

4. Diskussion

4.1. Vor- und Nachteile des eingesetzten Modells

In der vorliegenden Arbeit wurde als experimentelles Modell die organotypische Kultur der Cochlea der neugeborenen Ratte verwendet. Dieses Modell hat Vor- und Nachteile. Die organotypische Kultur der Cochlea hat den Vorteil, dass der Zellverband zwischen Stütz- und Haarzellen erhalten bleibt und damit eine interzelluläre Interaktion gewährleistet ist. Diese Interaktion spielt auch bei Adaptationsprozessen eine Rolle, da die Stützzellen neben ihrer Haltefunktion auch wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der ionalen und energetischen Homeostase der Haarzellen erfüllen. Zu einem gewissen Anteil simuliert die organotypische Kultur die durch Hypoxie und Ischämie induzierten Prozesse *in situ*. Die Diskriminierbarkeit der Haarzellen anhand ihrer Lage innerhalb des Corti-Organs ist ein weiterer Vorteil der organotypischen Kultur. Nicht zu übersehen sind die gute Zugänglichkeit zum Gewebe und die kostengünstige Durchführbarkeit von Untersuchungen. Ein möglicher Nachteil der organotypischen Kultur ist die mit der Präparation und Kultivierung verbundene mechanische Schädigung der Cochlea, einschließlich einer möglichen Hypoxie.

Ein weiterer möglicher Nachteil ist die Unreife der Cochlea. Aufgrund der Unreife der Cochlea, die für die organotypische Kultur eingesetzt wird, ergibt sich das Problem der Übertragbarkeit auf die adulte Ratte. Allerdings zeigen gerade die vorliegenden Untersuchungen, dass das Profil der spezifischen Genexpression bereits am 3.-5. postnatalen Tag weitestgehend entwickelt ist und somit für die Untersuchung von Schädigungsmechanismen eingesetzt werden kann.

Für die Prüfung von neuen protektiven Substanzen kommt man ohne Tierexperimente nicht aus. Dies wird unterstrichen durch die starken Veränderungen der Genexpression bei der Herstellung der organotypischen Kultur. Das Tiermodell hat gegenüber der

organotypischen Kultur den großen Vorteil, dass die Strukturen des Innenohres erhalten bleiben und in ihrer Komplexität untersucht werden können. Der Nachteil ist ein hoher finanzieller und präparativer Aufwand. Demgegenüber sind die Ergebnisse aus dem Tiermodell besser auf die klinische Situation übertragbar. Für die letztendliche Prüfung sind aber klinische Studien am Menschen unabdingbar.

4.2. Mechanismen der Schädigung von Haarzellen durch Hypoxie/Ischämie

Die Rolle von Hypoxie/Ischämie für die Schädigung des Innenohres war lange Zeit unklar, weil widersprüchliche experimentelle Daten vorlagen (Cheng et al., 1999; Shirane und Harrison, 1987). Auch die Hinweise aus der Klinik lassen keine direkte Schlussfolgerung auf die Rolle von Hypoxie/Ischämie am Innenohr zu. Im Gegensatz dazu kann man feststellen, dass die therapeutischen Interventionen z. B. beim Hörsturz ganz auf die hypoxischen/ischämischen Mechanismen ausgerichtet sind (Mazurek et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit liefert eindeutige und umfangreiche Daten zu zwei Aspekten:

- 1) Ischämie schädigt die Haarzellen stärker als Hypoxie.
- 2) IHZ sind stärker vulnerabler gegenüber Hypoxie und Ischämie als ÄHZ.

Das stimmt mit einigen früheren Arbeiten überein (Shirane und Harrison, 1987). Dieser Befund lässt schlussfolgern, dass Sauerstoffmangel bei der lärminduzierten Haarzellschädigung eher eine untergeordnete Rolle spielt, da bei Lärm eher die ÄHZ geschädigt ist.

Der Mechanismus der hohen Vulnerabilität der Haarzellen gegenüber Hypoxie und Ischämie ist nicht komplett geklärt. In der Abb. 45 sind die wesentlichen Mechanismen zusammengefasst.

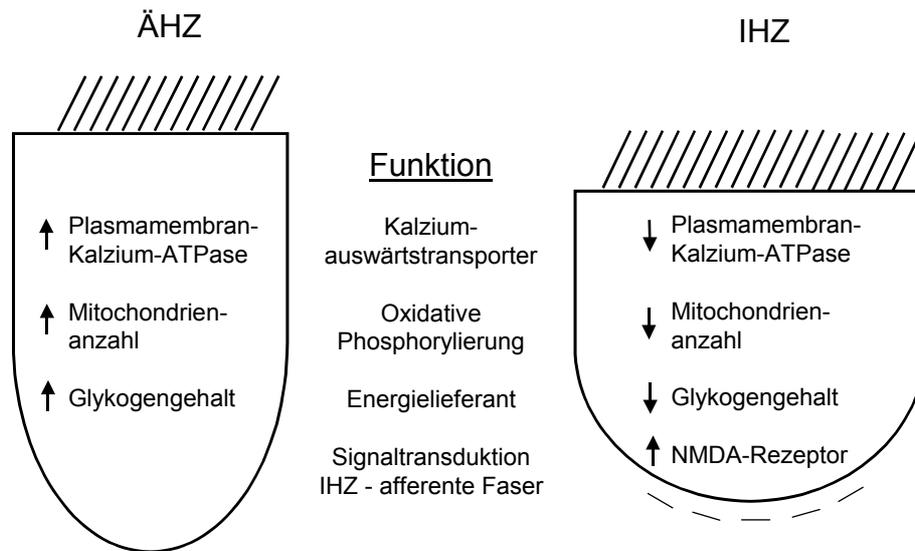


Abb. 45 Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Vulnerabilität von äußeren (ÄHZ) und inneren (IHZ) Haarzellen bei Hypoxie und Ischämie.

Silver et al. (1997) beschreiben, dass generell die zelluläre Ionen-Homeostase sehr sensibel auf Veränderungen im Energie-Status reagiert. Prinzipiell führt Hypoxie/Ischämie zum Abfall der ATP-Konzentration und zur Membrandepolarisation, in deren Folge die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Dies führt in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung zum Haarzelltod. Der pathologische Influx von extrazellulärem Ca^{2+} über spannungsabhängige NMDA-Ionen-Kanäle wird als primäres ätiologisches Korrelat für neuronale Schädigungen angesehen (Choi, 1988; Faden et al., 1989; Rothman und Olney, 1986; Wieloch, 1985). Der exzessive Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt über die Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonukleasen zum Zelltod (Choi, 1988; Lipton, 1999).

Unter Hypoxie kommt es über den erhöhten Glukosetransport zu einer verstärkten Glukoseaufnahme und gleichzeitig kann auf die endogenen Substrate zurückgegriffen werden. Dadurch kann unter anaerober Glykolyse der ATP-Gehalt zunächst über eine

längere Zeit konstant gehalten werden, und durch eine langsame Reduzierung des ATP-Gehaltes können noch Kompensationsmechanismen wirken. Im Gegensatz dazu steigt unter Ischämie der Haarzellverlust dramatisch an. Da unter ischämischen Bedingungen der ATP-Gehalt nur über endogene Substrate stabil gehalten werden kann, diese aber nur begrenzt zur Verfügung stehen, kommt es zur schnelleren und stärkeren ATP-Reduzierung und zum stärkeren Haarzellverlust.

Für die höhere Vulnerabilität der IHZ gegenüber ÄHZ werden mehrere Mechanismen diskutiert. Glutamat ist ein afferenter Neurotransmitter der IHZ beim Übergang zu den Typ I-Fasern des Spiralganglions (Choi, 1988; Ehrenberger und Felix, 1991; Pujol et al., 1990). Puel et al. (1994; 1998) beobachteten nach Ischämie, Zugabe von Glutamat-Agonisten oder Lärm eine Dendritenschwellung der Afferenzen der IHZ, die über die Glutamat-Exzitotoxizität zu erklären ist. Eine glutamaterge Stimulation, ausgelöst durch die hypoxische Depolarisation, bewirkt durch das Versagen der ionalen Pumpmechanismen eine zelluläre Akkumulation von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgt auf mehreren Wegen: Initial Aktivierung von glutamatergen NMDA-Rezeptor assoziierten Ca^{2+} -Kanälen, im weiteren Verlauf zusätzlich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Dies kann in deren Folge über eine intrazelluläre Kaskade enzymatischer Prozesse zum Zelltod führen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Haarzellprotektion in der organotypischen Kultur durch Mg^{2+} und MK 801 unterstützt diese Annahme.

