

Aus dem Molekularbiologischen Forschungslabor und Tinnituszentrum
der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Genexpressionsmuster von Prestin und ausgewählten Transkriptions-
faktoren im Cortischen Organ postnataler Ratten*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Angerstein

aus Potsdam

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. B. Mazurek
 2. Prof. Dr. M. Knipper
 3. Prof. Dr. med. C. Matthias

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vom Schall zum Ton	1
1.2	Die Haarzellen	4
1.3	Das Motorprotein der äußeren Haarzellen - Prestin	4
1.3.1	Die Expression von Prestin	6
1.4	Transkription und Genexpression	6
1.4.1	Steuerung der Genexpression	7
1.4.2	Charakterisierung der ausgewählten Transkriptionsfaktoren	11
1.5	Tinnitus und Schwerhörigkeit	16
1.6	Die organotypische Kultur als Modell	16
1.7	Die Koexpressionsanalyse	17
1.8	Aufgabenstellung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien und Substanzen	20
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2	Zellkulturmedium	20
2.1.3	Puffer und Lösungen	21
2.1.4	Verwendete Geräte	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Präparation des Cortischen Organs	24
2.2.2	Die Präparation ohne Limbus	25
2.2.3	Darstellung der Haarzellen mittels Rhodamin-Phalloidin-Färbung	25
2.2.4	Zu den Versuchsansätzen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs	26
2.2.5	RNAlater und anschließende RNA-Isolation	27
2.2.6	Quantifizierung der RNA	28
2.2.7	Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	29
2.2.8	Kalibrator	30
2.2.9	Quantifizierung der mRNA	31
2.2.10	Gelelektrophorese und Dokumentation	32

2.2.11	Methode der computerbasierten Analyse der Promotoren	33
2.3	Statistik	36
2.3.1	Methodische Varianz	36
2.3.1	Statistische Auswertung	38
2.3.1	Qualitätskontrolle der Probenkonservierung	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Die postnatale Entwicklung	40
3.1.1	Betrachtung der Haarzellen	40
3.1.2	Entwicklung von RNA-Gehalt und Tbp mRNA Expression im Cortischen Organ	42
3.1.3	Entwicklung von der mRNA-Expression von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren	43
3.2	Veränderung der Expression von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren in der organotypischen Kultur unter verschiedenen experimentellen Bedingungen	46
3.2.1	Anzahl der Haarzellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen	46
3.2.2	Die normale 48h-Kultur	48
3.2.3	Kultivierung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.	50
3.3	Korrelation	58
3.4	Vergleich der Genexpression	59
3.5	Untersuchungen zur regionalen Verteilung der Transkriptionsfaktoren	60
3.5.1	Die Verteilung von RNA und Tbp im Cortischen Organ und Limbus	60
3.5.1	Verteilung der Transkriptionsfaktoren im Cortischen Organ und Limbus	61
4	Diskussion	65
4.1	Referenzsysteme	65
4.2	Zur Verteilung von RNA und mRNA auf das Cortische Organ und den Limbus	67
4.3	Der apikal-basale Gradient	68
4.4	Die Koexpression von Prestin und untersuchten Transkriptionsfaktoren	71
4.4.1	Prestin und Pou4f3	71
4.4.2	Prestin und C/ebp β	72
4.4.3	Prestin und Sp1	73
4.4.4	Prestin und Carf	74

4.4.5	Prestin und Creb	75
4.5	Computerbasierte Analyse der Promotoren	77
4.5.1	Promotorbereiche	77
4.5.2	In silico Analyse von Transkriptionsbindungsstellen	78
5	Bedeutung der Untersuchung und Schlussfolgerungen	81
6	Zusammenfassung	83
	Literaturverzeichnis	85
	Abkürzungsverzeichnis	95
	Abbildungs- und Diagrammverzeichnis	98
	Tabellenverzeichnis	101
	Eidesstattliche Erklärung	A
	Danksagung	B
	Lebenslauf	C
	Publikationen	D

1 Einleitung

1.1 Vom Schall zum Ton

Unsere Umwelt umgibt uns permanent mit akustischen Signalen. Durch unser Gehör sind wir in der Lage, diese trotz unterschiedlichster Art und Intensität wahrzunehmen und auszuwerten. Das kindliche, unbeschädigte Gehör des Menschen kann Frequenzen zwischen 20 Hz - 20.000 Hz registrieren, die sich in ihrer Intensität um den Faktor eine Million unterscheiden können. Trotz dieses großen Wahrnehmungsbereiches ist es dem menschlichen Gehörsinn möglich, Frequenzunterschiede im Bereich von 0,1 % wahrzunehmen (Dallos, 1996). Hierbei registrieren die Hörsinneszellen Bewegungsänderungen, deren Amplitude sich im subatomaren Bereich befindet (Sellick et al., 1982).

Erst das funktionell aufeinander abgestimmte Zusammenwirken von Außen-, Mittel- und Innenohr ermöglicht diese beeindruckende Fähigkeit. So führt die Form der Ohrmuschel zu einer Fokussierung des Schalls auf den Gehörgang. An dessen Ende wird das Trommelfell in Schwingung versetzt. Durch die Gehörknöchelchenkette erfolgt die Übertragung der Schallenergie vom Trommelfell auf das ovale Fenster des Innenohres. Durch die unterschiedliche Größe von Trommelfell (60 mm²) und Stapesfußplatte (3 mm²) und dem daraus resultierenden Größenverhältnis von 20:1 sowie durch die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen und des Trommelfells (etwa zweifach) kommt es zu einer 40fachen Verstärkung des Schalldrucks beim Übergang auf die Perilymphe der *Cochlea* („Schnecke“) im Innenohr. Bei einem Defekt in der Fortleitung entsteht ein Hörverlust von 60 dB (Drenckhahn, 2004).

Das Innenohr befindet sich im Inneren des Felsenbeins. Das von festem Knochen umgebene Labyrinth enthält ein mehrteiliges, mit Perilymphe gefülltes Gangsystem, das die Sinnesepithelien des Gleichgewichtsorgans und des Hörsinnes enthält. Dabei befinden sich im Vorhof- und Bogenganglabyrinth die Anteile des Gleichgewichtsorgans (*Labyrinthus vestibularis*), wohingegen das Schneckenlabyrinth (*Labyrinthus cochlearis*) die akustischen Sinnesepithelien enthält (Drenckhahn, 2004). Dieses verläuft im Schneckenkanal, der sich beim Menschen in zweieinhalb Drehungen um die zentrale Schneckenwindel (Modiolus) windet, in dem die einzelnen Nervenfasern zur Schneckenbasis zurücklaufen. Der Kanal besteht zum einen aus dem die Sinneszellen enthaltenden, mittig liegenden *Ductus cochlearis* (*Scala media*), der an der Schneckenbasis beginnt und blind an der Schnecken spitze endet. Zum anderen verlaufen dazu parallel die *Scala vestibuli*, die über das ovale Fenster mit dem Vestibulum verbunden ist, und die *Scala*

tympani, die über das runde Fenster von der Paukenhöhle getrennt ist. Beide *Scalae* kommunizieren an der Schneckenspitze (*Helicotrema*) miteinander (Drenckhahn, 2004).

Der *Ductus cochlearis* hat einen dreieckigen Querschnitt (Abb. 1). Den Boden bildet die kollagenfaserreiche Basilarmembran (*Membrana basilaris*), auf der das Cortische Organ aufsitzt und den *Ductus cochlearis* von der *Scala tympani* trennt (Drenckhahn, 2004). Medial wird der *Ductus cochlearis* von der *Scala vestibuli* durch die Reissner-Membran abgetrennt. Lateral grenzt der *Ductus cochlearis* an das bindegewebige Spiralband, welches die gefäßreiche *Stria vascularis* enthält und den Gang am Periost der Schneckenkapsel befestigt.

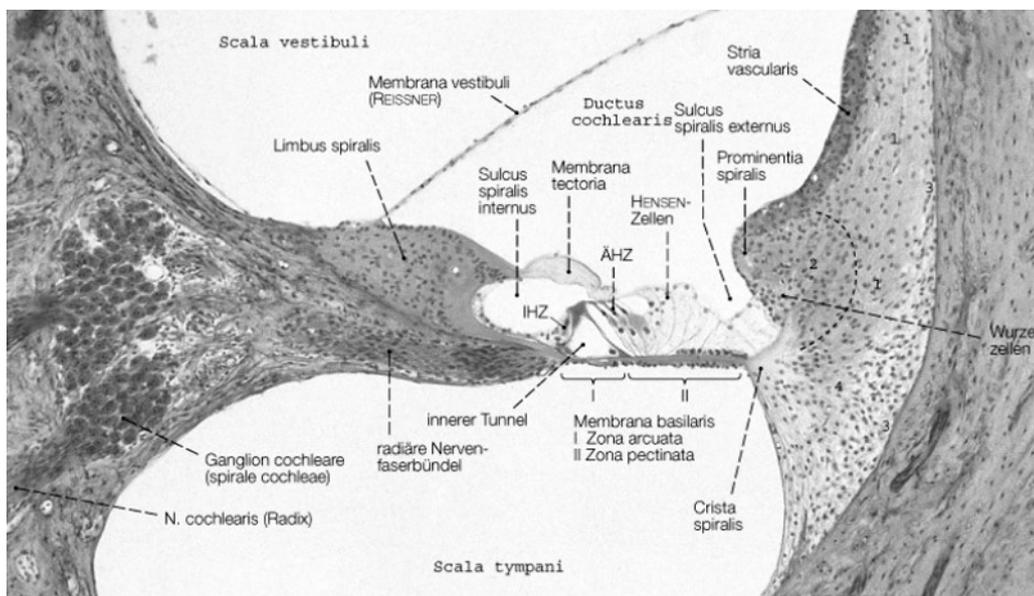


Abb. 1: Querschnitt durch den Schneckengang. Dargestellt sind die drei *Scalae* der Cochlea, zentral das Cortische Organ mit den inneren (IHZ) und äußeren Haarzellen (ÄHZ) auf der Basilarmembran liegend, (links) der Limbus spiralis und (rechts) die *Stria vascularis* (Aus Benninghoff und Drenckhahn, 2004 S.726, mit freundlicher Genehmigung).

Die auf die Perilymphe übertragenen Druckstöße deformieren den *Ductus cochlearis*, wodurch die Basilarmembran in Schwingung versetzt wird. Da diese nach apikal hin in ihrer Steifigkeit ab- und an Breite zunimmt, ändert sich deren Massenträgheit und führt zu einer frequenzabhängigen Wanderung der Druckwelle von basal nach apikal mit einer ortsspezifischen maximalen Auslenkung der Basilarmembran. Die Bewegung der Basilarmembran wird über die Stützzellen

und die Tektorialmembran auf die an diesem Ort vorhandenen Haarsinneszellen übertragen (siehe Abb. 2) und führt damit zu einer mechanischen Frequenzanalyse der Schnecke (Ashmore, 2008; Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

