- Der sensorische Typ mit Haarzelldegeneration und Hochttonabfall.
- Der neurale Typ mit überwiegender Ganglienzelldegeneration und schlechtem Sprachverstehen.
- Der metabolische Typ mit Atrophie der Stria vascularis.
- Der Innenohr-Schalleitungstyp mit Versteifung der Basilarmembran.

Das morphologische Korrelat dieser Störung ist neben Atrophie und Schwund von Haarzellen eine Degeneration von Ganglien- und Nervenfasern sowie eine Atrophie des Ligamentum Spirale und der Stria vascularis (Übersicht in Beck, 1984). Für die Altersschwerhörigkeit spielen aber hypoxisch/ischämische Ursachen, hervorgerufen durch kardiovaskuläre Erkrankungen mit der Folge von Arteriosklerose sowie Hypercholesterinämie, eine nicht zu unterschätzende Rolle. Kardiovaskuläre Erkrankungen haben zwar keineswegs immer einen nachweisbaren Einfluss auf die Hörfunktion, jedoch konnte in ausgeprägten Fällen eine überproportional schlechte Sprachdiskrimination festgestellt werden (Bohme, 1987). Insgesamt scheint für das Innenohr der Grad der mikrovaskulären Schädigung bedeutsamer zu sein als ein partieller Verschluss der zuführenden zentralen Gefäße. Neben diesen nicht genetischen Faktoren kommt auch den genetisch determinierten Komponenten eine Rolle zu (Nelson und Hinojosa, 2006).

Hypoxie und Ischämie werden auch als Ursache für die Entstehung von Tinnitus diskutiert. Hinsichtlich der von Zenner (1998) ausgeführten Tinnituseinteilung scheinen Hypoxie und Ischämie besonders für alle sensorineuralen Tinnituserstehungstypen eine Rolle zu spielen. In Tabelle 1 sind wesentliche molekulare Prozesse, die durch Hypoxie/Ischämie beeinflusst werden können, zusammengestellt. Betrachtet man den Motor-Tinnitus, so kann z. B. der Einfluss von Hypoxie/Ischämie zur Modifikation der

Ca<sup>2+</sup>-Homeostase und Bildung von oxidativen freien Radikalen („reactive oxygen species“/ROS) führen. Im subakuten und chronischen Stadium ist beim Motor-Tinnitus weiterhin eine Modifikation der Prestin-Expression diskutierbar.

<b>Tabelle 1</b> Rolle von Hypoxie/Ischämie für den neurosensorischen Tinnitus (Mazurek et al., 2006).			
Klassifikation des Tinnitus nach Zenner (Zenner, 1998)	<b>Motor-Tinnitus</b>	<b>Transduktions- und Transformations-Tinnitus</b>	<b>Extrasensorischer Tinnitus</b>
Morphologisches Korrelat	ÄHZ	IHZ, Spiralganglion	Stria vascularis, Gefäße der Cochlea
Molekulare Prozesse	Amplifikation der Schall induzierten Vibration der ÄHZ (Prestin)	Signaltransduktion (Glutamat, GABA, Dopamin)	Endocochleäres Potenzial, Ionenkanäle
Störungen durch Hypoxie/Ischämie Akut	Modifikation der Ca <sup>2+</sup> -Homeostase, ROS-Bildung	Depolarisation, Erhöhte Glutamatfreisetzung, Zelltod (Apoptose/Nekrose), ROS-Bildung	Autoregulation der Durchblutung, Verformbarkeit der Erythrozyten
Subakut/chronisch	Modifikation der Expression von Prestin, Zelltod	Expression von NMDA-Untereinheiten, Veränderte NOS-Expression	Expression von NOS und ET-1