Weitere Faktoren für die hohe Vulnerabilität der IHZ sind die geringere PMCA-Aktivität, der geringere Glykogengehalt der IHZ (Beneyto et al., 1997) und die geringere Anzahl von Mitochondrien in der IHZ (Hyde und Rubel, 1995; Schulte, 1993).

Interessanterweise ist der basale Teil der Cochlea sowohl bei IHZ und ÄHZ gegenüber Hypoxie empfindlicher als der apikale und mediale Teil. Eine höhere Vulnerabilität des

basalen Anteils der Cochlea konnte auch an anderen experimentellen Modellen nachgewiesen werden (Chen et al., 1999; Kuokkanen et al., 2000; Lopez-Gonzalez et al., 1998; Lowenheim et al., 1999; Staecker et al., 2001). Die niedrige Überlebensrate der basalen ÄHZ ist erklärbar mit einem geringeren Gehalt des Antioxidanziums Glutathion (Sha et al., 2001). Der Glutathion-Gehalt ist in den apikalen ÄHZ um 25 % höher als basal. Sha et al. (2001) konnten eine höhere Vulnerabilität der basalen ÄHZ gegen freie Radikale feststellen. Bei einer Kultivierung isolierter ÄHZ für 6 h überlebten 90 % der apikalen und weniger als 30 % der basalen ÄHZ, die Behandlung mit Antioxidanzien steigerte das Überleben basaler ÄHZ fast auf apikales Niveau. Die schädigende Wirkung der unter Hypoxie verstärkt gebildeten freien Radikale kann von den apikalen Haarzellen mit Hilfe des Glutathions offensichtlich besser abgepuffert werden.

Darüber hinaus nimmt zusätzlich der Glykogen-Gehalt von basal nach apikal um den Faktor vier zu (Thalman et al., 1970).

Auch die geringere basale Zellgröße und die höhere Reife der basalen Windung können als Erklärung in Betracht gezogen werden. So weist die Mammaliacochlea sowohl einen longitudinalen als auch einen radialen Entwicklungsgradienten bezüglich der Haarzellen auf (Walsh, 1992). Dabei schreitet die Reifung von basal nach apikal und von medial nach lateral fort. Prinzipiell gilt, je höher eine Zelle ausdifferenziert ist, umso geringer ist ihre Adaptationsfähigkeit gegenüber veränderten Umweltbedingungen. Die Innenohrentwicklung bei Wistarratten ist erst um den 14. postnatalen Tag abgeschlossen.

4.3. Einfluss von Elektrolyten auf die Ischämievulnerabilität von Haarzellen in der organotypischen Kultur

4.3.1. Einfluss von Kalium

Die sensorische Transduktion in der Cochlea ist vom K^+ -Fluss abhängig. Die hohe K^+ -Konzentration der Endolymphe mit ca. 150 mM und das positive endocochleäre

Potenzial (ca. 80 mV) sind wichtige Faktoren für den Eintritt von K^+ in die Haarzelle und damit die sensorische Transduktion. Unter normoxischen Bedingungen führt eine hohe K^+ -Konzentration zur Membrandepolarisation, Verkürzung der ÄHZ und Stimulation der IHZ (Dulon et al., 1991; Zenner et al., 1994). Der Eintritt von K^+ in die Haarzellen erfolgt über K^+ -permeable Transduktionskanäle in den Stereozilien der apikalen Haarzellmembran. Die K^+ -bedingte Depolarisation führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -permeablen Kanälen, so dass Ca^{2+} einströmt und Neurotransmitter am basalen Pol der Haarzelle ausgeschüttet werden (Dallos, 1996). Der Rücktransport von K^+ in die Perilymphe erfolgt über basolaterale K^+ -Kanäle. Die Erhöhung der K^+ -Konzentration soll bei der Entstehung des endolymphatischen Hydrops eine Rolle spielen. Das Einreißen der Reissner'schen Membran führt zu einer Vermischung von Endo- und Perilymphe, in deren Folge die Perilymphe eine höhere K^+ -Konzentration aufweist, die zum Haarzelluntergang führen soll. In der Literatur wird der K^+ -Toxizität bei der Schädigung von Haarzellen eine große Rolle zugeordnet (Zenner et al., 1994). In der organotypischen Kultur der neugeborenen Ratte konnte die K^+ -Toxizität nicht nachgewiesen werden. Aus den vorliegenden Untersuchungen sind folgende drei Aspekte hervorzuheben: 1) Unter Normoxie führt eine K^+ -Erhöhung nicht zu einer Zunahme der Haarzellschädigung. 2) Auch unter Ischämie bewirkt die Erhöhung der K^+ -Konzentration keine Zunahme der Haarzellschädigung; im Gegenteil, eine K^+ -Konzentration von 70 mM hat einen starken protektiven Effekt auf die Haarzellen. 3) Die Aktivität der PMCA spielt eine große Rolle für die K^+ -Toleranz der Haarzellen. Darüber hinaus scheint auch die Aktivität der K^+ -Kanäle KCNQ4 von Bedeutung zu sein.

Das Ruhepotential der Zellen unter Normoxie kann als -84 mV für 5 mM, -26 mV für 50 mM und -18 mV für 70 mM K^+ berechnet werden (Nernstsche Gleichung). Okano und Iwai (1975) zeigten, dass die ÄHZ unter hohen K^+ -Konzentrationen (> 46,6 mM) in der Zellkultur erst nach einer Expositionszeit von 12 h degenerieren, während die IHZ ihre

normale Erscheinung behalten. Diese Befunde unterstützen unsere Annahme, dass die Haarzellen unter normoxischen Bedingungen K^+ -Konzentrationen von 30-70 mM gut tolerieren und erst bei längerer Exposition pathologische Veränderungen zeigen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die PMCA der Haarzellen, ähnlich wie die PMCA der roten Blutzellen, eine minimale Pump-Rate bei 5 mM K^+ hat, die sich aber um den Faktor 6 bei K^+ -Werten um 50 mM erhöhen kann und damit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration normalisiert (Boyer et al., 2001).

Entgegen den Erwartungen wirkte eine K^+ -Konzentration von 70 mM *in vitro* auf Haarzellen gegenüber Ischämie stark protektiv. Es bestehen mehrere Erklärungsmöglichkeiten: 1) Eine hohe K^+ -Konzentration inhibiert den Na^+ - und Ca^{2+} -Influx und führt zu einer Hyperpolarisation (Nieber, 1999). 2) Es besteht die Möglichkeit der Zunahme des Ca^{2+} -Efflux über eine verstärkte Aktivität des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers (Breder et al., 2000). Die Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ reduziert die Ca^{2+} -sensitive synaptische Ausschüttung von Glutamat. 3) Darüber hinaus scheint die K^+ -Depolarisation Einfluss auf die Aktivität von multiplen Untergruppen der Ca^{2+} -Kanäle zu haben, besonders bei solchen, die für die Transmitterausschüttung verantwortlich sind (Moulder et al., 2003). 4) Über NMDA- und Non-NMDA-Rezeptoren soll der K^+ -Efflux den Zelltod von neuronalen Zellen (Apoptose) einleiten. Dies kann durch die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration reduziert werden (Xiao et al., 2001).

Um die protektive Wirkung von 70 mM K^+ unter Ischämie auf die Haarzellen weiter zu klären, haben wir die KCNQ-Kanäle über Linopiridin, den Na^+/K^+ -Austauscher über KB-R7943 und die PMCA über Eosin blockiert.

KCNQ4 ist der wichtigste Kanal zum Erhalt des Ruhepotentials und verantwortlich für den K^+ -Efflux über die basale Membran (Kubisch et al., 1999). Der Verlust von KCNQ4 oder die Blockierung führt zu einer chronischen K^+ -Intoxikation der ÄHZ und damit zu deren Degeneration (Jentsch et al., 2000). Unsere Ergebnisse bestätigen, dass der KCNQ4-

Kanal sowohl für die ÄHZ als auch für die IHZ eine Bedeutung hat. Eine KCNQ4-Blockierung mit Linopirdin führt unter ischämischen Bedingungen zu einer massiven Haarzell-Schädigung und hebt die protektive Wirkung von 70 mM K^+ auf.