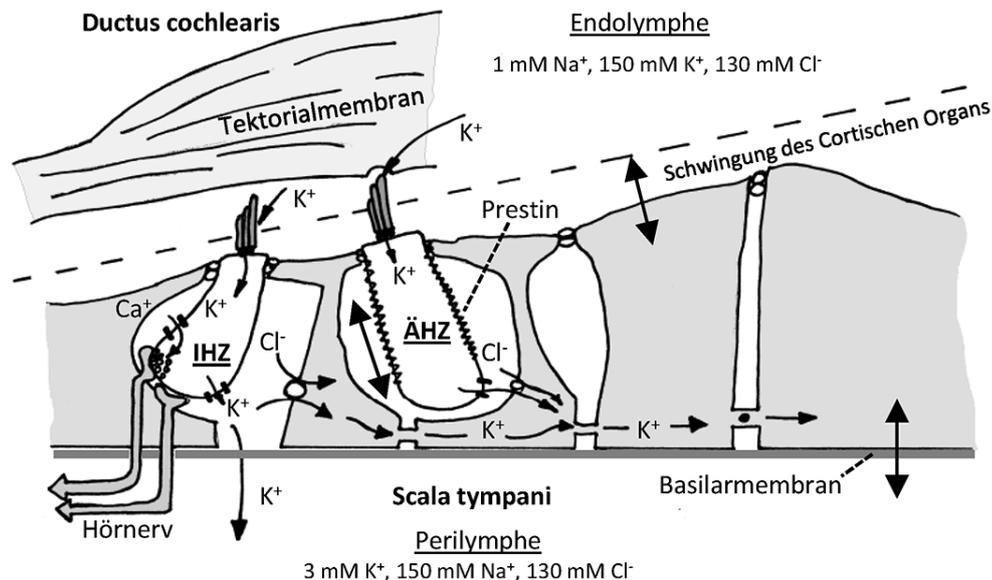


Abb. 2: Verteilung der Kaliumkonzentration im Cortischen Organ. Dargestellt sind die Konzentrationen von Kalium in der Endolymphe, Perilymphe sowie der Transport und Verlauf des Kaliums (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Die Ionenzusammensetzung der Flüssigkeit im Ductus cochlearis, genannt Endolymphe, und die der angrenzenden *Scalae tympani et vestibuli*, genannt Perilymphe, unterscheiden sich deutlich (siehe Abb. 2). Während die Perilymphe der Extrazellulärflüssigkeit entspricht (150 mM Na^+ , 3 mM K^+ , 130 mM Cl^-), finden sich in der Endolymphe eine hohe Kalium- (150 mM) und Chloridkonzentration (130 mM) sowie eine geringe Na^+ -Konzentration (1 mM). Durch den hohen Gehalt der Na^+ - K^+ -ATPase und Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter der Stria vascularis werden ständig aktiv Kaliumionen in die Endolymphe und Natriumionen herausgepumpt (Drenckhahn, 2004). Durch diese unterschiedliche Konzentrationsverteilung kommt es zwischen den Haarzellen und der Endolymphe zu einer Potentialdifferenz von $+155 \text{ mV}$, was die treibende Kraft für den Kaliumstrom in die Haarzellen ist. Durch Bewegung der Stereozilien kommt es zu einer mechanischen Öffnung der Kaliumkanäle in den Stereozilien, wodurch Kalium, dem Potential

folgend, in die Stereozillien einströmt. Dies führt zu einer Depolarisation der Haarzelle. Nach der Depolarisation verlässt Kalium, dem Konzentrationsgradienten zur Perilymphe folgend, die Haarzellen durch basal sitzende KCNQ4-Kaliumkanäle (Wangemann, 2002).

1.2 Die Haarzellen

Die Haarzellen im Innenohr werden dem Neuroepithel zugeordnet. An ihnen findet die Signaltransduktion der mechanischen Schallwelle zu einem elektrischen Signal statt. In der Cochlea des Menschen gibt es zwei Arten von Haarzellen: eine Reihe von etwa 3500 inneren Haarzellen und etwa 11000 äußere Haarzellen in drei bis vier Reihen (Ashmore, 2008). Beide Arten von Haarzellen sind zahlreich innerviert. Die sensorischen IHZ werden am basalen Zellkörper afferent innerviert, wobei Glutamat als Transmitter von ionotropen AMPA-Glutamatrezeptoren die Typ-1-Ganglienzellendriten erregt. Die äußeren Haarzellen hingegen werden stärker efferent innerviert und haben an der Zellbasis eine große Anzahl cholinergischer und GABAerger Synapsen (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Aus der aktiven Kontraktion der ÄHZ kommt es zu einer lokalen Auslenkung der Basilarmembran (Dallos, 1992). Dabei sind die ÄHZ in der Lage, ihre Zelllänge um bis zu 5 % ihrer Gesamtlänge zu verändern (Kachar et al., 1986). Ein Verlust der äußeren Haarzellen geht mit einer Absenkung der Hörschwelle um 30 - 50 dB einher (Ryan und Dallos, 1975). Es werden zwei mögliche Formen der Längenänderung bei äußeren Haarzellen beschrieben. Die langsame Form dauert Sekunden bis Minuten und wird *in vitro* über eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium- (Ca^{2+}) -Konzentration hervorgerufen. Die schnelle Form der Längenänderung erreicht Frequenzen bis zu 100 kHz und ist unabhängig von Adenosintriphosphat (ATP) und Ca^{2+} (Puschner und Schacht, 1997). Hierbei kommt es während der Depolarisation zu einer Verkürzung und während der Hyperpolarisation zu einer Verlängerung des Zellkörpers.

1.3 Das Motorprotein der äußeren Haarzellen - Prestin

Prestin wurde als das Motorprotein der äußeren Haarzellen identifiziert (Zheng et al., 2000). Es ist in hoher Konzentration ausschließlich in der lateralen Wand der äußeren Haarzellen vorhanden (Belyantseva et al., 2000; Yu et al., 2006). Dort bildet es im Durchmesser 8 - 10 nm große Partikel (Ashmore, 2008) mit einer Dichte von etwa $2500/\mu m^2$ (Kalinec et al., 1992). Mit seiner Fähigkeit zur frequenzsynchronen Kontraktion unterstützt es die ortsspezifische Vibration der

Basilarmembran und führt so zu einer gesteigerten Hörsensitivität und Frequenzselektivität (Ashmore, 2008; Dallos, 1992; Zhao und Santos-Sacchi, 1999).

Das menschliche Prestin-Gen gehört zur Familie der Anionen-Bikarbonat-Transporter SLC26 A5. Es liegt beim Menschen auf Chromosom 7 an Position 7q22.1 und besteht aus 21 Exons (Ashmore, 2008). Das Protein Prestin besteht aus 744 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 81,4 kDA (Ashmore, 2008). Es ist ein integriertes Membranprotein (Adler et al., 2003) mit wahrscheinlich 12 Transmembrandomänen und dem N- und C-Terminus, auf der intrazellulären Seite gelegen (Bai et al., 2009). Die Struktur des Proteins ist evolutionär hochkonserviert und das Gen ist in vielen Spezies mit dem Hören assoziiert (Weber et al., 2003). Evolutionär ist eine inverse Verteilung der Funktion von Prestin als Anionentransporter oder Motorprotein zu sehen. So dominiert bei Zebrafisch und Huhn die Transporterfunktion, wobei es zu keiner somatischen Motilität und nur zu einer geringen Ausbildung der nicht-linearen Kapazität (NLK) kommt (Tan et al., 2010). Bei Schnabeltier und Rennmaus (Gerbil) konnte gezeigt werden, dass die motorische Funktion des Proteins dominiert, während die Anionentransporterfunktion nur schwach ausgebildet ist. Die Aminosäuresequenz von Prestin liefert keinen Hinweis auf eine bekannte Region eines Spannungssensors innerhalb der Proteinstruktur (Ashmore, 2008). Die einfachste Vorstellung der Funktion von Prestin geht auf die Wirkungsweise eines Protein-Chlorid-Transporters zurück (Oliver et al., 2001). Der bestimmende Anteil für die Motorfunktion in der Proteinstruktur befindet sich zwischen den Aminosäuren 150 und 180 und ist 11 Aminosäuren lang (Tan et al., 2010). Über die STAS- (*Sulfattransporter und Anti-Sigma Faktor-Antagonist*)-Domäne am C-Terminus des Proteins ist Prestin mit dem Mikrotubuli-assoziierte-Protein-1S (MAP1S) verbunden. Diese Interaktion erhöht die Konzentration von Prestin in der Zellmembran um den Faktor 2,7 (Bai et al., 2010).

Weiterhin besitzt das Protein modifizierbare Aminosäuren. Durch die Proteinkinase G (PKG) ist eine cGMP-abhängige Phosphorylierung an Serin 238 und Threonin 580 möglich (Deak et al., 2005). Des Weiteren besitzt Prestin zwei potentielle Glykosylierungsstellen an Aminosäureposition N133 und N166 (Rajagopalan et al., 2010). Sowohl für die Phosphorylierungsstellen als auch für die Glykosylierungsstellen konnte gezeigt werden, dass sie Einfluss auf die nichtlineare Kapazität (NLK) von Prestin und damit seine Funktion haben.

1.3.1 Die Expression von Prestin

Bei der Ratte ist Prestin ab der Geburt in der lateralen Zellmembran der äußeren Haarzellen nachweisbar (Oliver und Fakler, 1999). Zwischen dem 6. und 9. postnatalen Tag kommt es zu einer starken Zunahme von Prestin in der lateralen Zellwand, begleitet von einer parallelen Zunahme der Elektromotilität. Mittels immunologischer Markierung konnte gezeigt werden, dass Prestin seine endgültige Fluoreszenzstärke im basalen Segment am postnatalen Tag 9, im medialen am PT 10 - 11 und im apikalen Segment am PT 12 erreicht (Belyantseva et al., 2000). Es bedarf somit etwa 2 Wochen für die strukturelle und funktionelle Reifung des Cortischen Organs. Auch auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass es postnatal zwischen Tag 3 und 7 zu einem Anstieg des Prestin-mRNA-Gehaltes apikal um den Faktor 7 und basal um den Faktor 2 kommt (Gross et al., 2005). Dabei bildet sich ein apikal-basaler Gradient aus mit der höchsten Expressionsstärke im apikalen und der niedrigsten im basalen Bereich.

In vorherigen Arbeiten wurde bei der Maus die Promotorregion von Prestin untersucht. Hier zeigten sich in einer *in silico*-Analyse typische Elemente der Core-Promotorregion, z. B. eine GC-Box an Position -58 Bp von ATG und eine TATA-Box -300 Bp von ATG. Mit dem Programm Mat-Inspector wurden die 500 Bp vor dem Exon 1 analysiert und potentielle Bindungsstellen für GATA3, RREB-1 und Brn-2 gefunden (Zheng et al., 2003). Thyroxin stimuliert die Prestinexpression über die Bindung an den Thyroxinrezeptor TR β (Weber et al., 2002). Unter Abwesenheit von Schilddrüsenhormon kommt es zu einer Reduktion der Prestin-Expression auf mRNA und Proteinebene (Winter et al., 2006). Allerdings wird Prestin weiterhin exprimiert, was zeigt, dass die basale Transkription von Prestin unabhängig von Schilddrüsenhormonrezeptorkomplexen ist. In der *in silico*-Analyse der 5'-UTR (untranslatierte Region) 1500 Basenpaare vor ATG von Prestin der Ratte mittels MATINSPECTOR (Version 2.2) wurde von Weber et al., (2002) an Position -416 Bp von ATG eine TRE-Bindungsstelle (*thyroidhormon response elements*) bestimmt und experimentell bestätigt.

1.4 Transkription und Genexpression

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie besagt, dass der Fluss der genetischen Information von der DNA über die RNA zu den Polypeptiden, später Proteinen, verläuft. Dies geschieht in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Zuerst wird in der Transkription mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase im Zellkern, und begrenzt auch in den Mitochondrien, die DNA

abgelesen und in einen komplementären RNA-Strang umgeschrieben. Anhand dieser Vorlage wird bei der Translation an den Ribosomen der Zelle eine Polypeptidkette gebildet. Hierbei codieren immer drei Nucleotide der RNA, sogenannte Codons, eine Aminosäure. Es wird allerdings nur ein kleiner Teil der in der Transkription entstehenden RNA auch in Protein translatiert. Einerseits erfährt das Primärtranskript der Transkription noch eine Prozessierung, in der nicht-codierende Abschnitte (Introns) herausgeschnitten werden. Andererseits gibt es noch weitere funktionelle RNA-Arten, die spezifische Funktionen haben, wie z. B. Transfer-RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA), „*small-nuclear*“ RNA (snRNA) und „*small interfering*“ RNA (siRNA). Letztere ist in der Lage, durch komplementäre Bindung an DNA und mRNA die Ableitung zu unterdrücken (Czech und Hannon, 2011).

1.4.1 Steuerung der Genexpression

Die Genexpression wird wesentlich über Proteinfaktoren gesteuert, die an regulatorische Nukleinsäuresequenzen in der DNA binden. Diese Sequenzen können in unmittelbarer Nähe zum Startpunkt der Transkription oder auch innerhalb eines Gens liegen (Venters und Pugh, 2009). Der wichtigste Ansatzpunkt in der Regulation der Genexpression liegt in der Initiierung der Transkription (Strachan und Read, 2005).