Im Bereich des Transduktions- und Transformations-Tinnitus können Hypoxie und Ischämie eine Dauerdepolarisation bewirken. Über eine erhöhte Glutamatfreisetzung und Aktivierung von NMDA-Rezeptoren kann dies über Apoptose und Nekrose zum Zelltod führen. Diese glutamaterge Exzitotoxizität wurde zunächst bei Ischämie von Geweben im ZNS beobachtet (Mrsulja et al., 1978). Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen führt die exzessive Glutamatausschüttung über die Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren zur veränderten Permeabilität von Ionenkanälen (Übersicht in Choi und Rothman, 1990). Dadurch strömen vermehrt Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>-Ionen in die Neurone, und es kommt zur Zellschwellung. Über die „second messenger“-Wirkung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen

erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von metabolischen Prozessen, an deren Ende der neuronale Zelltod steht (Ehrenberger und Felix, 1991; Meldrum et al., 1985; Pujol et al., 1990). Eine zentrale Bedeutung bei Hypoxie/Ischämie hat die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung wird zum einen direkt über ionotrope Glutamatrezeptoren bewirkt und zum anderen über die Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Pujol et al., 1990).

Bei dem extrasensorischen Tinnitus könnten Hypoxie und Ischämie durch die Beeinflussung der Autoregulation der Durchblutung entstehen. Diese Annahme wird durch experimentelle Untersuchungen unterstützt. So führt Lärm z. B. zur Verringerung des  $\text{pO}_2$  in der Perilymphe (Lamm und Arnold, 1996; Scheibe et al., 1992) und zur Reduzierung des cochleären Blutflusses (Scheibe et al., 1993).

### **1.3.3. HIF-1-abhängige Gene**

Hypoxie/Ischämie könnte einerseits direkt auf funktionelle Prozesse (Tabelle 1) wirken und andererseits die Expression einer Reihe von Hypoxie- bzw. HIF-1-abhängigen Genen beeinflussen, die zu akuten, subakuten bzw. chronischen Veränderungen der Durchblutung und des Signalsystems führen.

Auf zwei HIF-1-abhängige Zielgene, die einen großen Einfluss auf die Veränderung der Durchblutung in der Cochlea haben können, soll nachfolgend eingegangen werden:

a) *Endothelin-1 (Et-1)*,

b) *Induzierte Stickstoffmonoxidsynthase (iNos)*.

a) Endothelin-1 (ET-1) ist der stärkste endogen gebildete Vasokonstriktor und der Gegenspieler von Stickstoffmonoxid (NO). ET-1 ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, das in vaskulären Endothelzellen synthetisiert wird (Nakas-Icindic et al., 2004). Unter normoxischen Bedingungen wird ET-1 bereits auf der Transkriptionsebene durch NO inhibiert (Alonso und Radomski, 2003). ET-1 ist in der Cochlea (Jinnouchi, 2001) und

der Endothelin Rezeptor Typ A in der Arteria spiralis nachgewiesen worden (Scherer und Wangemann, 2002). Experimentell zeigt sich durch ET-1 ein Vasospasmus der Arteria spiralis des Modiolus (Scherer und Wangemann, 2002). Eine starke Zunahme der ET-1-Aktivität kann zu einer Vasokonstriktion im Gebiet der Stria vascularis führen. Dadurch können das endocochleäre Potenzial verändert und eine Tinnitusentstehung bewirkt werden.

b) In der Cochlea sind drei Arten von Stickstoffmonoxidsynthasen nachgewiesen worden (Förstermann et al., 1998; Heinrich et al., 2004; Hess et al., 1999): die endotheliale (eNos), die neuronale (nNos) und die induzierte (iNos). Die Stickstoffmonoxidsynthasen produzieren NO, das als kurzlebiger Botenstoff die Relaxation der glatten Muskulatur und die Regulation des Vasotonus bewirkt (Félétou und Vanhoutte, 2006). Unter Hypoxie kann es über die iNOS zur Überproduktion von Peroxiden kommen, die eine direkte toxische Wirkung auf die Gefäße haben und damit das endocochleäre Potenzial beeinflussen (Hess et al., 1999; Yamane et al., 1995). Ein weiterer NO-Wirkungsmechanismus ist der synaptische Komplex. Unter normoxischen Bedingungen wirkt NO durch Rückkopplung hemmend auf die Glutamatrezeptoren. Hypoxie, die z. B. bei akustischer Überstimulation entsteht, bewirkt eine vermehrte Glutamatausschüttung und führt an den Glutamatrezeptoren zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Ehrenberger und Felix, 1995). Durch die Aktivierung der nNOS und iNOS können Peroxide gebildet werden, die zur Zerstörung und Degeneration der afferenten Fasern führen können (Fessenden und Schacht, 1998). Durch Veränderung der Aktionspotenziale bei diesen Umbauprozessen kann ebenso Tinnitus generiert werden.