Es wird angenommen, dass während der Ischämie und der frühen Reperfusionphase die Na^+/Ca^{2+} -Austauscher nach einem entgegengesetzten Muster arbeiten, weil die Abnahme des Membranpotenzials und die starke Zunahme von Na^+ den Ca^{2+} -Eintritt begünstigen (Breder et al., 2000; Pitts, 1979). Der Na^+/Ca^{2+} -Austausch-Blocker KB-R7943 reduziert den neuronalen Schaden in der organotypischen Hippocampus-Kultur (Breder et al., 2000). In unserem Modell scheint der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher nicht von Bedeutung zu sein.

Da die Blockierung durch KB-R7943 unter Ischämie und K^+ -Erhöhung in der organotypischen Cochlea-Kultur nur geringen Einfluss auf den Haarzellverlust hatten, kann davon ausgegangen werden, dass Na^+/Ca^{2+} -Austauscher keine Schlüsselstrukturen im Überleben der Haarzellen in der organotypischen Kultur der neugeborenen Ratte unter Ischämie sind.

Da sich bei der Zugabe von Eosin unter Ischämie und einer K^+ -Erhöhung eine dramatische Zunahme des Haarzellverlustes in Normoxie und Ischämie sowohl bei IHZ als auch ÄHZ zeigte, scheint die PMCA unter ischämischen Bedingungen das Schlüsselenzym für das Zellüberleben zu sein. Die PMCA-Aktivität wird über Calmodulin reguliert. (Breder et al., 2000; Carafoli, 1997). Eosin hemmt effektiv die PMCA. Von Babnigg et al. (2003) wurde mitgeteilt, dass die PMCA-Aktivität über eine Phosphorylierung gesteuert wird. Eine erhöhte Phosphorylierung bedeutet eine Hemmung der PMCA. Es ist gut möglich, dass durch Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Phosphorylierungszustand der PMCA verändert wird. Eine Aktivierung der PMCA bei hohen K^+ -Konzentrationen geht wahrscheinlich mit einer Dephosphorylierung einher.

4.3.2. Einfluss von Kalzium

Im auditorischen System spielt Ca^{2+} eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Aktivitäten der sensorischen Zellen der Cochlea einschließlich Depolarisation und Repolarisation, Neurotransmitterausschüttung, Adaptation und Haarzellmotilität (Crawford et al., 1991; Dulon et al., 1990; Lewis und Hudspeth, 1983). Ischämie führt, wie an neuronalen Zellen gezeigt (Wang et al., 2002), zu einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Deren Folgen sind: Aktivierung der Ca^{2+} -regulierten Enzyme, mitochondriale Ca^{2+} -Überladung, Abbau des Zytoskeletts sowie die Aktivierung von Calpain (Benjamins et al., 2003; Lipton, 1999; Missiaen et al., 2000). Eine exzessive Ca^{2+} -Zunahme führt zum Zelltod über Apoptose und Nekrose (Orrenius et al., 2003).

Für die Ca^{2+} -Homeostase sind drei wesentliche Mechanismen von Bedeutung: a) die PMCA, die energieabhängig unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} in den Extrazellulärraum pumpen, b) die Ca^{2+} -ATPasen, die energieabhängig Ca^{2+} in das glatte endoplasmatische Retikulum pumpen (SERCA), und c) zytoplasmatisch Ca^{2+} -bindende Proteine (Apicella et al., 1997). Die PMCA scheint das Schlüsselenzym für die Aufrechterhaltung einer geringen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu sein. In beiden Haarzelltypen ist die PMCA an den apikalen Bereichen der Stereozilien und an der Membran unterhalb der Kutikularplatte besonders dicht. Diese Lokalisation soll dazu dienen, dass während der Transduktion durch unselektive Kationenkanäle an den Tip-links eingetretene Ca^{2+} sofort wieder zu eliminieren. Es konnte gezeigt werden, dass die PMCA-Dichte an den Stereozilien der IHZ geringer ist als bei der ÄHZ (Apicella et al., 1997). Die IHZ exprimieren die PMCA 1 von der Geburt bis zum 12. postnatalen Tag mit moderater Aktivität und erreichen erst mit der funktionellen Reife des Gehörs eine starke Expression (Furuta et al., 1998). Hingegen exprimieren die ÄHZ die Isoform PMCA 2 unmittelbar nach der Geburt bis zum Erwachsensein mit höherer Aktivität. Des Weiteren zeichnet sich die PMCA 2 der ÄHZ durch eine hohe Calmodulinaffinität, eine schnelle Induzierbarkeit durch Ca^{2+} -bindende

Proteine, eine Assoziation mit hohen Konzentrationen des „second messengers“ IP3 und die Aktivierung durch Proteinkinasen aus. Insgesamt scheint die PMCA 2 stärker regulierbar zu sein als die PMCA 1.

Von wesentlichem Interesse ist, welcher der beiden Hauptmechanismen, SERCA oder PMCA, eine kritische Rolle in der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unter Hypoxie/Ischämie spielt. Eosin als Inhibitor der PMCA führt zu einem Haarzellverlust bereits unter Normoxie und verstärkt diesen unter Ischämie. Thapsigargin hingegen, als Inhibitor der SERCA, hatte sowohl unter Normoxie als auch Ischämie keinen Einfluss auf das Haarzellüberleben. Dabei war der Haarzellverlust durch Eosin unter ischämischen Bedingungen für die IHZ größer als für die ÄHZ. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums für den ischämischen Zelltod eher von untergeordneter Bedeutung sind. Die SERCA scheint eine Rolle bei der lokalen Ca^{2+} -Veränderung, mit nur kleinem bzw. gar keinem Einfluss auf die totale zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, zu haben. Die PMCA ist wahrscheinlich das Schlüsselenzym, das die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration niedrig hält. Befunde aus der Literatur unterstützen diese Annahme. So führte die Inhibierung der PMCA in Neuronen extrazellulär über eine pH-Erhöhung oder intrazellulär über Carboxyeosin zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Wanaverbecq et al., 2003). IHZ werden stärker durch Eosin geschädigt als ÄHZ. Die oben erwähnte unterschiedliche Expression der PMCA in beiden Haarzelltypen kann dies erklären (Brini et al., 2003; Furuta et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PMCA 1 weniger effektiv ist in der Kontrolle der Ca^{2+} -Homeostase als die Isoform PMCA 2 (Dumont et al., 2001). Die Isoform PMCA 2 hat eine signifikant höhere K_m für Ca^{2+} als andere Isoformen. Zusätzlich aktiviert Calmodulin die PMCA 2 mit einer höheren Affinität.

4.3.3. Einfluss von Magnesium

Zur weiteren Charakterisierung des hypoxischen Schädigungsmechanismus an der Haarzelle und zur Untermauerung eigener Vorarbeiten (Haupt et al., 2003; Wang et al., 1997) wurde Mg^{2+} in einer Konzentration von 3 mM dem Zellkultur-Medium zugegeben. In der organotypischen Kultur zeigte sich durch Mg^{2+} -Zugabe eine Protektion der IHZ und ÄHZ nach Hypoxieexposition. Der protektive Effekt von Mg^{2+} auf Hypoxie assoziierte Verluste neuronaler und nicht-neuronaler Zellen ist in der Literatur vielfach beschrieben worden (Attias et al., 1994; Galland, 1991; Garnier et al., 2002; Marret et al., 1995; Muir, 1998; Muir et al., 2000; Muir, 2001; Sameshima und Ikenoue, 2001; Scheibe et al., 2000; Schmitt et al., 1994; Wang et al., 1997). Durch eine extrazellulär erhöhte Mg^{2+} -Konzentration wurden eine spannungsabhängige Blockade von NMDA-Rezeptoren und damit ein verminderter Influx von Ca^{2+} erreicht (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine erhöhte Mg^{2+} -Konzentration die Regeneration des zellulären ATP- und Kreatinphosphat-Gehaltes und die Wiederaufnahme der Proteinsynthese nach Hypoxie verbessert (Garnier et al., 2002). Dies wird auf eine partielle Inhibition der hypoxischen NO-Produktion durch den nach Mg^{2+} -Gabe reduzierten posthypoxischen Gehalt an cGMP zurückgeführt. Andere Autoren diskutieren eine verminderte ATP-Depletion und Reduktion der posthypoxischen DNA-Fragmentation als Ausdruck einer Verminderung des Zelltodes (Maulik et al., 2001; Ravishankar et al., 2001). Interessant ist auch der Ansatz, dass Mg^{2+} die posthypoxische Erhöhung von ROS eliminiert (Wang et al., 1997). Somit wird für prähypoxisch appliziertes Mg^{2+} ein indirekter antioxidativer Effekt postuliert. Ehrenberger und Felix (1995) nennen drei Wege der Hörprotektion durch Mg^{2+} -Applikation: Verringerung der exzessiven Transmitterausschüttung, Blockade glutamatabhängiger intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, Inhibition von NMDA-Rezeptoren. Des Weiteren soll auch die unspezifische Ca^{2+} -

antagonistische Wirkung von Mg^{2+} an der Haarzellmembran eine Rolle spielen (Cevette et al., 1989; Cevette et al., 2000; Dolev et al., 1983).