1.4.1.1 Promotorbereiche

Eine wichtige Eigenschaft regulatorischer Segmente der DNA ist das Vorhandensein von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression regulieren. Diese regulatorischen Einheiten nehmen einen relativ kleinen Platz im Genom ein (Pares-Matos et al., 2006). Die RNA-Polymerase II benötigt die Unterstützung allgemeiner Transkriptionsfaktoren, wie dem TATA-box bindenden Protein (Tbp) und Tbp assoziierte Faktoren (TAF), mit denen sie den Transkriptionsinitiationskomplex bildet. Die Gene werden abhängig vom Core-Promotor kontinuierlich mit einer geringen Transkriptionsrate abgelesen, die durch weitere positive Regulatioselemente (Enhancer) erhöht oder negative (Silencer) erniedrigt werden kann.

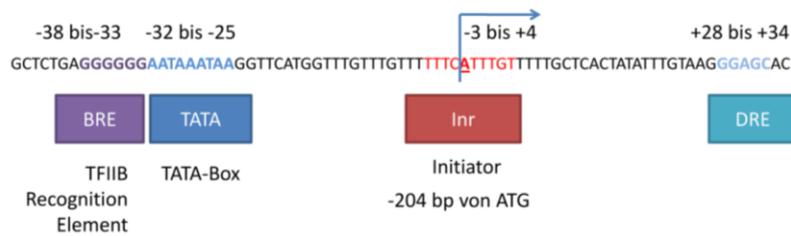


Abb. 3: Core-Promotor von Prestin der Ratte. Dargestellt ist die 5'-UTR von Prestin (Ratte) im Bereich von -250 bis -168 Bp vor ATG mit den Elementen des Core-Promotors nach Butler und Kadonaga (2002). BRE – „*TFIIB recognition element*“ [Transkriptionsfaktor IIB Erkennungselement], TATA-Box, Inr – „Initiator“ [Initiator], DRE – „*downstream core promoter element*“ [abwärtsgelegene Kernpromotorelement]. Nach Butler und Kadonaga (2002) auf die 5'-UTR von Prestin (Ratte) angewandt.

Der Core-Promotor ist der minimale kontinuierliche Abschnitt der DNA, der in der Lage ist, die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II zu veranlassen (Butler und Kadonaga, 2002). Er besteht aus charakteristischen Elementen, die in Abb. 3 dargestellt sind. Es wird angenommen, dass zwischen 200 und 300 Transkriptionsfaktoren an den Core-Promotor binden. Dies sind z. B. Untereinheiten der RNA-Polymerase sowie der Transkriptionsfaktor IID, der bei den meisten Protein-codierenden Genen zur Initiation der Transkription benötigt wird (Farnham, 2009). Dieser Komplex wird als basale Transkriptionsmaschine bezeichnet.

Der proximale Promotor liegt zwischen -250 Bp und +250 Bp, vom Initiationsstartpunkt aus gesehen, entfernt (Butler und Kadonaga, 2002). Typischerweise binden hier ubiquitäre Transkriptionsfaktoren wie Sp1, das 100 Bp vor dem Transkriptionsstartpunkt (TSP) mehrere Bindungsstellen hat (Gidoni et al., 1984), und CCAAT-Elemente, die typischerweise -75 Bp vor dem TSP liegen (Jones et al., 1985; Santoro et al., 1988). Diese Faktoren modulieren das Grundniveau und wirken als Enhancer (Strachan und Read, 2005). Weiter entfernte Regulationselemente gehören zur distalen Promotorregion.

Enhancer können vom Transkriptionsstartpunkt weit entfernt liegen und sind von der Orientierungsrichtung der DNA-Stränge unabhängig (Strachan und Read, 2005). Sie enthalten auf einer Länge von 200 - 300 Bp mehrere Elemente, die von ubiquitären und gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Sie können unter anderem auch Bindungsstellen für CCAAT und Sp1 enthalten (Martin, 2001). Silencer verringern die basale Transkriptionsrate des Core Promotors (Ogbourne und Antalis, 1998). Responseelemente beeinflussen die Transkription auf spezifische äußere Reize. Sie liegen stromaufwärts in kurzer Entfernung (etwa 1 kB). Des Weiteren

ren gibt es Abgrenzungselemente in der DNA, die in der Lage sind, die Ausbreitung von Effekten durch Enhancer zu begrenzen, wenn sie zwischen Enhancer und Promotoren liegen (Bell et al., 2001). Damit können Enhancer-Wirkungen lokal eingedämmt werden. Durch Methylierung dieser DNA-Bereiche kann die Wirkung der Abgrenzungsbereiche aber auch gehemmt werden (Bell et al., 2001).

1.4.1.2 Transkriptionsfaktoren

1.4.1.2.1 Regulatorische Proteine

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die in der Lage sind, spezifisch an kurze Nukleotidsequenzen der DNA zu binden. Dies geschieht über Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Transkriptionsfaktoren und den Nukleotiden der DNA. Es wird angenommen, dass es unter den 30000 menschlichen Genen etwa 1700 – 1900 Transkriptionsfaktor-codierende Gene gibt, von denen im Jahre 2009 erst 62 experimentell auf ihre DNA-Bindung und regulatorische Funktion hin untersucht worden sind (Vaquerizas et al., 2009). So gibt es 200 – 300 Komponenten für die basale Transkription und 2000 - 3000 sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (Lander et al., 2001). Diese werden auf geringerem Niveau exprimiert als ihre Zielgene, wodurch die Spezifität der Bindungsstelle steigt, da weniger affine Stellen nicht gebunden werden (Brivanlou und Darnell, 2002).

Transkriptionsfaktoren binden relativ kurze Zielsequenzen, die bei Prokaryonten durchschnittlich 25 Bp und bei *Drosophila* etwa 13 Bp lang sind (Georges et al., 2010). Durch Dimerisierung der Faktoren wird die Bindungsstärke zur DNA sehr viel stärker und spezifischer. So haben Schilddrüsenhormon, Vitamin D3 und Retinsäure ähnliche Bindungssequenzen und hauptsächlich der Abstand der Halbbindungsstellen bestimmt die Bindungsaffinität des einzelnen Faktors (Umesono et al., 1991).

Transkriptionsfaktoren enthalten häufig zwei funktionell unterschiedliche Einheiten. Zum einen die Aktivierungsdomäne, mit der die Faktoren in der Lage sind, über Interaktion mit dem Transkriptionsinitiationskomplex die Transkription zu stimulieren. Zum anderen besitzen sie eine DNA-Bindungsdomäne, mit der sie in der Lage sind, über konservierte Struktur motive spezifisch an die Zielgene zu binden. Transkriptionsfaktoren können aktuell in vier große Familien eingeteilt werden: (I) das Leucin-Zipper-Motiv, (II) das Helix-Loop-Helix-Motiv, (III) das Helix-Turn-Helix-Motiv und (IV) das Zinkfingermotiv. Der Leucin-Zipper bildet über seinen leucinhaltigen

helikalen Bereich Y-förmig Homodimere aus und bindet über die polaren Arme an die DNA. Beim Zinkfingermotiv wird ein Zink-Ion über vier Aminosäuren gebunden, die dadurch eine Schleife bzw. einen Finger bilden. Durch eine α -Helix kommt es dann zur Bindung an die große Furche der DNA (Johnson und McKnight, 1989; Strachan und Read, 2005).

1.4.1.2.2 Regulation der Transkription über nukleäre Hormonrezeptoren

Sowohl Retinsäure (RS) als auch Thyroxin (T4) spielen eine bedeutende Rolle während der Entwicklung und bei dem Erhalt der sensorischen Epithelien im Innenohr (Raz und Kelley, 1997). T4 wirkt über die Bindung an nukleäre Thyroidhormonrezeptoren (THR) TR α 1, TR β 1 und TR β 2. Diese aktivieren die Transkription ihrer Zielgene über Bindung entweder als Homo- oder Heterodimere. Wichtige Interaktionspartner in der Heterodimerkonformation sind unter anderem Retinoid X Rezeptoren (RXR). Auch Retinsäure, ein aktiver Metabolit von Vitamin A, wirkt über nukleäre Rezeptoren, die *retinoic acid receptors* (RAR - Retinsäurerezeptoren), RXR und auch THR-Homo- und Heterodimere. Die funktionellen Hetero-/Homodimere binden dann Bindungselemente an der DNA (response elements), z. B. *retinoic acid response elements* (RARE - Retinsäurebindungselemente) bzw. *thyroid hormone response elements* (TRE - Thyroidhormon-Bindungselement; (Lee und Privalsky, 2005). Durch die Interaktion von TRE, RAR und RXR mit möglichen Coaktivatoren kann es so zu einer Aktivierung, z. B. durch CBP/p300, und Repression der Transkription, z. B. durch NCoR-1 (nukleärer Rezeptor-Korepressor 1), kommen. Dabei ist die Regulation der Transkription durch Histonmodifizierung bei Kofaktoren ein wichtiger Mechanismus (Garcia-Villalba et al., 1997). So sind Coaktivatoren in der Lage, Proteine mit Histonacetyltransferase-(HAT)-Aktivität zu rekrutieren, während Corepressoren in der Lage sind, Histondeacetylasen (HDAC) zu aktivieren.

1.4.1.3 *Histon-Modifizierung*

In der inaktiven Form ist die DNA fest in einer kondensierten Chromatinstruktur mit den Histonen verbunden und erschwert den Proteinen, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, den Zugang zur DNA. Diese Packungseinheiten werden als Nukleosomen bezeichnet. Durch Modifizierung der Histone kann die Bindungsstärke an die DNA verändert werden. Hierbei sind Histonacetylierung, Histonmethylierung und Ubiquitinkonjugation beschrieben. Verschiedene Histonacetyltransferasen sind in der Lage, freie Lysinseitenketten an den N-

terminalen Enden der Histonoktamere zu acetylieren. Durch die Acetylierung wird die Affinität der Histone zu der DNA herabgesetzt. Die Umkehrreaktion wird von Histondeacetylasen katalysiert, was zu einer Blockierung der Transkription führt. Verschiedene Substanzen, wie etwa Natriumbutyrat, sind in der Lage, Histondeacetylasen zu inhibieren und damit die Transkription zu steigern (Andersen and Rosenfeld, 2001). Neben der Acetylierung ist auch eine Methylierung möglich. Hierbei führt eine Methylierung von Lysinresten zu einer Blockierung und die Methylierung von Argininresten der Histone zu einer Aktivierung der Transkription (Strachan and Read, 2005). Die funktionellen Heterodimere von THR und RAR sind in der Lage, über Interaktion mittels spezieller Kofaktoren eine HAT- oder HDAC-Aktivität auszuüben und damit die Transkription zu regulieren (Garcia-Villalba et al., 1997; Halili et al., 2009; Lefebvre et al., 2005; Slattery et al., 2009).

1.4.2 Charakterisierung der ausgewählten Transkriptionsfaktoren

In dieser Arbeit wurden Transkriptionsfaktoren ausgewählt, die einen Einfluss auf die Regulation der Prestin-Expression haben könnten. Entsprechend der Einteilung von Brivanlou und Darnell (2002) sind dies: (1) Pou4f3 als spezifischer, mit der Entwicklung der Innenohres assoziierter Faktor, (2) C/ebp β (*CCAAT/enhancer binding protein beta*) und Sp1 (*specificity protein 1*) als konstitutive TF, die sowohl als Verstärker als auch Repressor wirken können, und (3) die signalabhängigen Faktoren Creb1a (*cAMP response element binding protein*) und Carf (*calcium response factor*).

1.4.2.1 Pou4f3

Pou4f3 gehört zur Gruppe IV der POU-Domänen-bindenden-Transkriptionsfaktoren. Neben den namengebenden Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct und Unc-86 gehören zu der Gruppe auch die drei homologen Gene Brn-3a, Brn-3b und Brn-3c (Pou4f3) dazu (Andersen und Rosenfeld, 2001). Gemeinsam ist ihnen eine zweiseitige DNA-Bindungsdomäne. Diese besteht aus einer variablen „Homeodomäne“ (POU-H), die über eine nicht-konservierte Verbindung mit einer weiteren konservierten, POU-spezifischen-(POU-s)-Domäne verbunden ist. Beide Untereinheiten enthalten helix-turn-helix-Motive, durch die sie mit der DNA-Bindungsstelle interagieren (Andersen und Rosenfeld, 2001).