#### **1.4. Apoptose und Nekrose**

Die Abbauege der Haarzellen können prinzipiell in Apoptose und Nekrose eingeteilt werden (Lipton, 1999). Die Apoptose ist der regulierte und programmierte Zelltod. Da die

Apoptose gezielt beeinflusst werden kann, ist sie für die Medizin von besonderem Interesse. Sie ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Chromatinverdichtung und DNA-Fragmentierung. Die Phagozytose erfolgt über Makrophagen ohne Entzündungsreaktion. Die programmierte Antwort der Zelle beinhaltet eine gesteigerte Transkription und Translation, die zur Synthese bestimmter, für die Vermittlung des Zelltodes verantwortlicher Proteine, z. B. Endonukleasen, führt. Zahlreiche Gene und Genprodukte beeinflussen den Ablauf der Apoptose, wie z. B. Bcl-2, Mcl-1, Fas ligand, p53, Caspase 3. Die Apoptose verläuft in drei Phasen: die Initialphase, die Festlegungsphase und die Ausführungsphase (Gross, 2005). Der apoptotische Zelltod kann über die Färbung mit Annexin nachgewiesen werden (van Tilborg et al., 2006). Annexin bindet sich irreversibel an das Phosphatidylserin, das unter Apoptose an die Außenseite der Zellmembran gelangt. Eine spezifischere Methode zur Darstellung der apoptotischen Kerne ist ein „in situ DNA End labeling Assay“ (Gavrieli et al., 1992).

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose eine passive, nicht programmierte Form des Zelltodes. Die Nekrose führt zur Erhöhung der Permeabilität der Zytoplasmamembran mit der direkten Folge der Zellschwellung und zur Entzündungsreaktion. Der Nachweis geschädigter Zellmembranen kann über die Färbung mit Propidiumjodid erfolgen, daher wird dieser Farbstoff zum Nachweis der Nekrose eingesetzt. Propidiumjodid bindet sich an die DNS im Zellkern (Lipton, 1999).

Hypoxie/Ischämie kann sowohl über Nekrose als auch Apoptose zum Zelltod führen (Beilharz et al., 1995). In der Initialphase der hypoxisch induzierten Apoptose fällt die intrazelluläre ATP-Konzentration ab, und es kommt zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, zur Aktivierung von Caspase 9 und zur Expression von spezifischen Rezeptoren. Die Festlegungsphase ist durch das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Faktoren gekennzeichnet. Interessanterweise aktivieren HIF-1 und Hypoxie beide Typen von Faktoren, und nur die jeweiligen konkreten Bedingungen wie Zelltyp,

Dauer und Schweregrad der Hypoxie entscheiden, ob es zur Protektion oder zum Zelltod kommt. Die Apoptose wird über die Stabilisierung von p53 und die Aktivierung von Nip3 beeinflusst. Nip3 programmiert die Zelle für eine hypoxieinduzierte Apoptose (Bruick, 2000). Sowohl Nip3 als auch p53 sind HIF-1-abhängige Gene (Blagosklonny et al., 2001; Bruick, 2000). Damit erfolgt durch HIF-1 auf zellulärer Ebene nicht nur die Transaktivierung von Versorgungsgenen zum Überleben der Zelle, sondern auch von Genen, die den Zelltod einleiten. Gleichzeitig leitet HIF-1 auch die Apoptose derjenigen Zellen ein, die zu einer suffizienten Adaptation nicht mehr fähig sind (Gross, 2005).