4.3.4. Protektiver Einfluss von MK 801

MK 801 ist ein hochspezifischer nicht-kompetitiver Glutamatantagonist, der durch selektive Blockade des NMDA-Rezeptor-assoziierten Ionenkanals den Einstrom von Kationen in die Zelle und damit die glutamaterge Depolarisation hemmt. Eine Protektion durch MK 801 gegenüber verschiedenen Noxen gemessen an der Hörfunktion wurde in der Literatur bereits beschrieben (Basile et al., 1996; Basile et al., 1999; Bienkowski et al., 2000; Chen et al., 2000; Duan et al., 2000; Janssen, 1992).

Durch den Zusatz von 1 und 10 μ M MK 801 wurde nach 36 h Hypoxie der Verlust der IHZ um bis zu 40 % und der ÄHZ um bis zu 20 % gegenüber der hypoxischen Vergleichsgruppe ohne MK 801 verringert. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass neben der hypoxisch induzierten direkten glutamatergen Schädigung der IHZ auch ein NMDA-Autorezeptoren-Mechanismus (NMDA-Rezeptor assoziierter Ionenkanal) wirksam ist. Der Einfluss einer Glutamatapplikation auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von IHZ und ÄHZ zeigte einen isolierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der IHZ (Li et al., 2001; Li et al., 2002). Dies wird als Hinweis auf Glutamat abhängige Autorezeptoren an der IHZ gewertet.

Alternativ kann die Schutzwirkung von MK 801 auch unabhängig vom Vorkommen von NMDA-Autorezeptoren an der IHZ erklärt werden. MK 801 soll einen Einfluss auf das Öffnungsverhalten von spannungsabhängigen Na^{+} -Kanälen haben (Allaoua und Chicheportiche, 1989; Espanol et al., 1994; Halliwell et al., 1989; Lipton, 1999).

Die Erhöhung der Konzentration von MK 801 auf 100 μ M steigerte den Haarzellverlust von IHZ und ÄHZ. Dies deutet auf einen toxischen Effekt hoher MK 801-Konzentrationen hin. In der Literatur ist ein toxischer Effekt von hohen Dosen MK 801

und anderen NMDA-Antagonisten auf neuronale Zellen ebenfalls beschrieben (Ellison, 1994; Ellison, 1995; Jevtovic-Todorovic et al., 2001; Lipton, 1999; Olney et al., 1989).

4.4. Art des Zelltodes unter Ischämie

Zwei wichtige Hauptaussagen leiten sich aus unseren Ergebnissen ab: 1) Ischämie führt zum Zelltod der Haarzellen des Cortischen Organs über Apoptose und Nekrose. Dieser Befund stimmt mit Literaturdaten gut überein. Ischämie führt zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod in einer Vielzahl von Geweben und ist am intensivsten an Zellen im Gehirn und neuronalen Kulturen untersucht worden (Beilharz et al., 1995; Bonfoco et al., 1995; Charriaut-Marlangue et al., 1996). Daten zum Einfluss von Ischämie auf die Art des Zelltodes bei Haarzellen lagen bis jetzt nicht vor. 2) Wachstumsfaktoren verringern die apoptotische und nekrotische Todesrate.

Der protektive Einfluss der Wachstumsfaktoren IGF-1 und EGF ist bekannt. IGF-1 ist ein Polypeptid, das eine bedeutende Rolle in der normalen Entwicklung und Zellintegrität spielt (Zheng et al., 2002) und zum Zellüberleben beiträgt. Die biologische Aktivität von IGF-1 wird über den Typ I-Rezeptor vermittelt. EGF ist als bedeutender Wachstumsfaktor für Haarzellen beschrieben worden (Doetzlhofer et al., 2004; Malgrange et al., 2002) und ist verantwortlich für die Differenzierung von Haarzellen in der Cochlea-Kultur (Doetzlhofer et al., 2004). Neu ist unsere Beobachtung, dass rhEPO ebenfalls protektiv auf Haarzellen wirkt. Bisher konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* neuroprotektive Effekte durch rhEPO im Gehirn und in der Retina nachgewiesen werden (Grimm et al., 2005; Jelkmann und Wagner, 2004). rhEPO schützt neurosensorische Zellen wahrscheinlich über verschiedene Mechanismen: 1) Bindung von rhEPO an den Erythropoetin-Rezeptor führt zu einer Aktivierung verschiedener Protein-Kinasen wie z. B. Phosphoinoside-3-Kinase und Akt-Proteinkinase. 2) Bindung von rhEPO an den Erythropoetin-Rezeptor und

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB. 3) rhEpo verringert selektiv die Zytokin-Produktion (Villa et al., 2003).

Inzwischen wurde in einer anderen Arbeitsgruppe immunhistochemisch der Erythropoetin-Rezeptor in der Cochlea nachgewiesen (Caye-Thomasen et al., 2005).

Es ist interessant, dass die Wachstumsfaktoren sowohl Apoptose als auch Nekrose positiv beeinflussen. Dies spricht dafür, dass Apoptose und Nekrose einen initial gemeinsamen Pathomechanismus benutzen (Tatsumi et al., 2003). Es wird angenommen, dass die Apoptose die bevorzugte und frühe Art des Zelltodes nach Schädigung ist, da die Apoptose nicht-entzündlich verläuft. Nicotera et al. (2003) konnten zeigen, dass die Ablösung von Cytochrom c von den Mitochondrien sowohl in nekrotischen als auch apoptotischen Zellen stattfindet.

Vergleicht man die Abbildungen 15 und 16, stellt sich die Frage, warum die Protektion der Haarzellen durch Wachstumsfaktoren niedriger ist, gemessen an der Phalloidin-Färbung, im Vergleich zu den apoptotischen und nekrotischen Kernen. Diese Diskrepanz könnte zurückgeführt werden auf den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Struktur des Aktin-Zytoskeletts. Wie Hall (1998) zeigte, induzieren Wachstumsfaktoren die Bildung von Stressfibrillen und fokalen Adhäsionsstrukturen. Die Bildung dieser Strukturen geht mit einer Phalloidin-Entfärbung einher. Diese Aktin-Reorganisation könnte die Ursache dafür sein, dass mit der Phalloidin-Färbung das Ausmaß der Protektion durch Wachstumsfaktoren zu niedrig bestimmt wird.

4.5. Rolle der HIF-1-Aktivität

Die Untersuchungen zeigen zwei wichtige Aspekte. Zum einen führten Hypoxie und Ischämie zu einer deutlichen und regionspezifischen Aktivierung von HIF-1, wobei im MOD und OC die höchsten Aktivitäten nachzuweisen waren. Der zweite wichtige Aspekt

ist, dass sich der HIF-1 alpha mRNA-Gehalt bei Hypoxie nicht veränderte und im MOD wesentlich niedriger als im OC und in der SV war.

Die unterschiedliche Aktivierung in den einzelnen Regionen deutet auf unterschiedliche, gewebsspezifische Anpassungsvorgänge in den einzelnen Strukturen der Cochlea hin. Bemerkenswert ist, dass die HIF-1-Aktivierung im MOD und im OC am höchsten ist. Daraus folgt, dass a) jeder Teilbereich der Cochlea unterschiedlich empfindlich auf Hypoxie ist und b) unterschiedliche Regulationsebenen vorliegen. HIF-1 spielt wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der Innenohrhomeostase.