Der Pou4f3-Transkriptionsfaktor hat eine wichtige Funktion in der Entwicklung von neuronalen Zellen im Hirnstamm, in der Netzhaut und im Trigeminalganglion, sowie für die Haarzellen im Gleichgewichtsorgan und die äußeren und inneren Haarzellen im Cortischen Organ (Ryan und Rosenfeld, 1997). Bei Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Pou4f3 nicht so stark in der initialen Anlage der Haarzellen als vielmehr in der frühen Entwicklung und Differenzierung wichtig ist. So ist eine Mutation in diesem Gen mit einer autosomal-dominant vererbten Taubheit assoziiert (Nolan et al., 2007). In Knockout-Mäusen von Pou4f3 kommt es zu einer Fehl- und Minderausbildung der inneren und äußeren Haarzellen (Xiang et al., 1997). Eine intakte Kopie des Pou4f3 Gens ist ausreichend, um eine normale Entwicklung der Cochleafunktion zu ermöglichen (Keithley et al., 1999). Vor kurzem wurde eine neue L223P-Mutation im Pou4f3-Protein in einer holländischen Familie beschrieben. Hier kam es bei den die Mutation tragenden Familienmitgliedern zu einem beginnenden Hörverlust im Erwachsenenalter. Am stärksten waren die hohen Frequenzbereiche betroffen (de Heer et al., 2009). Diese Beobachtung passt zu der Klinik früher beschriebener Mutationen (884de18 und L289F), wo allerdings die Symptomatik des Hörverlustes deutlich stärker hervortrat und das Gleichgewicht ebenfalls betroffen war (Pauw et al., 2008).

1.4.2.2 *C/ebpβ*

Der Transkriptionsfaktor *C/ebpβ* (*CCAAT/enhancer-binding protein – beta*) wird als Schlüsseltranskriptionsfaktor einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie z. B. Kontrolle von Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose, Stoffwechsel und Aufrechterhaltung spezifischer Funktionen sowie Immunreaktion und Entzündungsprozessen, beschrieben (Ramji und Foka, 2002). In einer Untersuchung an PC12-Zellen zeigten sich 115 Zielgene (Kfoury und Kapatos, 2009). *C/ebpβ* gehört zur Familie der basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (Akira et al., 1990) und bindet an das 5'-CCAAT-3'-Box-Motiv in der Promotorregion regulierter Gene (Graves et al., 1986). Neben der evolutionär konservierten *Basic-Leucine-Zipper*-(bZIP)-Domain am C-Terminus besitzt es am sonst divergenten N-Terminus 3 kurze Aktivierungsdomänen, die mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren (Ramji und Foka, 2002). *C/ebpβ* ist in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen mit anderen bZIP- und nicht-bZIP-Transkriptionsfaktoren einzugehen (Vallejo et al., 1993). Mehrere Phosphorylierungsstellen in *C/ebpβ* sind Angriffspunkte verschiedener signalabhängiger Regulationswege (ras/MAPK, PKC, Ca²⁺/Calmodulin, PI 3-Kinase) und ermöglichen eine posttranskriptionell aktivierende, aber auch hemmende Regula-

tion der DNA-Bindungsaktivität (Ramji und Foka, 2002; Trautwein et al., 1994). C/ebp β wird als Reaktion auf erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ in der Leucin-Zipper-Region an Ser276 über eine Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase phosphoryliert und führt zu einer Stimulation der Transkription (Wegner et al., 1992). Auch erhöhtes cAMP führt zu einer Aktivierung von C/ebp β (Yukawa et al., 1998).

In der Promotorregion von C/ebp β sind funktionelle aktivierende Bindungsstellen für CREB (Niehof et al., 1997) und SP1 (Berrier et al., 1998) nachgewiesen worden. CREB im Kernextrakt hippocampaler Neuronen bindet an eine wichtige Bindungsstelle des C/ebp β Promotors. Durch cAMP aktiviertes pCREB scheint ein zentraler Faktor in der Regulation von C/ebp β zu sein. Daneben spielt aber auch die Autoregulation von C/ebp β eine Rolle (Foka et al., 2001). Auch eine Membrandepolarisation führte in hippocampalen Neuronen zu einem Anstieg der mRNA-Expression von C/ebp β (Yukawa et al., 1998). Neuronal spielt C/ebp eine Rolle in der Langzeitplastizität von Neuronen. (Alberini et al., 1994).

C/EBP hat eine gewisse immunologische Bedeutung. Eine Vielzahl proinflammatorischer Gene, wie z. B. IL-6 (Interleukin-6), IL-1 β , IL-8, IL-12 und TNF α (Tumornekrosefaktor), werden durch C/ebp β reguliert (Yi et al., 2007). C/ebp β wird aber auch durch IL-6 und Lipopolysaccharid (LPS) induziert und spielt eine Rolle in der Differenzierung von Makrophagen (Berrier et al., 1998). Eine Interaktion zwischen GATA und C/EBP β bildet Proteinkomplexe, die essentiell für die Gata-Suppression der Adipozytendifferenzierung sind (Tong et al., 2005). In einer Genexpressionsanalyse an unsterblich gemachten Zelllinien aus dem Innenohr wurden erste Hinweise zur Bedeutung des Zusammenspiels zwischen Gata und C/ebp in der Innenohrentwicklung gefunden (Holley et al., 2007).

1.4.2.3 Sp1

Sp1 (*specificity protein 1*) ist einer der am besten untersuchten aktivierenden Transkriptionsfaktoren. Es ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung vieler Hundert Proteine beteiligt ist (Lomberk und Urrutia, 2005). Er gehört zur Familie der Sp/KLF-(krüppel-like-factor)-Transkriptionsfaktoren. Charakteristisch für diese Familie sind 3 Domänen, die für die Bindungsspezifität entscheidend sind, nämlich eine DNA-Bindungsdomäne, eine Kernlokalisationssignaldomäne und eine regulatorische Transkriptionsdomäne (Lomberk und Urrutia, 2005). SP1 besitzt drei Cys2His2-Zinkfinger-DNA-Bindungsstellen, die an GC-Boxen

mit den Konsensussequenzen 5'-G/T-**GGGCGG**-G/A-G/A-C/T-3' oder 5'-G/T-G/A-**GGCG**-G/T-G/A-C/T-3, oder auch mit deutlich geringerer Affinität an CT- und GT-Boxen mit GC-Box 5'-GGGG**A**GGGGC-3' und GT-Box 5'GGGG**T**GGGGC-3' binden können. Mit seinen glutaminreichen Transaktivierungsdomänen A und B kann er mit dem TATA-bindenden Protein (TBP) und TBP-assoziierten Faktor 4 interagieren. Seine Wirkung erzielt er durch die Bildung von Holo-Oligomeren mit anderen Sp1-Molekülen. Die Transkriptionsaktivität wird durch posttranslationelle Modifikation und Proteininteraktion geregelt. Aber Sp1 hat nicht nur aktivierende regulatorische Wirkung, sondern führt in bestimmten Fällen zu einer negativen Regulation (Wierstra, 2008). So hemmt Sp1 beispielsweise über eine Aktivierung der HDAC1 die Expression von p21 und durch Rekrutierung der DNA-Methyltransferase 1 die Expression von Myc-assoziierten Zinkfingerproteinen.

Folgende Beobachtungen machen Sp1 zu einem möglichen Kandidaten in der Expressionsregulation von Prestin. Eine *in silico*-Promotoranalyse in der Vorbereitung dieser Arbeit zeigte eine Vielzahl möglicher Bindungsstellen von Sp1 in den Promotorbereichen von Prestin und Gata3. Gata3 spielt eine bedeutende Rolle in der Innenohrentwicklung und stellte sich in vorherigen Untersuchungen als ein möglicher wichtiger Transkriptionsfaktor für die Prestin-Expression heraus (Gross et al., 2010). In der Regulation der Dopamin-beta-Hydroxylase spielt Gata3 durch eine Interaktion mit Sp1 eine wichtige Rolle (Hong et al., 2008).

1.4.2.4 *Creb1a und Carf*

Eine Vielzahl von Genen, unter anderem *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und *c-fos*, werden durch neuronale Aktivität reguliert (Lanahan und Worley, 1998; Nedivi et al., 1993). Hierbei spielt die Ca^{2+} -abhängige Regulation eine große Rolle. Eines der am besten untersuchten Gene in dieser Hinsicht ist BDNF. Dieses Protein hat im zentralen und peripheren Nervensystem eine große Bedeutung für die neuronale Plastizität (Marini et al., 2004; Tao et al., 2002).

Creb gehört zur Gruppe der Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (Yun et al., 1990) und bindet an DNA-Elemente mit der Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3'. Diese wurden als „*cAMP-response elements*“ (CREs) beschrieben (Goodman, 1990). Creb ist ein Stimulus-regulierter Transkriptionsfaktor, der durch Phosphorylierung aktiviert wird und Endphase vieler regulatorischer Wege ist.

Das Protein besitzt mehrere funktionelle Domänen, wie die glutaminreiche Region 1 und 2 (Q1 und Q2), die Kinase induzierbare Domain und eine bZIP-Domäne (Shaywitz und Greenberg, 1999). In der KID-Domäne besitzt es zwei Serinbindungsstellen (Ser-133 Ser-142), an der eine signalgetriggerte Phosphorylierung stattfinden kann (Gonzalez und Montminy, 1989). Das an Ser-133 phosphorylierte Creb ist in der Lage mit dem Creb-bindenden Protein (CBP) zu interagieren (Chrivia et al., 1993). Dabei werden für CBP mehrere Möglichkeiten der Transkriptionsaktivierung diskutiert. So wurde beschrieben, dass es durch eine intrinsische Histonacetylaseaktivität in der Lage ist, die Transkriptionsrate zu erhöhen (Tsankova et al., 2004). Ein Ca^{2+} -Signal hingegen führt zu einer Phosphorylierung von Ser-142 und Ser-143 (Kornhauser et al., 2002). Phosphoryliertes Ser-142 (pSer-142) und Ser-143 (pSer-143) inhibieren wiederum die Interaktion von pSer133-Creb und CBP (West et al., 2002).

Creb hat eine wichtige Rolle in der Regulation der neuronalen Differenzierung, des neuronalen Überlebens und der Ausbildung neuer Synapsen. Hierbei reguliert Creb wichtige Faktoren, wie c-fos und BDNF, die einen Einfluss auf die neuronale Plastizität haben. BDNF als Zielgen der Creb-abhängigen Transkription kommt auch in den sensorischen Ganglienzellen des Hörnervens vor (Marini et al., 2004). Eine funktionale CRE-Bindungsstelle wurde in Exon 3 und 4 beschrieben (Tao et al., 1998).

Carf ist ein vermehrt in Neuronen vorkommender Transkriptionsfaktor (Xia und Storm, 2002). Er hat keine Sequenzähnlichkeit mit anderen bekannten TF und keine Homologien im bekannten Säugetiergenom. Hingegen ist die DNA-Bindungsstelle evolutionär hochkonserviert und bindet die Konsensussequenz 5'-YSANAACGAGGC-3' (Pfenning et al., 2010).

Wie Creb reguliert Carf die Transkription von BDNF. Im Promotor von BDNF sind zwei funktionelle Bindestellen für Carf vorhanden, die als CaRE1 und CaRE2 bezeichnet werden (Tao et al., 2002). Hierbei ist eine Kooperation von Carf und Creb gut nachvollziehbar, da deren Bindungsstellen im Promotor von BDNF unmittelbar nebeneinander liegen (West et al., 2002). Zwar werden beide Transkriptionsfaktoren durch Ca^{2+} aktiviert, doch findet eine Aktivierung durch cAMP ausschließlich bei Creb statt, das für seine Funktion eine Aktivierung durch Kinase vermittelte Phosphorylierung benötigt. Bei Carf hingegen reicht allein Ca^{2+} als Stimulus aus, wobei eine zusätzliche Phosphorylierung nicht ausgeschlossen ist, da mögliche Bindungsstellen in der Sequenz vorhanden sind (Xia und Storm, 2002). Allerdings reagiert Carf höchstwahrscheinlich nicht wie Creb mit CBP (Tao et al., 2002).