Es ist bekannt, dass die Apoptose durch verschiedene Wachstumsfaktoren unterdrückt wird, z.B. „nerve growth factor“ (NGF), „insulin-like growth factor“ und „epidermal growth factor“. In den auditorischen Neuronen führt die Wegnahme von neurotrophischen Faktoren wie NGF zum kompletten apoptotischen Zelltod der Neurone (Kew et al., 1996). Cisplatin führt ebenfalls zu einem apoptotischen Zelltod der sensorischen Zellen und Neurone des auditorischen Systems (Lefebvre et al., 2002). In verschiedenen Experimenten konnte nach Lärmbelastung bei den ÄHZ eine DNA-Kondensation und Fragmentation als Zeichen einer Apoptose sowie Schwellung der Zellkerne als Zeichen der Nekrose festgestellt werden (Hu et al., 2000; Hu et al., 2002). Über den Einfluss von Hypoxie und Ischämie auf die Art des Zelltodes im auditorischen System ist jedoch wenig bekannt.

## **1.5. Prestin**

Ein interessantes Molekül für die Funktion der äußeren Haarzelle (ÄHZ) ist Prestin, das auch als Motorprotein der ÄHZ bezeichnet wird (Zheng et al., 2000). Die ÄHZ können ihre Länge bis zu 5 % verändern (Ashmore, 1987; Kachar et al., 1986). Auf Depolarisation reagieren ÄHZ mit einer Verkürzung (Kontraktion) und auf Hyperpolarisation mit einer Verlängerung (Elongation) ihres Zellkörpers (Zenner et al., 1985; Zimmermann und

Fermin, 1996). Dabei werden 2 Formen unterschieden: eine „schnelle Form“ der Längenänderung als Antwort auf akustische Stimulation und eine „langsame Form“ (Puschner und Schacht, 1997a; Zenner et al., 1988), die Sekunden bis Minuten dauert und *in vitro* über die Erhöhung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgerufen wird. Die „schnelle Form“ der Längenänderung ist unabhängig von ATP oder  $\text{Ca}^{2+}$  (Puschner und Schacht, 1997a; Zenner, 1986). Prestin befindet sich in der Außenwand der Zellmembran der ÄHZ „intramembranös“ und wird nicht in den inneren Haarzellen exprimiert. Das Zytoskelett der ÄHZ ist aus Aktinfilamenten und querverlaufenden Spectrinfilamenten aufgebaut und über Ankerproteine mit der Plasmamembran und damit mit Membranproteinen wie Prestin verbunden (Sziklai et al., 2003). Das Protein Prestin ist durch 12 Transmembrandomänen gekennzeichnet. Auf der zweiten Transmembrandomäne befindet sich die Sulfat-Transport-Bindungsstelle. Das Protein besteht aus 744 Aminosäuren, wobei sich das N- und C-terminale Ende im Zytoplasma befinden (Adler et al., 2003; Dallos und Fakler, 2002). Über eine antikörperspezifische Markierung ist Prestin besonders hoch in der lateralen Plasmamembran der ÄHZ nachzuweisen (Belyantseva et al., 2000). Es ist interessant, dass auch menschliche Nierenzellen in Kultur, die mit Prestin transfiziert wurden, eine spannungsinduzierte Zellveränderung und eine spannungsabhängige Kapazität wie die ÄHZ zeigen (Zheng et al., 2000).

Prestin ist in der Rattencochlea einige Tage nach der Geburt bereits nachweisbar (Belyantseva et al., 2000). Die strukturelle und funktionelle Reifung des Cortischen Organs und das Erscheinen der ÄHZ-Elektromotilität erscheinen erst zwei Wochen nach der Geburt (He et al., 1994; Ludwig et al., 2001).