Als eine Ursache der unterschiedlichen HIF-1-Aktivierung kann die gewebsspezifische Expression von Cofaktoren herangezogen werden (Ebert und Bunn, 1998; Semenza, 2000; Yamashita et al., 2001). Die Regulation von einigen HIF-1-Zielgenen verlangt einen Multiproteinkomplex, bestehend aus HIF-1, CREB1/ATF1 u. a. Dabei wird z. B. die DNA-Bindungsaktivität des HIF-1-Multiproteinkomplexes durch den p300/CREB-Bindungskomplex erhöht (Arany et al., 1996). Da in der Zwischenzeit auch andere Mitglieder der HIF-Familie bekannt sind (HIF-2 und HIF-3) und diese HIF-1 in der Expression und Aktivierung sehr ähneln, kann dies ebenfalls eine Ursache für die unterschiedliche HIF-1-Aktivierung in der Cochlea sein. HIF-2 ist z. B. zu 48 % HIF-1-ähnlich, wird aber vermehrt in endothelialen und Fibroblasten-Zelllinien exprimiert.

Hypoxie und Ischämie (Sauerstoff und Glukosemangel) zeigten in der Cochlea ein ähnliches HIF-1-Aktivierungsmuster. Dies deutet darauf hin, dass für die HIF-1-Aktivierung im Innenohr der Sauerstoff-Mangel der entscheidende Faktor ist und nicht der Substratmangel.

Trotzdem ist die Regulation des Zellüberlebens durch den HIF-1-Transkriptionsfaktor eng mit dem Kohlenhydratstoffwechsel verbunden. HIF-1 führt bei Sauerstoffmangel durch die Aktivierung von Glukosetransportern, Hexokinasen und Glykolyseenzymen zum

schnellen Umschalten von der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung auf die anaerobe Glykolyse (Pasteur-Effekt).

Es ist interessant, dass in verschiedenen Modellen die Transkription von HIF-1 alpha mRNA unter Hypoxie keine Veränderung zeigt (Kress et al., 1998; Minet et al., 1999; Moritz et al., 2002). Dies lässt sich auch für Innenohrstrukturen nachweisen. Die Expression von HIF-1 alpha mRNA und HIF-1 alpha Protein erfolgt nicht parallel. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass während der Schwangerschaft der HIF-1 alpha mRNA-Gehalt der Plazenta konstant blieb, während der HIF-1 alpha Protein-Gehalt sank (Rajakumar und Conrad, 2000). Generell wird angenommen, dass unter Hypoxie/Ischämie die Protein-Synthese abnimmt. Interessanterweise konnte aber unter Hypoxie ein Anstieg für HIF-1 alpha Protein und ARNT-Protein unter Hypoxie gefunden werden (Gorlach et al., 2000). Unsere Untersuchungen zeigen, dass die HIF-1 alpha mRNA Expression und die Proteinexpression in der Cochlea nicht parallel verlaufen.

HIF-1 alpha Protein wurde bereits in geringer Aktivität unter normoxischen Bedingungen in der Cochlea exprimiert. Dabei korrelierte die niedrige mRNA-Aktivität des MOD mit einer niedrigen Aktivität von HIF-1 alpha Protein. Diese Beobachtung wird inhaltlich auch von anderen Autoren (Stroka et al., 2001) unterstützt. Es ist möglich, dass die HIF-1 alpha Protein-Aktivität unter Normoxie über die Transkription reguliert wird. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass HIF-1 alpha in Entwicklungsprozesse der Cochlea involviert ist, so wie es schon für andere Gewebe beschrieben wurde (Semenza, 2001b). Die Präsenz von HIF-1 alpha unter normoxischen Bedingungen ermöglicht den Zellen, unter akuter Hypoxie schnell zu reagieren.

Da sich der HIF-1 alpha mRNA-Gehalt unter Normoxie und Hypoxie nicht änderte, ist zu vermuten, dass die Regulation von HIF-1 in der Cochlea auf der Translations- oder Posttranslationsebene erfolgt. Der HIF-1-Proteingehalt war in den einzelnen Cochlea-Regionen unter Normoxie ungefähr gleich und nahm unter Hypoxie zu. Untersuchungen

der HIF-1- DNA-Bindungsaktivität und des HIF-1 alpha Proteinspiegels unter Hypoxie haben eine enge Korrelation beider Parameter ergeben (Huang et al., 1996). Andere Autoren ermittelten ebenfalls eine gewebeabhängige unterschiedliche Expression von HIF-1 alpha Protein unter Hypoxie (Stroka et al., 2001). Dieses ließ sich für das Cochlea-Gewebe nicht nachweisen. Auch dies deutet auf eine posttranslationale Regulation von HIF-1 hin und stimmt mit Erkenntnissen der Regulation durch Ubiquitinierung überein (Salceda und Caro, 1997; Semenza, 2001a; Wenger et al., 1997).

4.6. Analyse der Genexpression (mRNA)

4.6.1. Charakterisierung der Genexpression in der frisch präparierten Cochlea (S1)

Die vorliegende Microarray-Analyse resultiert aus 16 Proben und 4 verschiedenen Arrays, wobei die gepoolte Proben-mRNA von 6 Tieren stammt. Das wirft die Frage nach der statistischen Zuverlässigkeit dieser Microarray-Untersuchungen auf. Aus Kostengründen muss jede Microarray-Untersuchung hinsichtlich der Zielstellung genau geplant werden. Unser Versuchsschema erlaubt Aussagen über die Gesamt-Varianz der Microarray-Untersuchungen (biologisch und technisch). Die Aussagen zur statistischen Zuverlässigkeit ergeben sich aus folgenden Berechnungen: 1) Analyse der log₂-Verteilung der normierten Signale und Standard-Abweichung (siehe Abb. 26), 2) Untersuchung der Variabilität von zwei unabhängigen OC-Proben, die auf demselben Array hybridisiert wurden (siehe Abb. 23), 3) Variabilität von verschiedenen Proben, die auf verschiedenen Arrays hybridisiert wurden und 4) Variabilität von „housekeeping“ Genen von insgesamt 16 Proben und 4 Arrays. All diese Berechnungen lassen erkennen, dass mit einem Variationskoeffizienten von maximal $17 \pm 12\%$ zu rechnen ist. Eine Erhöhung oder Verminderung um den Faktor 2 ist damit mit einer ausreichend statistischen Sicherheit

verbunden. Es ist allgemein üblich, dass wesentliche Aussagen durch RT-PCR gesichert werden. Bis zum derzeitigen Zeitpunkt wurden von uns 4 Gene an Aliquotes der Microarray-Proben nachuntersucht und bestätigt (*Hif-1 alpha*, *Gapdh*, *Slc2a1*, *Nos2*). *Hif-1 alpha* wurde zusätzlich an völlig unabhängigen Proben nachuntersucht, auch hier fanden wir eine gute Übereinstimmung von Microarray- und RT-PCR-Daten. Wenn man biologisches Material poolt, geht verständlicherweise die biologische Variabilität verloren. Die Ermittlung der biologischen Variabilität war nicht das primäre Anliegen der Arbeit. Da wir die Genexpression im OC, MOD und SV von Proben derselben Tiere analysiert haben, tragen die vorliegenden Untersuchungen den Charakter von Paarvergleichen, die allgemein eine geringere Streuung aufweisen. Hinzu kommt, dass die vorliegende Microarray-Untersuchung vor allem unter dem Aspekt der Hypothesenbildung durchgeführt wurde.

Der verwendete RN U34-Chip der Firma Affymetrix ist auf die Erfassung neurobiologischer wichtiger Gene ausgerichtet. Dies hat den Vorteil, Aussagen über den neurobiologischen Status der Cochlea machen zu können und den Nachteil, dass über die Expression der anderen Gene keine Aussage getroffen werden kann.

Betrachtet man die mittels Microarray ermittelte spezifische Genexpression im OC, MOD und SV, dann ist eine gute Übereinstimmung mit der aus der Literatur bekannten speziellen Funktion und Struktur festzustellen (Abb. 46).