Die Expression von Prestin wird unter langfristiger Salicylsäuregabe hochreguliert (Yu et al., 2008). Auch für Carf1 wurde eine Salicylsäure-abhängige Expressionssteigerung beschrieben (Singer et al., 2008). Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Expression beider Gene zu finden, wurde Carf in diese Untersuchung mit aufgenommen.

1.5 Tinnitus und Schwerhörigkeit

Hohe Schallpegel führen zur Schädigung des Innenohres. Damit einhergehend kann es nicht nur zum Hörverlust kommen, sondern auch zu pathologischen Schallwahrnehmungen, die als Tinnitus bezeichnet werden. Tinnitus (lat. tinnire – klingeln) ist die subjektive Wahrnehmung von Geräuschen ohne das Vorhandensein einer physikalischen Geräuschquelle (Eggermont, 2005). Nach akustischem Trauma kann es in den zentralen Anteilen der Hörbahn zu einem pathologischen Anstieg der neuronalen Erregbarkeit kommen. Ursächlich ist eine erhöhte spontane Aktivität auf kortikalem und subkortikalem Niveau, ausgelöst durch verminderte Umgebungsinhibition (Salvi et al., 2000).

Es ist bekannt, dass der chronische Gebrauch von Salicylsäure Tinnitus induzieren kann (Cazals, 2000; Eggermont, 2005). Salicylsäure wirkt als kompetitiver Antagonist an der Anionen-Bindungsstelle von Prestin (Oliver et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Haarzellmotilität, die über eine Hypomotilität zum Tinnitus führen kann (Kakehata und Santos-Sacchi, 1996). Des Weiteren bewirkt chronische Salicylsäuregabe eine Hochregulation von Prestin (Yu et al., 2008). Hohe Dosen von Salicylsäure führen ebenfalls zu einer Zunahme von I κ B im Innenohr, was zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs mit einer Abnahme von NF- κ B und einer Steigerung von c-fos und egr-1 führt (Yu et al., 2008). Dabei wird diskutiert, ob diese Veränderungen ursächlich mit der Steigerung der Prestinexpression zusammenhängen, und ob die damit einhergehende erhöhte cochleäre Amplifikation an der Entstehung von Tinnitus beteiligt ist (Yang et al., 2009).

1.6 Die organotypische Kultur als Modell

Der bedeutende Vorteil der organotypischen Kultur ist die Möglichkeit, die Bedingungen der Kultivierung modifizieren zu können, um so den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Innenohr zu untersuchen. In dieser Arbeit werden Einflussfaktoren auf die Veränderung der Prestin-Expression in der organotypischen Kultur nach Sobkowicz et al. (1975) untersucht. Hierbei wur-

de nach Präparation des häutigen Labyrinths aus der Knochenkapsel, das Cortische Organ zusammen mit dem Modiolus kultiviert (Siehe 2.2.4). Für das Cortische Organ konnte gezeigt werden, dass sowohl die Entwicklung als auch die Expression verschiedener Proteine einen apikal-basalen Gradienten aufweisen (Belyantseva et al., 2000). Der große Vorteil der organotypischen Kultur gegenüber der Einzelzellkultur ist das Erhalten der strukturellen Integrität des Gewebes und der erhaltenen Beurteilbarkeit der unterschiedlichen lokalen Entwicklung (Gross et al., 2007). Somit kommt diese Art der Kultivierung der *in vivo*-Situation am nächsten.

Durch den Erhalt des Gewebeverbandes stellen sich Schäden der organotypische Kultur frühzeitig durch Veränderungen der Haarzellen dar. Trotz des präparatorischen Stresses, der auf das Gewebe ausgeübt wird, zeigte sich in vorherigen Arbeiten, dass die Haarzellen in der organotypischen Kultur unter Normoxie keine Zeichen eingeschränkter Vitalität aufweisen (Gross et al., 2007).

1.7 Die Koexpressionsanalyse

Die Veränderung der Expression eines Gens ist durch das zusammenhängende Wirken verschiedener Transkriptionsfaktoren bestimmt. Um den Einfluss eines Transkriptionsfaktors auf die Regulation der Genexpression zu bewerten, werden die Expressionsmuster der Gene unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen untersucht und deren Verhalten mit dem Zielgen in Korrelation gebracht (Aid-Pavlidis et al., 2009). Verdeutlicht werden Gemeinsamkeiten im Muster der Genexpression durch die Korrelation der untersuchten Gene zueinander. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient (t-Test) und die sich daraus errechnenden p-Werte sind die üblicherweise genutzten statistischen Berechnungen, um die Enge der Beziehung darzustellen (Chen und Corey, 2002). Durch die experimentelle Veränderung der Expression des Zielgens und die Bestimmung der Expression möglicher Transkriptionsfaktoren lässt sich zeigen, welche Gene die größte Übereinstimmung im Muster ihres Verhaltens haben. Gleiche Muster im Verhalten der Expressionsänderung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen geben Hinweise auf gemeinsame Regulationswege (Farber und Lusic, 2008).

1.8 Aufgabenstellung

Prestin ist das Motorprotein in den äußeren Haarzellen des Cortischen Organs und das Schlüsselprotein, um die hohe Sensitivität des Hörens zu ermöglichen. Ein Funktionsverlust von Prestin bewirkt ein Absinken der Hörschwelle um 40 - 60 dB (Lieberman et al., 2002). Von einer Vielzahl von Faktoren ist bekannt, dass sie einen Einfluss auf die Expression von Prestin haben. So konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen von Salicylsäure zu einer Zunahme von Prestin in den Haarzellen führt (Yu et al., 2008). Ebenso führt die Einwirkung von Lärm zu einer Steigerung der Prestin-mRNA-Expression (Mazurek et al., 2007). Hypoxie und Ischämie hingegen führen zu einer Abnahme der Prestinexpression (Gross et al., 2005).

Die molekularen Mechanismen der Expressionsregulation von Prestin sind bisher unzureichend untersucht. Die Zunahme der Prestinexpression und Aufnahme des Proteins in die laterale Membran der äußeren Haarzellen beginnt bei der Ratte direkt nach der Geburt und steigert sich parallel mit der Zunahme der Elektromotilität der äußeren Haarzellen (Belyantseva et al., 2000).

Für die Regulation der Transkription eines Genes sind Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass es eine enge Korrelation zwischen Prestin und Gata3-Expression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gibt (Gross et al., 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an der Expressionsregulation von Prestin beteiligt sind. Für folgende Transkriptionsfaktoren wurden Hinweise in der Literatur gefunden, dass sie an der Regulation von Prestin beteiligt sein könnten: (1) Pou4f3 ist ein im Innenohr haarzellspezifischer Transkriptionsfaktor, von dem eine essentielle Bedeutung in der korrekten Ausbildung der Haarzellstruktur bekannt und der im Innenohr ausschließlich in den äußeren Haarzellen lokalisiert ist. (2) C/ebp β und Sp1 sind konstitutiv wirkende Transkriptionsfaktoren, die sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren auf die Transkription wirken können. (3) Carf und Creb sind signalabhängige Transkriptionsfaktoren.

Die mRNA-Expressionen von Prestin und den ausgewählten Transkriptionsfaktoren wurden unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Mithilfe einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurden selektive Bedingungen der Prestinveränderung untersucht, für die es Hinweise aus der Literatur und Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe gab, dass sie zu einer Beeinflussung von Prestin führen. Vergleiche der Expressionsmuster von Prestin und den ausgewählten Transkriptionsfaktoren sowie anschließende Korrelation der untersuch-

ten Faktoren mit Prestin sollen Hinweise über eine mögliche Beteiligung der TF an der mRNA Expressionsregulation von Prestin liefern.

Folgende Bedingungen wurden untersucht: (1) Die normale postnatale Entwicklung von Prestin bei Wistar-Ratten an den postnatalen Tagen 2, 5 und 8. Dieser Ansatz wurde ergänzt durch eine modifizierte Präparationstechnik, um Unterschiede in der Verteilung auf das Cortische Organ bzw. die Limbusregion zu ermitteln. (2) Aufgrund der tonotopischen Organisation der Cochlea wurden die untersuchten Cochleae in etwa drei gleich große apikale, mediale und basale Segmente aufgeteilt und getrennt untersucht. Da in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass im Cortischen Organ ein apikal-basaler Gradient der Prestinexpression existiert, wurden die ausgewählten Transkriptionsfaktoren, ebenfalls aufgetrennt in apikal, medial und basal, untersucht. (3) Da bekannt ist, dass die Prestin-Expression in der organotypischen Kultur modifiziert werden kann, wurden die Wachstumsbedingungen der Kultur gezielt geänderten. Bezugspunkt war die organotypische Kultur unter den Standardbedingungen, bei der es wie *in vivo* zu einem Anstieg von Prestin kommt (Lowenheim et al., 1999).

Die Kulturbedingungen wurden wie folgt modifiziert: Zusatz von Thyroxin (Gross et al., 2010) und Natriumbutyrat (Gross et al., 2011), die die Expression von Prestin erhöhen, und Zusatz von Kaliumchlorid (Mazurek et al., 2011) und Retinsäure (Gross et al., 2011), die zu einem Abfall der Prestin-Expression führen.

Abschließend wurde die Arbeit durch eine *in silico*-Analyse der Promotorregion von Prestin ergänzt. Hierbei wurden die durch das molekularbiologische Genanalyseprogramm Genomatix® ermittelten Promotorregionen von Prestin von Maus, Ratte, Rind und Mensch mithilfe des DNA-Analyseprogramms MochiView® analysiert und auf das Vorhandensein publizierter Konsensussequenzen der ausgewählten Transkriptionsfaktoren untersucht. Das Vorhandensein evolutionär konservierter Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der Promotorregion von Prestin wäre ein weiterer Hinweis auf die Relevanz korrelierender Transkriptionsfaktoren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Substanzen

Die Wistar-Ratten wurden von der Firma Charles River, Niederlassung Berlin-Steglitz und Buch, bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden Materialien von folgenden Firmen verwendet:

BD Biosciences (Bedford, USA), Biochrom Seromed (Berlin), Bio-Rad (München), BioTez (Berlin-Buch), Biozym (Hess. Oldendorf), Braun (Melsungen), Cambrex (Rockland, USA), Eppendorf (Hamburg), Falcon – Becton Dickenson (Le Pont De Claix, Frankreich), Feather (Distributor: pfm, Köln), Fresenius (Bad Homburg), Gibco – Invitrogen (Paisley, UK), Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Inno-train (Kronberg), MaiMed (Neuenkirchen), MBT Brand (Gießen/Dossenheim), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), MoBiTec (Göttingen), Nunc (Roskilde, Dänemark), Pharmacia (Uppsala, Schweden), Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden), R&D systems (Minneapolis, USA), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Schleicher-Schuell (Dassel), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg).

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Becton Dickinson, Einmalspritze 1, 10, 20 ml; Biozym, PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml; Braun, Einmalspritze 1, 2, 5, 10, 20 ml; Braun, Kanüle 21 G; Braun, Spritze mit Kanüle 1 ml, 26 G; Eppendorf, Eppendorf Tips Filter PCR-clean; Eppendorf, Eppendorf Tips Reloads; Eppendorf, PCR-Reaktionsgefäße 1,5; 2 ml; Eppendorf, Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2,0 ml; Eppendorf, UVette, Küvette; Falcon, 15 ml, 50 ml konisches Röhrchen; Falcon, 250, 750 ml Kulturflasche; Falcon, 5 ml Rundbodenröhrchen; Falcon, Petrischalen ø 35, 60, 150 mm; Feather, Einwegskalpell, No.20; MaiMed, sterile Mullkompressen 10 cm x 10 cm; Nunc, Zellkulturplatten 4 Kavitäten; Roche, LightCycler[®] Kapillaren, 20 µl; Sarstedt, 50 ml konisches Röhrchen; Sarstedt, Einmaltransferpipette 3,5 ml; Schleicher-Schuell, Einmalfilter, 0,2 µm; Schleicher-Schuell, Vacuflo, Membranfilter, 0,2 µm, 125 ml

2.1.2 Zellkulturmedium

Das eingesetzte Medium entspricht im Grundsatz dem von Löwenheim (1999) verwendeten Kulturmedium und hat folgende Zusammensetzung:

Biochrom, fetalem Kalbsserum (FBS), 10 %; Biochrom, Penicillin, 100 U/ml; Gibco, DMEM/F12 1:1, 500 µl; R&D, rh IGF-1, 24 ng/ml; Roche, Insulin-Transferrin-Natriumselenit, (10 µg/ml I., 10 µg/ml T., 10 ng/ml Na₂SeO₃); Sigma-Aldrich, D(+) Glukose, 0,6 % (0,9 % Glukose-Endkonzentration).