Mittlerweile ist auch das zugehörige Gen „Pres“ bekannt. Es gehört zu der Gruppe der Sulfat-Anionen-Austauscher ähnlichen Proteine (SLC 26) wie auch das Gen für das Protein Pendrin, das für das Pendred Syndrom verantwortlich ist. Das Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosomen 7 beim Menschen und des Chromosomen 5 bei der Maus

und enthält „thyroid response elements“ im 1. Intron (Weber et al., 2002). Bei Abwesenheit von Schilddrüsenhormonen konnte eine Reduzierung von Prestin mRNA und Prestin Protein nachgewiesen werden (Weber et al., 2002). Bis jetzt sind einige Mutationen des Gens nachgewiesen worden, die zu einem nichtsyndromalen Hörverlust führen (Liu et al., 2003).

Haarzellantworten beim Meerschweinchen sind bis zu 70 kHz nachgewiesen worden (Frank et al., 1999). Die Zellmembran besitzt jedoch ein so genanntes Tiefpassverhalten, so dass es ab 1000 Hz zur Abschwächung von elektrischen Stimuli kommt (Preyer et al., 1996). Chlorid-Ionen wirken für das Motorprotein Prestin als Sensor. Chlorid-Ionen binden sich an den zytoplasmatischen Bindungsort in Abhängigkeit von der elektrischen Spannung. Bei einer Hyperpolarisation werden Chlorid-Ionen gebunden, das Prestin-Molekül vergrößert seine Fläche, und die Haarzelle elongiert (Dallos und Fakler, 2002). Ein zweiter Regulationsmechanismus der Motorik der ÄHZ erfolgt über die efferente Rückkopplung. Bei Acetylcholin (ACH)-Freisetzung nehmen Steifigkeit der ÄHZ ab und damit deren Motilität zu. ACH bewirkt über einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg die Phosphorylierung von Proteinen wie Fodrin und Ankyrin. Die veränderte Geometrie der Proteine bewirkt eine Abschwächung der Verbindung zur Plasmamembran und führt zu einer Verringerung der Steifigkeit (Dallos et al., 1997).

Im Hinblick auf die Entstehung des „Motor-Tinnitus“ sind zwei Ansatzpunkte denkbar. Substanzen, die um die Chlorid-Bindungsstellen von Prestin konkurrieren (Oliver et al., 2001), wie z. B. Aspirin, können die Elektromotilität blockieren und über eine „Hypomotilität“ zum Tinnitus führen. Andererseits können Substanzen, die in die efferente Rückkopplung eingreifen oder eine erhöhte efferente Rückkopplung bewirken, zu einer „Hypermotilität“ führen.

## 1.6. Microarray

Die unterschiedlichen Zellen, Gewebe und Organe eines Organismus sind durch spezielle morphologische und funktionelle Unterschiede gekennzeichnet. Dabei beruhen diese funktionellen Unterschiede im Wesentlichen auf einer zelltypischen Genexpression. Die differenzielle Genexpression stellt damit die treibende Kraft in der Entwicklung, Differenzierung, Regeneration und Plastizität von Geweben und Organen dar. Kenntnisse der Genexpression im Ohr spielen eine wichtige Rolle, da nur so die molekularen Mechanismen des Hörens besser verstanden sowie innovative Strategien zur Prävention des cochleären Hörverlustes entwickelt werden können.