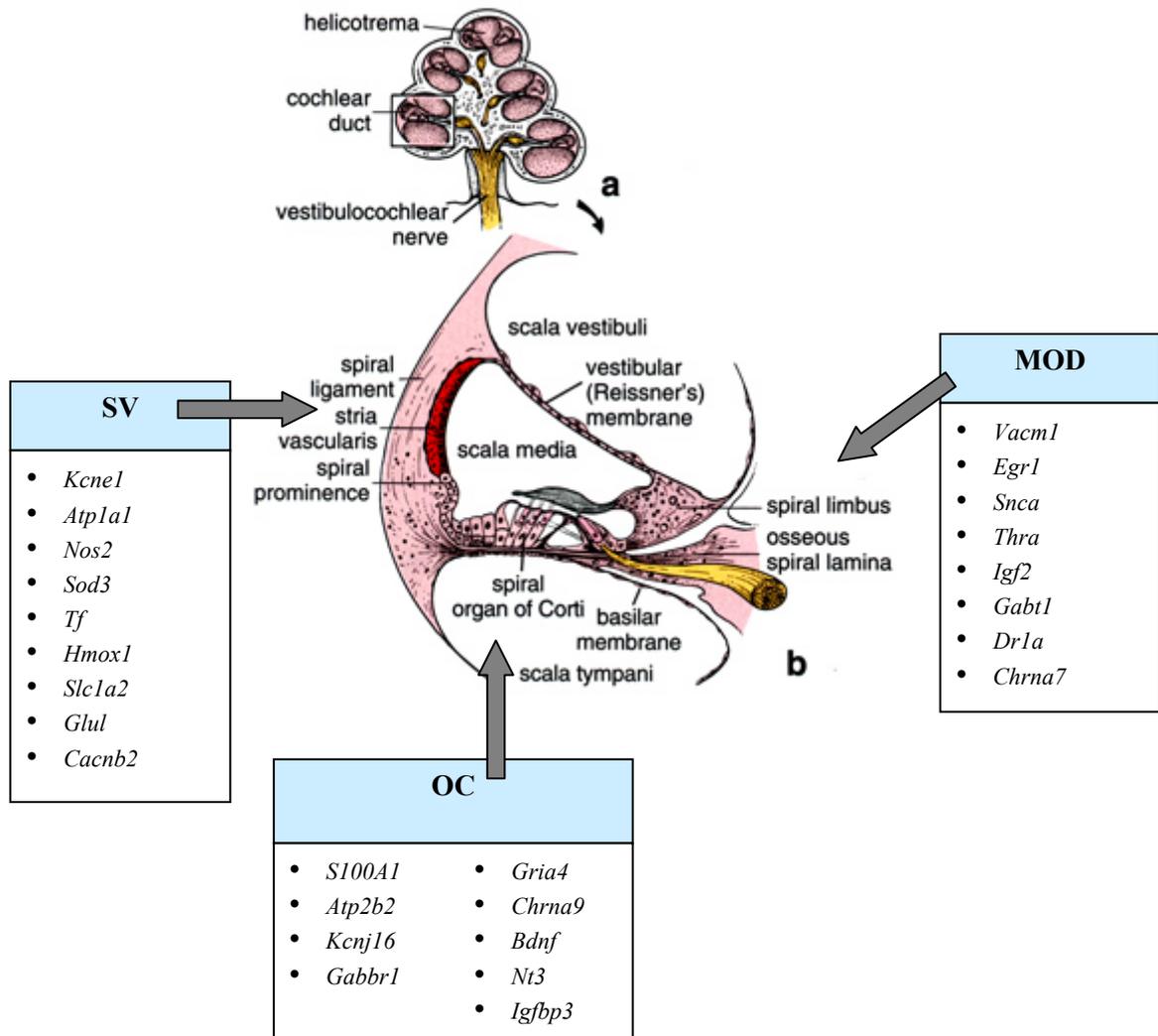


Abb. 46 Zusammenfassung der spezifischen Genexpression in der frisch präparierten Cochlea (S1) im Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und in der Stria vascularis (SV). (Quelle Cochlea: anatomy.iupui.edu/Earf04/cochlea.jpg)

In der frisch präparierten Cochlea (S1) fanden sich im **OC** besonders Gene, die wesentlich für die Ca^{2+} und K^+ -Homeostase („*S100 calcium binding protein A1*“ (*S100 a1*), „*ATPase, Ca²⁺-transporting, plasma membrane 2*“ (*Atp2b2*), „*Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16*“ (*Kcnj16*)) sowie Neurotransmission über GABA („*GABA B receptor 1*“ (*Gabbr1*)), Glutamat („*Glutamate receptor, ionotropic, 4*“ (*Gria4*)) und Acetylcholin („*Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 9*“ (*Chrna9*)) verantwortlich sind. Gene wie der „*Brain derived neurotropic*

factor“ (*Bdnf*), „*Neurotrophin 3*“ (*Ntf3*) und „*Insulin-like growth factor binding protein 3*“ (*Igfbp3*) sind an der Regulation von Wachstum und Reifung in diesem Entwicklungszeitraum beteiligt. Interessanterweise sind die typischen Eigenschaften des OC bereits am 3.-5. postnatalen Tag ausgeprägt.

Im **MOD** waren besonders Gene für die Entwicklung („*Vascular cell adhesion molecule 1*“ (*Vcam1*), „*Early growth response 1*“ (*Egr1*)), für die Reifung („*Synuclein alpha*“ (*Sncα*)) und für die Regulation neuronaler Strukturen („*Thyroid hormone receptor alpha*“ (*Thra*)) nachweisbar. Bemerkenswert ist auch die hohe Expression des „*Insulin-like growth factor 2*“ (*Igf2*). Insgesamt kann dies als Unreife des Spiralganglions am 3.-5. postnatalen Tag gewertet werden. Dies wird auch durch die Erkenntnis, dass Ratten wenige Tage nach der Geburt noch taub sind und erst dann die neuronale Vernetzung stattfindet, unterstützt. Ähnlich wie beim OC wurden Gene für die Signaltransduktion wie GABA („*GABA transporter protein*“ (*Gab1*)), Dopamin („*Dopamine receptor 1A*“ (*Dr1a*)) und Acetylcholin („*Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit mRNA*“ (*nAChA7*)) gefunden.

In der **SV** wurden überwiegend Gene exprimiert, deren Genprodukte der Sicherung der Ionenhomeostase (Kanäle für K^+ : „*Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1*“ (*Kcne1*), Kanäle für Ca^{2+} : „*Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit*“ (*Cacnb2*), ATPasen: „*ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1*“ (*Atp1a1*)) und der Durchblutung („*Nitric oxide synthase 2, inducible*“ (*Nos2*)) sowie dem Schutz vor Radikalen („*Superoxide dismutase 3*“ (*Sod*)), „*Transferin*“ (*Tf*), „*Heme oxygenase 1*“ (*Hmox1*)) dienen. Ebenso spielen Gene, die für den Glutamattransport („*Solute carrier family 1 glial high affinity glutamate transporter, member2*“ (*Slc1a2*)) und die Glutaminsynthese („*Glutamine synthetase 1*“ (*Glul*)) und damit für den Abbau des potenziell toxischen Glutamats in der SV verantwortlich sind, eine entscheidende Rolle.

4.6.2. Veränderung der Genexpression unter Kultivierung (S2)

Die Analyse der Genexpression während der Kultivierung zeigte unerwartet starke Veränderungen, sowohl quantitativ als auch qualitativ.

Betrachtet man die Veränderungen im **OC**, 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 wurden besonders Gene der Neurotransmission („*Tachykinin1*“ (*Tac1*), „*Syntaxin binding protein 1*“ (*Stxbp1*), „*Synuclein alpha*“ (*Snca*)) und der Signaltransduktion („*Neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2*“ (*Ntrk2*), „*S 100 protein, beta polypeptide*“ (*S100b*)). Insgesamt deuten die Veränderungen darauf hin, dass die Kultivierung mit einem Stresszustand verbunden ist, aber zugleich Wachstum und Entwicklung fortschreiten. Die hohe Expression der Gene des Kohlenhydrat-Stoffwechsels zeigt die Umstellung des Stoffwechsels auf anaerobe Glykolyse mit erhöhtem Glukoseverbrauch. Verglichen mit MOD sind die eigentlichen Stressgene in ihrer Expression nicht verändert, so dass man davon ausgehen kann, dass die Kulturbedingungen für das weitere Wachstum und die Differenzierung des OC adäquat sind. Der gute Zustand der Haarzellen in Anzahl und Form während der Kultivierung deutet ebenfalls darauf hin, dass die Kulturbedingungen adäquat sind, es gingen kaum Haarzellen während der 24-stündigen Kultivierung verloren.