2.1.3 Puffer und Lösungen

In der Arbeit wurden folgende Puffer verwendet: BSG (buffered saline glucose): 116 mM NaCl, 27,2 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 6,1 mM KH₂PO₄; 2 g Glukose (11,4 mM), Aqua dest; PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung): Dulbecco's phosphate-buffered saline, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland, Katalognummer H15-002

RNA-Präparation

Die RNA-Präparation wurde mit folgenden Materialien durchgeführt: Qiagen, QIAshredder Homogenizers; Qiagen, RNase-Free DNase Set; Qiagen, RNeasy® Mini Kit (RLT-, RW1-, RPE-Puffer, Mini-Spinsäulen)

RT und RT-PCR

Die reverse Transkription (RT) und Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde mit folgenden Materialien durchgeführt: BioTez, Oligo(dT); BioTez, Primer [siehe Tabelle 1]; Invitrogen, dNTP 2,5 mM ; Promega, M-MLV Reverse Transkriptase (RT) und M-MLV RT 5x Reaktionspuffer; Promega, RNasin®, Ribonuklease-Inhibitor; Roche, LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I; Verwendete Primer und deren Spezifität siehe Tabelle 1.

Die in Tabelle 1 angegebenen verwendeten Primer wurden mittels des Programms Primer-BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC = BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome); Zugriff 02/2011) auf ihre Spezifität untersucht. Dazu wurden die verwendeten Sequenzen in der Suchmaske vorgegeben. Das Ergebnis der Suche zeigt im Februar 2011, dass jedes Primerpaar nur für das jeweilige Gen 100%ige Übereinstimmung im Genom von *Rattus norvegicus* liefert. Mittels Gelelektrophorese konnte experimentell für jedes Gen nachgewiesen werden, dass es nur eine Bande in Höhe der zu erwartenden Basenpaarlänge gab. Die verwendeten Primer eignen sich also gut zum Nachweis der von uns untersuchten Sequenzen.

Tabelle 1: Primer der in dieser Untersuchung verwendeten Gene

<i>Name der Gens/ Zugriffsnummer</i>	<i>Länge</i>	<i>Sequenz (5' - > 3')</i>	<i>Start</i>	<i>Ende</i>
Tbp	201	5'-ACC-CCC-TTG-TAT-CCT-TCA-CC-3'	608	627
NM_001004198		5'-CAT-GAT-GAC-TGC-AGC-AAA-CC-3'	808	789
Prestin	162	5'-CAC AGA GTC CGA GCT ACA CAG TC-3'	1508	1530
NM_030840		5'-TCA GTG CGC TGC TGT ACA AG-3'	1669	1649
Gata3	174	5'-AAG GCA GGG AGT GTG TGA AC-3'	779	798
NM_133293		5'-AGG AAG TCC CTG CTC TCC TC-3'	952	933
Carf	233	5'-CTT GAA GAA CCT TTG CTG GC-3'	837	856
NM_001106915		5'-TGA GAC TTC CAC ATC AAG CG-3'	1069	1050
Creb1	154	5'-CAT GGA CTC TGG AGC AGA CA-3'	45	64
NM_031017.1		5'-TAC AGT GGG AGC AGA TGA CG-3'	198	179
Sp1	195	5'-TGA ATG CTG CTC AAC TGT CC-3'	1594	1613
NM_012655.2		5'-CTC CAC CTG CTG TCT CAT CA-3'	1788	1769
C/ebpβ	158	5'-GAC AAG CTG AGC GAC GAG TA-3'	657	676
NM_024125.4		5'-AGC TGC TCC ACC TTC TTC TG-3'	814	795
Pou4f3	186	5'- GTC TCA GCG ATG TGG AGT CA - 3'	527	546
NM_001108889.1		5'- GCG ACA GGG TAA GAG ACT CG - 3'	712	693
Oligo(dT)		5'-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TT-3'		

Dargestellt sind für die jeweiligen Gene die Accessionnummern der mRNA, die Sequenzen der verwendeten Primer, die Lokalisation der amplifizierten Abschnitte auf der mRNA (Start und Ende) sowie deren Länge.

RNA-Konzentrationsmessung mittels Ribogreen

Folgende Materialien wurden zur Bestimmung der RNA-Konzentration verwendet: Invitrogen/Molecular Probes, Komponente A: RiboGreen RNA Quantifizierungsreagenz 1 ml gelöst in DMSO, Komponente B: 20X TE, 25 ml von 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5

(20X TE) in DEPC-behandeltes Wasser; Ribosomaler RNA-Standard (16S and 23S rRNA von E. coli; Komponente C), fünf Fläschchen, jedes 200 µL von 100 µg/ml Lösung in TE enthaltend.

Elektrophorese

Folgende Materialien wurden zur Durchführung der Elektrophorese verwendet: Invitrogen, TBE-Puffer (1,0 M Tris(hydroxymethyl)-aminometha, 0,9M Borsäure, 0,01 EDTA); Inno-Train Diagnostik GmbH, Genagarose Tiny III; Cambrex, GelStar Nucleic Acid Gel Strain; 5fach Ladepuffer (30 % Ficol, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 0,2 M Na₂EDTA).

2.1.4 Verwendete Geräte

Folgende Geräte wurden in dieser Arbeit verwendet:

Präparation: Fine Science Tools, Feinpräparationsinstrumente; Gelaire, Laminarflowbox, Arbeitsbank; Kultur: Revco Scientific (Inc. Asheville, NC, USA), Inkubator; Millipore-Anlage, 0,22 µm; Haarzellzählung: Leica, DMIL, Fluoreszenzmikroskop Microsystem Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland; RNA-Präparation: Eppendorf 5417 R, Tischzentrifuge; RNA-Messung: Eppendorf, Genequant II, Biophotometer; Molecular Devices®, Spektramax M2; Reverse Transkription: Perkin Elmer Cetus, GeneAmp PCR System 9600; VWR Galaxy Mini, Tischzentrifuge; RT-PCR: Roche, Light Cycler 1.5; Roche, LightCycler® Kapillaren, 20 µl; Elektrophorese: Biometra® Standard Power Pack P25; MBT Brand, Gelelektrophoresekammer und -träger; GeneGenius, Bio Imaging System, Vollautomatisches Geldokumentations- und Analysesystem.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation des Cortischen Organs

Die Genehmigung zur Tötung der Tiere wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGeT/Si), Berlin (T 0234/00), erteilt. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Sobkowicz et al. (1993). Pro Versuchstag wurden zwischen 6 und 10 Tiere präpariert. Nach Ankunft der Tiere im Labor wurden diese in eine abgedeckte, durch 37 °C warme Gelakkus gewärmte, Styrobox überführt. Da die Gesamtzeit der Präparation bis zu 5 Stunden betrug, wurde den Tieren 150 µl Elektrolyt-Glukoselösung subkutan in die Nackenfalte injiziert, um einer Exikose vorzubeugen. Vom Tierstall wurde das Geburtsdatum mitgeliefert. Da dieses allerdings nur tages-, aber nicht stundengenau war, wurde zusätzlich zur Altersbestimmung noch die Scheitel-Steiß-Länge gemessen und der Haarbewuchs beurteilt.

Die Tiere wurden mittels einer chirurgischen Schere dekapitiert und die Haut nach kurzem Ausbluten mit 70 % Ethanol oberflächlich desinfiziert. Um das Neurocranium freizulegen, wurden die Kutis und das Weichgewebe mittels einer chirurgischen Schere auf einer sterilen Unterlage durch einen sagittalen Hautschnitt geteilt und zu beiden Seiten entfernt. Der Schädel wurde, ausgehend von der *Crista occipitalis externa*, entlang der *Sutura sagittalis*, aufgeschnitten, um anschließend mit einem Skalpell in der Sagittalachse gespalten zu werden. Mit einem Rundspatel wurde das Cerebrum aus der Schädelhöhle und mit einer chirurgischen Schere der weiche Gaumen entfernt, um dann die *Pars petrosa* des *Os temporale* zu separieren. Beide Felsenbeine wurden in einer 60 mm Petrischale in auf 4 °C gekühlter BSG-Lösung gesammelt.

Bei der Sammlung von Segmenten für die 48h-Kultur wurde zur Präparations-BSG-Lösung noch Penicillin dazugegeben. Dies war bei der Sammlung von frischem Material nicht notwendig. Die folgende Feinpräparation wurde von der Chemieingenieurin Julia Fuchs und der Ärztin Nyamaa Amarjargal durchgeführt und fand in einer Laminarflowbox unter aseptischen Bedingungen statt. Präpariert wurde in BSG-Lösungen von 4 °C. Zuerst wurde die Kapsel der Cochlea aus dem Felsenbein herausgelöst. Diese ist bei 2 Tage alten Tieren noch knorpelig und verknöchert mit zunehmendem Alter, was die Präparation mit jedem postnatalen Tag erschwert.

Als nächstes musste die Cochlea von der Kapsel und dem *Ligamentum spirale ossea* getrennt werden. Dies gestaltete sich gerade bei den 8 Tage alten Tieren schwieriger, da die Verknöcherung des Neurocraniums fast vollständig abgeschlossen war. Nun wurden beide Cochleae jeweils in eine neue, mit BSG-(Penicillin) gefüllte, 35 mm Petrischale überführt und die Präparationsin-

strumente wurden gewechselt. Dieser Vorgang diente der Verhinderung einer Keimübertragung, um eine keimfreie Kultur zu ermöglichen. Als nächstes wurde die knöchernen Achse der Cochlea (der Modiolus) von dem häutigen Labyrinth getrennt. Die nun entrollte Cochlea wurde anschließend vom Ligamentum spirale befreit, indem das Ligament von basal nach apikal in einem Stück abgezogen wurde. Die nun freigelegte Cochlea wurde in ein apikales, mediales und basales Stück gedrittelt. Alle Instrumente wurden vor und während der Präparation mit 70 % Ethanol desinfiziert.

2.2.2 Die Präparation ohne Limbus

In der limbusfreien Präparation wurde mit einer Pinzette der Limbus von medial aus vorsichtig abgetrennt und separat gesammelt. Dies gestaltete sich schwieriger als das Abtrennen der Stria vascularis, die sich im *Sulcus spiralis externus* wie an einer Sollbruchstelle im Ganzen abziehen lässt. So musste das Abtrennen unter größter Vorsicht geschehen, um die Haarzellen nicht zu zerstören.

2.2.3 Darstellung der Haarzellen mittels Rhodamin-Phalloidin-Färbung

Um Haarzellschäden als Ursache von Prestinveränderungen auszuschließen, wurden die äußeren Haarzellen unter allen untersuchten Bedingungen gezählt. Dafür wurden die Fragmente bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PBS fixiert. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 0,2 % Triton X-100 in PBS zur Permeabilisierung versetzt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Fragmente mit 5 µg/ml Phalloidin–Tetramethylrhodamine B Isothiocyanate (Phalloidin-TRITC; P1951, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) bei Raumtemperatur für 30 Minuten gefärbt, mit BSG gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIL, Microsystem Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland, 400fache Vergrößerung) mit geeigneten Filtern für TRITC (Extension: 544 nm, Emission: 572 nm) begutachtet.

Die Stereozilien und die Cuticularplatte der äußeren und inneren Haarzellen im Innenohr haben einen hohen Aktin Gehalt. Diese Strukturen lassen sich somit durch Phalloidin, das an filamentäres Aktin 31 (F-Aktin) bindet, gut anfärben (Cano et al., 1992). Da diese Strukturen aber bei Schädigung als erstes ihre Ordnung verlieren, eignen sie sich gut als Indikator für den Zustand der Haarzellen. Folgende Zählkriterien wurden festgelegt:

(1) Mindestens 20 zusammenhängende ÄHZ einer Reihe müssen erkennbar sein, (2) die vier Haarzellenreihen müssen gut erkennbar sein, (3) pro Segment werden 3 - 5 verschiedene Stellen auszählt, (4) Stellen mit mechanischen Alterationen werden nicht berücksichtigt. (5) Die Anzahl der Haarzellen wurde mindestens über eine Länge von 500 μm gemessen (Mazurek, 2007).