Durch die Entwicklung der Microarray-Technik ist eine umfassende Analyse der Genexpression auf mRNA- und Proteinebene möglich. Da mit einer einzigen Untersuchung mehrere 1000 Gene gleichzeitig untersucht werden können, bietet diese Technik besonders gute molekulare Einblicke in Pathomechanismen wie z. B. Hypoxie und Ischämie. Das dieser Technik zugrunde liegende Prinzip besteht darin, DNA-Fragmente bekannter und unbekannter Gene auf einem Chip zu fixieren und mittels Hybridisierung die entsprechende mRNA zu identifizieren und zu quantifizieren. mRNA wird aus dem Versuchsgewebe isoliert und mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Nach *in vitro* Transkription wird die cRNA mit radioaktivem ATP oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (s. Abb. 2, S. 39). Anschließend erfolgt die Hybridisierung markierter cRNA mit ihren komplementären Sequenzen auf dem DNA-Chip. Die Intensität der radioaktiven Signale bzw. Fluoreszenzsignale ermöglicht eine quantitative Aussage der Expressionsmuster in Relation zum Referenzwert (Brown und Botstein, 1999; Stover et al., 2004). Damit erhält man Momentaufnahmen komplexer Expressionsmuster, die für die Klassifikation, Früherkennung und Prognose von Schädigungen geeignet sind.

Die Anwendbarkeit der Microarray-Technik ist dadurch begrenzt, dass eine Mindestzellzahl benötigt wird. Die Sensitivität liegt bei ca. 5-10 mRNA-Kopien pro Zelle (Kane et al., 2000; Svaren et al., 2000). Zwischenamplifikationsschritte gehen zu Lasten der Spezifität. Das Problem, dass nur bekannte Sequenzen untersucht werden können, wird mit dem Fortschreiten der entsprechenden Genomprojekte relativiert.

Ungefähr 30.000-40.000 Gene existieren in der humanen genetischen DNA. Ungefähr 5-10 % dieser Gene werden im Ohr exprimiert (Lin et al., 2003). Einige dieser Gene werden in der Entwicklungsphase exprimiert und postnatal inaktiviert. Andere Gene werden nur im ausgereiften Ohr exprimiert. Mit Hilfe der Microarray-Technik können erstmals die geringen Mengen Innenohrgewebe zur detaillierten Untersuchung gelangen.

Erste Anwendungen der Microarray-Technik in der Innenohrforschung erfolgten zur Untersuchung der Genexpressionsmuster während der Innenohrentwicklung der Maus (Chen und Corey, 2002b), zur Erstellung eines Genexpressionsprofils des Mittel- und Innenohres der Ratte (Lin et al., 2003) sowie zur Charakterisierung der Immorto-Maushaarzelllinie UB/OC-1 (Rivolta et al., 2002). Interessant ist die Studie von Cho et al. (2002), welche die Unterschiede der Genexpression zwischen Nucleus cochlearis und Colliculus inferior sowie Organ Corti und Modiolus untersuchte. Dabei zeigten ca. 20-30 % der insgesamt 558 analysierten Gene eine signifikante Expression in einzelnen untersuchten Regionen. Die Autoren bezeichneten eine doppelte Erhöhung der Signale gegenüber dem Grundrauschen als signifikante Expression. Dabei wurden deutliche Unterschiede in der Genexpression des ZNS und der Cochlea festgestellt. Eine andere Arbeitsgruppe (Chen und Corey, 2002a) untersuchte die Genexpression im Innenohr mittels Genchip mit 13.000 bekannten und 20.000 EST/“expressed sequence tag“ Clustern. Morris et al. (2005) untersuchte die Genexpression von Organ Corti, Stria vascularis und Spiralganglion. Ca. 22 % der auf dem selbst entwickelten Chip vorhandenen Gene zeigten eine signifikante Expression. Andere Arbeiten vergleichen die Genexpression der Cochlea

mit der des Nierengewebes (Liu et al., 2004) oder die Expressionsverteilung einzelner Mechanorezeptoren zwischen Cochlea- und ZNS-, Leber-, Herz-, Hoden-, Augen-, Milz-, Lungen- und Hautgewebe (Hildebrand et al., 2004).

Die Veränderung der Genexpression in der Cochlea unter schädigenden Einflüssen wurde ebenfalls untersucht. So wurde mittels Microarray der Einfluss von Alkohol (Da Lee et al., 2004), Cisplatin (Previati et al., 2004), Gentamycin (Nagy et al., 2004), Neomycin (Stover et al., 2004) und Lärm (Lomax et al., 2000) untersucht. In der Literatur findet sich keine Aussage zur Veränderung der Genexpression unter Hypoxie/Ischämie im Innenohr.