Die stärksten Veränderungen in der Genexpression waren im **MOD** nachweisbar. Es ist bemerkenswert, dass keine Veränderungen von Genen, die in den Kohlenhydrat-Stoffwechsel involviert sind, stattfanden. Wahrscheinlich ist das Ausdruck für die Unreife des MOD, d. h., zu diesem Entwicklungszeitpunkt der Ratte liegt eine Expression vor, die typisch für die Fetalperiode ist und die stärker an anaerobe Bedingungen angepasst sind. Die hohe Expression der Cytokine, von Genen des Redoxstoffwechsels und von proapoptischen Genen zeigen, dass prinzipielle Veränderungen durch die Kultivierung des

Modiolus eintraten. Vor allem die Genveränderungen im Redoxstoffwechsel und die erhöhte Expression von pro-apoptischen Genen deuten auf eine Schädigung der Zellen des MOD hin. Dies wird auch durch die Veränderungen bei den runterregulierten Genen, die besonders die Gruppe des Wachstums- und Zytoskeletts, der Ionenkanäle, der Neurotransmission, Signaltransduktion und Transportproteinen betrafen, unterstützt. Wahrscheinlich ist das Ausdruck der nicht-optimalen Kulturbedingungen (Kulturbedingungen sind optimiert für das OC, MOD dickere Gewebeschicht). Spezifische Genveränderungen werden für den „*Fibroblast growth factor 5*“ (*Fgf5*), für „*Januskinase 2*“ (*Jak2*) und „*Phosphodiesterase 4b*“ (*Pde4b*) beobachtet. Die hohe Expression von *Fgf5* ist am ehesten Ausdruck für die Entwicklung des Mesenchyms, die von *Jak2* und *Pde4b* sind eher in die Schädigungskaskade involviert. Die starke Aktivierung von jenen Transkriptionsfaktoren, die charakteristisch für Zellproliferation und Differenzierung sind, deutet darauf hin, dass Wachstums- und Differenzierungsprozesse im MOD verstärkt stattfinden.

Betrachtet man die Genveränderungen in der SV, dann erkennt man, dass deren Muster der des OC entspricht. Aufgrund der morphologischen Struktur (Dicke der Gewebeschicht) der SV kann angenommen werden, dass die Kulturbedingungen für die SV adäquat sind. Stärkere Hochregulationen finden sich bei den Cytokinen und bei den Genen, die in den Redoxstoffwechsel involviert sind. Interessant ist, dass der „*Insulin-like growth factor binding protein 3*“ (*Igfbp3*) in der Expression verstärkt wurde, offensichtlich als Ausdruck für die Begrenzung des Wachstums. Die SV reagierte auch stark mit der Hochexpression von „*Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2*“ (*Enpp*), einer sehr spezifischen „*CCA/enhancer binding protein (C/EBP), beta*“ (*Cebpb*). Runterreguliert wurden einige Gene der Gruppe Ionenkanäle („*Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1*“ (*Kcne1*), „*Voltage-gated channel like 1*“ (*RGD:628710*)) und Neurotransmission („*GABA B receptor 1*“ (*Gabbr1*), „*Monoamine*

oxidase B“ (*Maob*)) als Zeichen einer Anpassung an eine veränderte Bedingung (Kultivierung).

Die insgesamt sehr starken Veränderungen innerhalb von 24 Stunden während der Kultivierung sind offensichtlich einerseits Ausdruck des traumatischen Stresses durch Präparation und Kultivierung, andererseits der normalen Entwicklungsprozesse, die aber unter Kulturbedingungen verändert ablaufen. Diese Schlussfolgerung wird durch folgende Charakteristika der Genveränderung unterstützt: A) In allen drei Regionen war eine starke Expression von Cytokinen und Stressproteinen zu beobachten. B) Die Genexpression im OC war im Wesentlichen charakterisiert durch die hohe Expression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels. C) Die Genexpression im MOD war sehr heterogen und umfasste wichtige Transkriptionsfaktoren und Gene des Apoptose- und Redoxstoffwechsels. D) Die Genexpression in der SV war vor allem charakterisiert durch Veränderungen von Genen des Redoxstoffwechsels. Es ist gut möglich, dass eine Hypoxie bei der Kultivierung vorliegt, die aber nicht toxisch auf Haarzellen wirkt, da das Cochleogramm normal war. Die in der Kultur vorhandene Hypoxie wird durch die Anpassung an den Glukosestoffwechsel vollständig kompensiert. Die breite und heterogene Expression im MOD ist am ehesten auf die Unreife am 3.-5. postnatalen Tag zurückzuführen und ist ebenfalls Ausdruck der fortgeschrittenen Entwicklung *in vivo*. Für die Funktion der SV scheint die hohe Expression von Genen des Redoxstoffwechsels von großer Bedeutung zu sein.

Für zukünftige Untersuchungen bedeutet das Vorsicht zu üben im Einsatz der organotypischen Kultur für Untersuchungen, die mit Schädigung, Toxinen und Sauerstoffmangel verbunden sind, weil immer Überlappungen zwischen dem Stress der Kultivierung und dem Stress durch die entsprechenden Noxen vorliegen. Um den normalen Entwicklungsprozess von dem des *in vitro* Prozesses abzugrenzen, sind vergleichbare Untersuchungen in frisch präparierter Cochlea notwendig (5.-7. postnataler Tag).

4.6.2.1. Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene unter Kultivierung

Aufgrund der besonderen Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die Anpassung an Hypoxie/Ischämie sollen im folgenden Abschnitt die Veränderungen der HIF-1-abhängigen Gene gesondert diskutiert werden. Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Punkte hervorheben: 1) Die SV wies in der frisch präparierten Cochlea (S1) die höchste Expression der HIF-1-abhängigen Gene auf (besonders *Slc2a1* und *Igfbp2*). 2) Unter Kultivierung werden zahlreiche HIF-1-abhängige Gene in der Cochlea hochreguliert.

Betrachtet man die Veränderungen der HIF-1-abhängigen Gene unter Kultivierung (Abb. 43), dann gibt es Gene, die mehr als 4fach ihre Expression veränderten (*Gapdh*, *Slc2a1*, *Igfbp2*, *Hmox1*, *Nos2*, *Tfrc*) und Gene, die sich 2,0- bis 3,9fach verändern (*Igfbp2*, *Igfbp3*, *Tf*). Zugleich gibt es auch HIF-1-abhängige Gene, deren Expression abfällt. Die Ursachen für die unterschiedlich starke Expression sind nicht bekannt. Möglicherweise liegt es an der Struktur des Promotors der Gene. So ist für die *Gapdh* bekannt, dass in der Promotorregion zwei HRE-Regionen vorliegen (Lu et al., 2002). Da HIF-1 ein wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Entwicklung ist, könnte das die starke Erhöhung von *Gapdh* unter Kultivierung erklären. Die Besonderheiten der Expression jener Gene, die mehr als 4fach ansteigen, sind im Abschnitt 3.6.5.1. beschrieben.

Analysiert man die durch die Kultivierung bedingten Veränderungen der HIF-1-abhängigen Gene (S2), so sind es folgende Gene, deren mRNA stark anstieg: 1) Gene für den Glukosestoffwechsel (*Gapdh*, *Slc2a1* besonders im OC), 2) *Hmox1* (OC, MOD, SV), 3) *Nos2* (besonders MOD und SV), 4) *Tfrc* (besonders MOD und SV), 5) *Igfbp2* und *Igfbp3*.

Die starke Veränderung HIF-1-abhängiger Gene durch Kultivierung wirft die Frage auf, ob die Kultivierung unter Normoxie mit einer Hypoxie verbunden ist. Die pO₂-Versorgung der Kultur erfolgt über Diffusion. Der zu erwartende pO₂ bedeutet für

Kulturen normalerweise keine Hypoxie. Nicht beantwortet werden kann die Frage, wie der pO_2 auf der Unterseite der Kultur ist. Hier ist durchaus möglich, dass eine Hypoxie vorliegt. Die Erstellung des Cochleogramms in Normoxie zeigte, dass die Kultivierung nicht unter pO_2 Werten liegt, die zum Haarzelltod führen. Daher, und da einige HIF-1-abhängige Gene unter Kultivierung runterreguliert werden, ist die hohe Expression der HIF-1-abhängigen Gene eher als Funktion im normalen Entwicklungsprozess, wie auch in der Plazenta beschrieben, einzuschätzen. Die Tatsache, dass die Prestin mRNA als wichtiges Kriterium der ÄHZ *in vitro* ähnlich anstieg wie *in vivo*, unterstützt die Annahme, dass die organotypische Kultur nicht mit O_2 -Mangel verbunden ist.