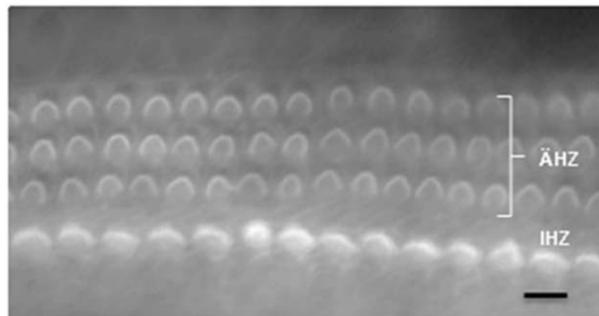


Abb. 4: Haarzellfärbung mit Phalloidin. Angefärbt sind die hufeneisenförmig aufgereihten Stereozillien der drei Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ) und der einen Reihe innerer Haarzellen (IHZ). Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 10 μM .

2.2.4 Zu den Versuchsansätzen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs

In der Promotion von Kerstin Stute wurde der Einfluss von T4 und KCl auf die Prestin-Expression untersucht (Stute, 2011). Die Segmente wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 4-well-Platten (1,9 cm² Oberfläche pro well, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) im Inkubator kultiviert. Das Kulturmedium hatte die von Lowenheim et al. (1999) empfohlene Zusammensetzung (siehe 2.1.2). Die bei -80 °C gelagerten RNA-Proben der Kultur wurden in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der Expression der Transkriptionsfaktoren benutzt. Die Prestin-Expression wurde erneut bestimmt und diente als Kriterium für den Zustand der RNA-Proben.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei verschiedene Versuchsansätze in der organotypischen Kultur verwendet. Bei dem ersten Ansatz dient das Frischpräparat vom ersten Ohr als Kontrolle und das Präparat des kontralateralen Ohres zur Analyse der Veränderungen während der Kultivierung. Drei Gruppen wurden in dieser Art untersucht: (1) Die Kultur der Cortischen Organe ohne zusätzliche Substanzen, (2) die Kultur mit zusätzlich 0,5 μM T4 (Sigma, Steinheim, Deutschland) und (3) die Kultur mit erhöhter KCl-Konzentration (50 μM). Bei diesem Ansatz

können Faktoren, wie das Alter der Tiere bzw. Eigenschaften des Mediums, die Ergebnisse beeinflussen.

Bei dem 2. Ansatz diente das eine Ohr zur Kontrolle und das kontralaterale Ohr zur Untersuchung des Einflusses des zu testenden Faktors. Die Untersuchung beider Ohren erfolgte nach der Kultivierung. Da anzunehmen ist, dass im Frischpräparat praktisch keine Unterschiede zwischen den beiden Ohren vorliegen, ergibt sich für jede experimentelle Probe eine eigene Kontrollprobe. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, die Veränderungen der Expression durch den zu untersuchenden Faktor während der Kultivierung empfindlicher erfassen zu können. Der Bedarf an Tieren ist geringer und es kann der Paarvergleich zur Berechnung der Ergebnisse eingesetzt werden. Dieser Ansatz wurde (1) bei der Kultur mit Zugabe von 0,01-2 mM NB (Sigma, Steinheim, Deutschland), gelöst in destilliertem Wasser, angewendet. Als Kontrolle diente die Kultur des kontralateralen Cortischen Organs ohne NB-Zusatz. Außerdem wurde (2) die Kultur mit Zugabe von 1-100 μ M Retinsäure (Sigma, Steinheim, Deutschland) in dieser Art untersucht. Retinsäure wurde gelöst in DMSO (1 μ M RS in 0,01, 5 μ M RS in 0,05, 10 μ M RS in 0,1, 50 μ M RS in 0,5 und 100 μ M RS in 1 % DMSO). Als Kontrolle diente die Kultur des kontralateralen Cortischen Organs mit dem Lösungsmittel DMSO ohne RS-Zusatz.

Im Grundsatz sind beide Vorgehensweisen geeignet, um eine Aussage über den Einfluss der zu untersuchenden Substanzen zu treffen. Für die anschließende RNA-Präparation wurden jeweils 2 - 3 Segmente zusammengefasst.

2.2.5 RNAlater und anschließende RNA-Isolation

Nach der Präparation wurden die Segmente in 100 μ l RNAlater (Ambion®) aufgenommen und nach Protokoll über Nacht bei 4 °C gelagert. Zur Isolation wurde dem Röhrchen laut Vorschrift 100 μ l eisgekühlte PBS-Lösung zugesetzt und 2 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, dem Röhrchen wurde abermals 100 μ l PBS zugesetzt (Waschung), dann wurde ein weiteres mal 2 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Dieser Schritt diente der RNA-Stabilisierung. Die weitere Isolation wurde mit den RNeasy® Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Dieses benutzt das Verfahren der selektiven RNA-Bindung an der Silicagel-Membran und Mikrozentrifugationstechnik. Folgende Schritte wurden durchgeführt: (1) Lyse in Guanidinisothiocyanat-(GITC)-haltigen Puffer, (2) Homogenisierung des Gewebes mittels der QIAshredder Spinsäule.

Nachdem der Überstand vorsichtig mit einer 100 µl Pipette (Eppendorf) abpipettiert wurde, wurden 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-ME pro 1 ml RLT-Puffer) hinzugefügt. Das Röhrchen wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, danach 5 Sekunden gevortext und kurz abzentrifugiert. Dann wurde das Volumen mit einer 1000 µl Pipette auf die QIAshredder Spinsäule gegeben und 2 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Das Röhrchen wurde hiernach für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Zur RNA-Isolation wurden die Proben bei Raumtemperatur 15 Minuten lang aufgetaut und währenddessen die DNase-Behandlung vorbereitet. Die RNA-Isolation wurde streng nach dem Protokoll von Qiagen durchgeführt. Den aufgetauten Proben wurden gleiche Mengen 70 % Alkohol hinzugegeben und mit dem homogenisierten Lysat durch Pipettieren vermischt. Die Proben wurden anschließend auf die RNeasy® Spinsäulen gegeben und für 20 Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert. Das in 2 ml Röhrchen aufgefangene Zentrifugat wurde verworfen und 350 µl RW1-Puffer auf die Säule hinzugefügt mit anschließender Zentrifugation bei 10000 UpM für 20 Sekunden. Das Zentrifugat wurde ebenfalls verworfen und 80 µl DNase-Mix für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Dieser Schritt soll mögliche DNA-Verunreinigungen entfernen. 350 µl RW1-Puffer wurden auf die Membran gegeben und bei 10000 UpM 20 Sekunden zentrifugiert. Das Zentrifugat und die Auffangröhrchen wurden verworfen und RNeasy® Spinsäulen in ein neues 2 ml Röhrchen gestellt. Anschließend wurden die Röhrchen gewaschen. Dazu wurden 500 µl RPE-Puffer hinzugefügt und 20 Sekunden bei 10000 UpM zentrifugiert, wobei das Zentrifugat verworfen wurde. Der Schritt wurde wiederholt und diesmal 2 Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Spinsäule in ein neues 2 ml Röhrchen überstellt, um anschließend 1 Minute bei 14000 UpM zum Trocknen der Säulen zentrifugiert zu werden. Schließlich wurden die Säulen auf ein 1,5 ml Sammelröhrchen platziert, 30 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, abschließend 1 Minute bei 10000 UpM zur Eluierung der RNA zentrifugiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

2.2.6 Quantifizierung der RNA

Aufgrund der geringen RNA-Menge der Proben wurde die RNA-Konzentration anschließend mit Hilfe des Quant-iT™ RiboGreen RNA Assay Kit (*Invitrogen/Molecular Probes*, Göttingen, Deutschland)® gemessen. Bei dieser Methode bindet ein interkalierender Farbstoff an die Nukle-

insäuren und ändert dabei sein Fluoreszenzverhalten. Die Fluoreszenzstärke wurde mit Hilfe des Spektramax M2 (Molecular Devices®, USA) gemessen und ausgewertet. Die Durchführung der Messung erfolgte streng nach dem Protokoll von *Invitrogen/Molecular Probes*. Mit Hilfe des im Kit enthaltenen ribosomalen RNA-Standards wurde eine Standardmessreihe erstellt und die zu bestimmenden Proben mit dieser verglichen.

2.2.7 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

In einem ersten Schritt wurde die RNA denaturiert, das heißt die durch Wasserstoffbrückenbindungen entstandene Sekundärstruktur der RNA gelöst. Dazu wurden pro Ansatz 11,2 µl RNase-freies Wasser (in der Folge „Wasser“), 0,8 µl RNasin und 10 µl der RNA-Probe bzw. Wasser (Leerwert) in einem 0,2 ml (PCR-) Eppendorfgefäß gemischt und im *Thermocycler* Perkin Elmer für 10 Minuten auf 70 °C erwärmt. Im nächsten Schritt erfolgte die reverse Transkription, in der die RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wurde. Dazu wurde der Probe im nächsten Schritt nach dem Abkühlen auf 4 °C je Ansatz 8 µl RT-Puffer (5x), 0,5 µl RNasin, 0,25 µl M-MLV-Reverse-Transkriptase, 8 µl dNTP-Mix (10 µM) und 2 µl Oligo-dT-Mix (75,8 µM) hinzugefügt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Ansatz für 60 Minuten auf 42 °C erwärmt, dann für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die nun entstandene cDNA bei -20 °C gelagert.

Die Vervielfältigung der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mit dem Roche LightCycler®-System durchgeführt. Dieser Vorgang umfasst drei Schritte. Zuerst wurde die Probe bei 95 °C für 10 Minuten zur Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der cDNA und Primer präinkubiert. Im nächsten Schritt folgte die Amplifikation der spezifischen DNA-Zielsequenz, in einem dritten Schritt das Erstellen der Schmelzkurven zur Identifikation des PCR-Produkts und schließlich das Abkühlen auf 40 °C. Die Schritte der Amplifikation bestehen aus der Denaturierung der DNA bei 95 °C für 10 Sekunden, der Primeranlagerung bei einer in Tabelle 2 dargestellten spezifischen Temperatur und der anschließenden Elongation bei 72 °C für 15 Sekunden, bei der die DNA-Polymerase die jeweiligen Stränge in 5' → 3' Richtung synthetisiert.

Das LightCycler®-System-Protokoll wurde für jedes Primerpaar mittels einer Effizienzkurve an einer Corti/Limbus/Modiolus cDNA bezüglich Annealing-Temperatur und Effizienz optimiert. Jeder Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl, zusammengesetzt aus je 1 µl 3'- und 5'-Primer

(10 μ M), 4 μ l Master Mix (Roche), abhängig von der Zielsequenz 1 – 5 μ l cDNA (siehe Tabelle 2) und Wasser (PCR-Grad).

Tabelle 2: Parameter der RT-PCR nach Primeroptimierung

<i>Gen</i>	<i>Annealing-Temperatur</i>	<i>Schmelztemperatur</i>	<i>Effizienz</i>	<i>cDNA-Einsatz in μl</i>
Tbp (201bp)	66 °C	60 °C	1,92	5
Prestin (164bp)	70 °C	65 °C	1,88	5
Gata3 (174bp)	66 °C	60 °C	1,98	3
Sp1 (195bp)	66 °C	60 °C	1,82	5
C/ebp β (158bp)	66 °C	60 °C	1,92	5
Carf (233bp)	66 °C	60 °C	1,95	5
Creb1a (154bp)	66 °C	60 °C	1,88	3
Pou4f3 (186bp)	68 °C	60 °C	1,88	3

Zusammenstellung der untersuchten Transkriptionsfaktoren mit Annealing- und Schmelztemperatur sowie der Effizienz, Menge der eingesetzten cDNA in die RT-PCR der untersuchten Gene.