## 1.7. Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Einfluss von Hypoxie und Ischämie auf die Vulnerabilität von Haarzellen und auf die Genexpression von Organ Corti, Modiolus und Stria vascularis zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf die Rolle von Hypoxie/Ischämie bei der Entstehung von Hörstörungen zu ziehen.

Hierzu wurde das Modell der organotypischen Cochlea-Kultur der Ratte ausgewählt. Das *in-vitro*-Cochlea-Modell der neugeborenen Ratte bietet die Möglichkeit, den direkten Einfluss von Hypoxie/Ischämie auf verschiedene Strukturen der Cochlea zu analysieren. Dabei können die Regionen Organ Corti, Modiolus und Stria vascularis gesondert betrachtet werden.

Da keine einheitlichen Aussagen in der Literatur über die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen bestehen, soll zunächst die Hypoxievulnerabilität von inneren und äußeren Haarzellen untersucht werden. Die Ionenhomeostase des Innenohres ist von grundsätzlicher Bedeutung für die physiologische und pathologische Hörfunktion. Zum besseren Verständnis des Schädigungsmechanismus von Hypoxie/Ischämie, aber auch im

Hinblick auf Prävention und Therapie, wird der Einfluss von Kalium ( $K^+$ ), Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) und Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) auf die Hypoxievulnerabilität der Haarzellen ermittelt.

An der Signaltransduktion zwischen Haarzelle und Neuronen der Spiralganglien sind Glutamat und Glutamatrezeptoren unmittelbar beteiligt. Exzitotoxizität soll ein wesentlicher Schädigungsmechanismus sein. Daher ist es nahe liegend, den Einfluss von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Antagonisten auf die hypoxisch/ischämische Haarzellschädigung zu untersuchen.

Bisher ist unklar, auf welchem Weg Haarzellen durch Hypoxie/Ischämie sterben. Daher ist die Untersuchung der Relation von Apoptose zu Nekrose, die durch Hypoxie/Ischämie hervorgerufen wird, von großer Bedeutung. Da wahrscheinlich nur die Apoptose beeinflussbar ist, haben diese Erkenntnisse besonderen Einfluss auf therapeutische Ansätze.

Da der Transkriptionsfaktor HIF-1 ein Schlüsselfaktor für die Anpassungsfähigkeit von Geweben an Hypoxie/Ischämie darstellt, ist von großem Interesse, welche Rolle HIF-1 in den Regionen Organ Corti, Stria vascularis und Modiolus spielt. Dabei ist die HIF-1-Expression auf mRNA-Ebene, Protein-Ebene und Aktivitätsebene von Bedeutung.

Bei Hypoxie/Ischämie werden nicht nur HIF-1 und HIF-1-abhängige Gene in der Expression verändert, sondern eine Vielzahl von anderen Genen. Für das Innenohr liegen bis jetzt keine Erkenntnisse für die Genexpression in den Regionen Organ Corti, Stria vascularis und Modiolus unter Hypoxie/Ischämie-Bedingungen vor. Die Microarray-Analyse ermöglicht, eine Vielzahl von Gen-Veränderungen unter Normoxie und Hypoxie zu untersuchen und ist eine Basis dieser Arbeit. Durch die Microarray-Analyse werden Regulationswege besser verstanden und letztlich neue Wege für die Protektion und Therapie am Innenohr eröffnet.

Für die Funktion der ÄHZ ist das Gen Prestin von besonderer Bedeutung. Da Prestin nicht auf dem Microarray-Chip enthalten ist, wurden der Prestin mRNA-Gehalt mittels

kompetitiver RT-PCR in der organotypischen Kultur und der Einfluss von Hypoxie/Ischämie auf die Prestinexpression gesondert untersucht.