4.6.3. Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression (S3)

Die Analyse der Veränderungen der Genexpression nach Hypoxie zeigte, anders als die der Kultivierung, nur geringe Veränderungen. Änderungen um den Faktor $\geq 1,6$ und $\leq 0,5$ beinhalten eine geringere statistische Sicherheit als z. B. Änderungen um den Faktor $\geq 4,0$ und $\leq 0,25$ bei der Kultivierung. Entsprechend vorsichtig sind daher nachfolgende Ausführungen zu verstehen.

Betrachtet man die Veränderungen im OC der hochregulierten Gene, so zeigt sich nur eine Genveränderung beim „*Insulin-like growth factor 1 receptor*“ (*Igfr*). Trotz des quantitativ messbaren Haarzellverlustes im Cochleogramm unter Hypoxie ist nur eine geringe Hochregulation der Gene im OC festzustellen. Auch bei den runterregulierten Genen fällt nur das „*Neurofilament light polypeptide*“ (RGD: 621458) im OC auf. Offensichtlich sind durch die Kultivierung solche Veränderungen der Genexpression eingetreten, dass eine relativ milde Hypoxie zu keinen weiteren Veränderungen der Genexpression im OC führt. Interessant ist aber, dass es dennoch zu einem deutlichen Verlust von Haarzellen im Cochleogramm kommt. Für den durch die Hypoxie induzierten

Haarzelltod sind wahrscheinlich Veränderungen auf der Aktivitätsebene der Proteine verantwortlich.

Die häufigsten Veränderungen in der Genexpression unter Hypoxie zeigten sich im MOD. Sowohl die Wachstumsfaktoren „*Insulin-like growth factor 2*“ (*Igf2*), „*Fibroblast growth factor*“ (*Fgf2*), eine Reihe von Ionenkanälen wie „*Sodium channel, voltage-gated, type III, alpha polypeptide*“ (*Scn3a*), „*Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1*“ (*Kcnj1*), „*ATPase, Ca²⁺ transporting*“ (*Atp2a3*) als auch Gene der Neurotransmission wie „*Cholinergic receptor, muscarinic 2*“ (*Chrm2*), „*Glutamate receptor, metabotropic 6*“ (*Grm6*) wurden im MOD hochreguliert. Bei den runterregulierten Genen unter Hypoxie fallen die Gruppe der Cytokine (*Il1b*) und die der Transkriptionsfaktoren (*Crem*) auf. Insgesamt überwiegt im MOD unter Hypoxie die Hochregulation von Genen. Wie unter Kultivierung zeigt diese Hochregulation, dass unter Hypoxie weitere prinzipielle Veränderungen im MOD eintreten. Der MOD scheint in diesem Entwicklungsstadium sehr anpassungsfähig zu sein.

Die Genveränderung in der Hochregulation in der SV betrafen überwiegend Transkriptionsfaktoren („*Cbp/p300-interacting transactivator*“ (*Cited2*), „*Neuronal d4 domain family member*“ (*Neud4*), „*Jun-B oncogen*“ (*Junb*)) und Ionenkanäle („*ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 2 polypeptide*“ (*Atp1a2*), „*Voltage-dependent anion channel 1*“ (*Vdac1*), „*Voltage-gated channel like 1*“ (RGD:628710)). Die stärksten Veränderungen bei den runterregulierten Genen waren in der SV nachweisbar. Dies betraf überwiegend Gene der Gruppe der Cytokine („*Interleukin 1b*“ (*Il1b*), „*Interleukin 8*“ (*Il8*), „*Interleukin 15*“ (*Il15*), „*Chemokine (C-C motif) ligand 3*“ (*Ccl3*), „*Complement component 9*“ (*C9*)) und der Gruppe des Redoxstoffwechsels („*Heme oxygenase 1*“ (*Hmox1*), „*Glutathion-S-Transferase A5*“ (*Gsta5*)). Dies ist wahrscheinlich Ausdruck der schnellen Anpassung im Rahmen der Hypoxie.

Da Hypoxie zu Schwerhörigkeit führen kann, sind die beobachteten Genveränderungen im Neurotransmittersystem von hohem Interesse. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.6.4. Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene unter Hypoxie

Die durch Hypoxie induzierten Veränderungen (S3) der HIF-1-abhängigen Gene sind ebenfalls sehr gering. Unter der Annahme eines VK von $\pm 30\%$ sind als sichere Veränderungen der Anstieg von *Igf2* im MOD und der Abfall der *Hmox1* in der SV anzusehen (vergleiche Ergebnisse, Abschnitt 3.6.6.). *Igf2* wird bemerkenswert hoch exprimiert. Es ist gut bekannt, dass IGF-Proteine protektiv im Innenohr wirken. Die relativ geringen Veränderungen der Genexpression durch Hypoxie lassen sich durch mehrere Faktoren erklären. A) 5 Stunden dauernde Hypoxie ist relativ mild. B) Die Kinetik der Expression der einzelnen Gene ist sehr unterschiedlich, so dass das Expressionsspektrum bei einem Untersuchungszeitpunkt nicht komplett dargestellt werden kann. C) Die Analyse der HIF-1-abhängigen Gene und die geringe Veränderung unter Hypoxie zeigen, dass die Existenz einer HRE-Sequenz im Promotor nicht automatisch mit einer Hochregulation der mRNA verbunden ist. D) Da HIF-1 auch eine Funktion in der Entwicklung von Zellen hat, sind die unter Hypoxie beobachteten Veränderungen das Ergebnis des Zusammenwirkens von Veränderungen durch Kultivierung und Hypoxie. Für die Analyse der reinen Hypoxie bedingten Veränderungen ist wahrscheinlich ein *in vivo* Modell besser geeignet.

4.7. Analyse der Prestinexpression

Unsere Untersuchungen ergaben zwei Schlussfolgerungen: 1) Der Prestin mRNA Gehalt im Organ Corti der neugeborenen Ratte steigt während der *in vitro* Entwicklung um den Faktor zwei an. Diese Zunahme ist mit der Herausbildung eines apikal-basalen Gradienten verbunden, wobei apikal der höchste mRNA Gehalt vorliegt. 2) Ischämie und Hypoxie

führen zu einer Abnahme des Prestin mRNA Gehaltes parallel zum ÄHZ-Verlust. Dies bestätigt, dass der Prestin mRNA Gehalt als ein Indikator für den ÄHZ-Schaden oder Verlust angesehen werden kann.

Die entwicklungsbedingte Zunahme des Prestin mRNA Gehaltes *in vitro* und *in vivo* wird auch durch immunhistochemische Untersuchungen und *in situ* Hybridisierung von Belyantseva et al. (2000) bestätigt. Zum Zeitpunkt der Geburt sind Ratten unreif, blind und taub. Hirnstammpotenziale können bei Ratten nicht vor der zweiten postnatalen Woche registriert werden (Kennedy et al., 2003). Während der frühen Entwicklung wurden eine Vielzahl von Veränderungen an den ÄHZ, wie Expression des Motor Proteins Prestin (Belyantseva et al., 2000; Judice et al., 2002; Oliver und Fakler, 1999) und die Längenzunahme der ÄHZ (Kennedy et al., 2003) festgestellt. Prestin konnte bereits um den zweiten postnatalen Tag in der lateralen Wand nachgewiesen werden und die Nachweisintensität erreicht ab dem 9.-12. postnatalen Tag das Maximum. Dabei korreliert der immunhistochemische Nachweis von Prestin mit der Elektromotilität der ÄHZ (Belyantseva et al., 2000). Der Prestin mRNA Gehalt nimmt von apikal nach basal um den Faktor zwei ab. Dieser Gradient wird auch durch Untersuchungen von Judice et al. (2002), der einen longitudinalen Gradienten für die Prestin-Expression in der *in situ* Hybridisierung fand, bestätigt.

Unter Hypoxie/Ischämie ist der ÄHZ-Verlust mit der Abnahme des Prestin mRNA Gehaltes verbunden. Für den Fall, dass der Prestin mRNA Gehaltes parallel mit dem ÄHZ-Verlust abnimmt, kann postuliert werden, dass der Prestin mRNA Abfall durch abgestorbene ÄHZ resultiert. Da aber die Abnahme des Prestin mRNA-Gehaltes um 35 % und der Verlust der ÄHZ bei 20 % liegt, scheint der Abfall auch über die Transkription reguliert zu werden. Diese Annahme wird auch den dramatischen Prestin mRNA Abfall unter lang anhaltender Hypoxie unterstützt. Weitere Untersuchungen auch im Hinblick auf die Protein-Ebene sind zur vollständigen Klärung dieser Ergebnisse notwendig.