2.2.8 Kalibrator

Für unsere Untersuchungen führten wir in jeder Serie zwei Kalibratorproben ab dem Schritt der reversen Transkription als interne Qualitätskontrolle und Normierung der Ergebnisse mit. Der Kalibrator enthielt Cortisches Organ mehrerer neugeborener Ratten (PT 3 - 5). Durch die Berechnung nach Pfaffl (2001) werden alle Ergebnisse relativ auf die Expression innerhalb des Kalibrators bezogen (siehe Kapitel 2.2.9). Hierbei wurde der Mittelwert beider Kalibratorproben verwendet. Während dieser Arbeit war es nötig, einen neuen Kalibratorpool zu erstellen. Dies betrifft die Ergebnisse von Natriumbutyrat und Retinsäure, die noch mit dem vorherigen Kalibrator bestimmt wurden. Da die Zusammensetzung der Kalibratoren nicht identisch ist, werden die Ergebnisse der organotypischen Kultur als relative Veränderungen in Bezug zu den Kontrollen angegeben.

2.2.9 Quantifizierung der mRNA

Um die Variabilität zu minimieren, wurden die Messwerte der PCR für die untersuchten Gene gegen zwei Bezugssysteme normiert. Dies war zum einen die Gesamt-RNA und zum anderen das Haushaltsgen Tbp. Dementsprechend sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen als relative Einheiten, bezogen auf die Gesamt-RNA (RE/RNA) und bezogen auf Tbp (RE/Tbp), angegeben. Die Berechnung des Verhältnisses der Expression eines Gens auf die RNA (RE/RNA) wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$RE/RNA = \frac{10^{\left(\frac{CP}{a_{Zielgen}}\right)} \times [Faktor]}{m_{GesamtRNA}(Probe)} \quad (1)$$

$$a_{Zielgen} = - \frac{1}{\log_{10}(E_{Zielgen})} \quad (2)$$

Symbole: Faktor: willkürlich 10^{11} gewählt; $m_{GesamtRNA}(Probe)$: Masse pro 1 μ l Eluat, $E_{Zielgen}$: Effizienz des Zielgens. Die Herleitung findet sich bei Gross et.al. (2007).

Folgendes Beispiel soll die Rechnung verdeutlichen: Es sei $CP_{Prestin} = 27,29$; $m_{GesamtRNA} = 20,19$ ng; $E_{Prestin} = 1,87$. Diese Werte eingefügt in (1) und (2) ergeben:

$$a = -3,68$$

$$RE/RNA = \frac{10^{\frac{27,29}{-3,68}} \times 10^{11}}{20,19} = 188.$$

Des Weiteren wurden in dieser Untersuchung die PCR-Ergebnisse des Zielgens auf die Expression eines Referenzgens bezogen. Die Berechnung des Verhältnisses ist in Formel (3) dargestellt und erfolgte nach Pfaffl (2001).

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{Zielgen}[Cali-Probe]}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CP_{Referenzgen}[Cali-Probe]}} \quad (3)$$

Symbole: Ratio: Expression des Zielgens gegen Referenzgen normalisiert; $\Delta CP_{Zielgen}[Cali-Probe]$: Differenz zwischen Zielgen-CP-Werte von Kalibrator und Probe; $\Delta CP_{Ref}[Cali-Probe]$: Differenz zwischen Referenzgen-CP-Werte von Kalibrator und Probe; $E_{Zielgen}$: Effizienz des Zielgens; $E_{Referenzgen}$: Effizienz des Referenzgens.

Im Folgenden soll ein Beispiel exemplarisch durchgerechnet werden. Hierbei ist Tbp das Referenzgen und Prestin das Zielgen:

Referenzgen: $E_{Tbp} = 1,99$; $CP_{Tbp}(Cali) = 22,31$; $CP_{Tbp}(Probe) = 24$.

Dann ist $\Delta CP_{Tbp}(Cali-Probe) = -1,69$ und $E_{Tbp}^{\Delta CP_{Tbp}} = 0,3125$.

Zielgen: $E_{Prestin} = 1,87$; $CP_{Prestin}(Cali) = 27,22$; $CP_{Prestin}(Probe) = 26,28$.

Dann ist $\Delta CP_{Prestin}(Cali-Probe) = 0,94$ und $E^{\Delta CP_{Prestin}} = 1,805$

Aus $E_{Prestin}^{\Delta CP_{Prestin}} / E_{Tbp}^{\Delta CP_{Tbp}}$ ergibt sich das Verhältnis Prestin/Tbp von 5,78.

2.2.10 Gelelektrophorese und Dokumentation

Zur Kontrolle der Primerspezifität wurde die amplifizierte cDNA in einer Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei der Gelelektrophorese wird an ein in einer ionischen Pufferlösung liegendes Gel ein elektrisches Feld angelegt. In die im Gel eingelassenen Taschen wird das aufzutrennende Gemisch gegeben. Die Moleküle wandern nun, abhängig von ihrer Größe, Ladung und Konformation, unterschiedlich schnell durch dieses Gel, wobei sich kleine, negativ geladene Teilchen am schnellsten auf die positiv geladene Anode zubewegen. Nach entsprechender Färbung der Teilchen wird die Laufweite an einem Standard verglichen.

Es wurden also 1 - 2 μ l Amplifikat (bzw. Leerwert) mit 2 μ l 5x Ladepuffer in 10 μ l (Gesamtvolumen) 0,5fach TBE-Puffer und dem Molekulargewichtsmarker V (8-587 bp) auf ein SybrGreenhaltiges (GelStar Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex) 3%iges Agarose-Gel (3 g Genagarose Tiny III + 100 ml 0,5xTBE-Puffer/destilliertes Wasser) aufgetragen. Bei 100 V erfolgte die Auftrennung in einer Gelelektrophoresekammer für etwa 45 Minuten. Die so aufgetrennten und markierten Banden wurden mittels Geldokumentations- und -analysesystems dargestellt und digitalisiert gespeichert.

2.2.11 Methode der computerbasierten Analyse der Promotoren

Zur Bestimmung der Promotorbereiche von Prestin wurde das Programm *Gene2Promoter* der Firma Genomatix mit freundlicher Genehmigung verwendet (Genomatix, 2008). Die Analyse wurde am 28.10.2008 durchgeführt. Das Programm Gene2Promoter verwendet zur Ermittlung möglicher proximaler und distaler Promotorbereiche eines Genes einen multifaktoriellen Ansatz. Hierbei werden zusätzlich zu den etwa 600 Bp vor und 300 Bp nach ATG liegenden proximalen Promotoren distale Promotorbereiche gesucht, indem stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegende Sequenzen einem phylogenetischen Alignment zur Identifizierung konservierter Bereiche unterzogen werden. Diese werden anschließend auf promotordefinierende Sequenzen hin untersucht (Cartharius et al., 2005).

Tabelle 3: Promotorbereiche Prestin Ratte

Promotorset (PS)	Position	Start	Ende	Länge
3	-550	8656764	8657415	652 Bp
2	-21513	8635801	8636401	601 Bp
1	-26042	8631272	8631877	606 Bp

Zusammenstellung der von Genomatix ermittelten Promotorbereiche für Prestin, PS: von Genomatix verwendete Benennung der Genabschnitte, Start und Ende in Bezug von Base Nr.1 des Chromosom 4 der Ratte NC_005103, Position relativ zu ATG von Prestin (Startbase der Translation).

Die für Prestin der Ratte ermittelten Promotorbereiche sind in Tabelle 3 angegeben. Weiterhin wurde mit dem proximalen Promotorbereich (Promotorset 3) eine Sequenzvergleichsanalyse mit dem Programm blastn® (*Nucleotid Basic Local Alignment Search Tool*) der *National Library of Medicine* (Zhang et al., 2000) durchgeführt, um homologe DNA-Abschnitte in den stromaufwärtsliegenden Genabschnitten von Prestin bei Maus, Mensch und Rind zu ermitteln.

Zur Untersuchung der Promotorbereiche auf mögliche DNA-Bindungsstellen der in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren wurde das Genanalyseprogramm MochiView 1.45 (Abb. 5) verwendet (URL: <http://johnsonlab.ucsf.edu/sj/mochiview-start/>, Zugriff 2010). MochiView ist eine Gensequenzanalysesoftware, mit der es möglich ist, importierte DNA-Sequenzen auf das Vorhandensein von Transkriptionsbindungsstellen hin zu untersuchen (Homann und Johnson, 2010). Hierzu wurden die Sequenzen der von Genomatix angegebenen Promotorbereiche in

MochiView importiert. Weiterhin wurde in der Literatur nach Konsensussequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren gesucht (siehe Tabelle 4). Diese wurden als Bindungsmotive in dem Programm MochiView definiert und in einer Datenbank gespeichert. Anhand der Konsensussequenzen der importierten Transkriptionsfaktoren wurde für jeden Faktor die positionsgewichtete, ortsspezifische Bindungsstärke innerhalb der importierten Promotorsequenzen berechnet.

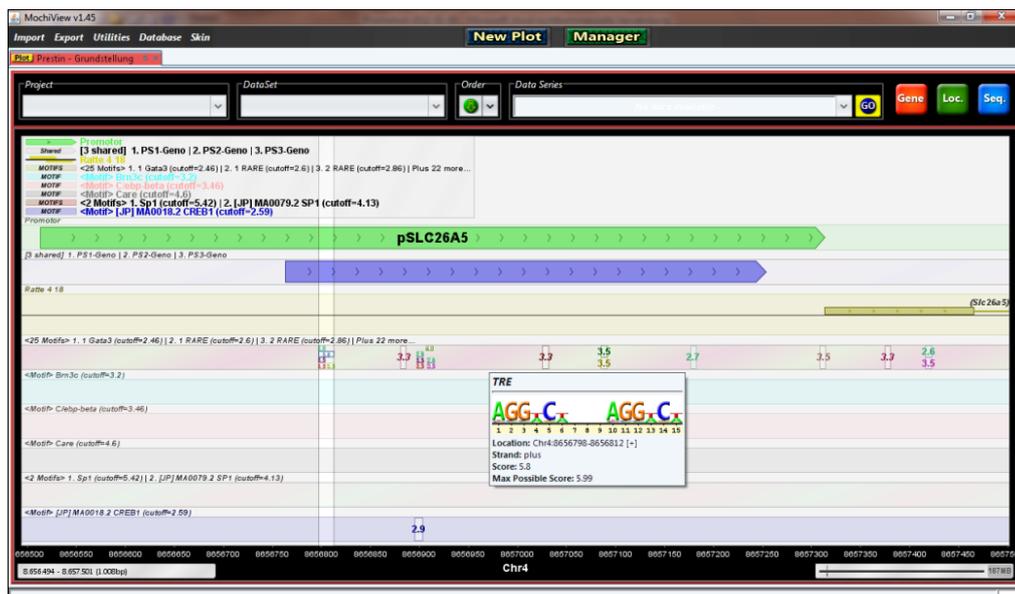


Abb. 5: *in silico* DNA-Analyseprogramm MochiView 1.45 (Homann und Johnson, 2010). Dargestellt ist die Promotorregion von Prestin (Ratte). Angezeigt wird die Bindungswahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktoren an dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt.

Zur Evaluation, ob gefundene Bindungsstellen überzufällig häufig in einer untersuchten DNA-Sequenz vorhanden sind, mischten wir die Basen der untersuchten Promotorbereiche mittels der Software “shuffleseq” (Rice et al., 2000; Schmitz) von EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/shuffleseq>, Zugriff 2010) und erstellten jeweils 50 gemischte Sequenzen gleicher Nukleotidzusammensetzung. Diese Datensets wurden ebenfalls mittels MochiView auf die Bindungsstellenhäufigkeit der untersuchten Transkriptionsfaktoren hin untersucht.

Tabelle 4: Konsensussequenzen der untersuchten Transkriptionsfaktoren

<i>Gen</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Quelle</i>
POU4F3	RCTCATTAAY	(Xiang et al., 1995)
C/EBP β	RTTGCGYAAAY TKNNGYAAK TKNNGNAAK	(Osada et al., 1996)
CARF	YSANAACGAGGC ANAACGAGGC CTATTTTCGAGGC WNHWWTWMSHY	(Pfenning et al., 2010) (Tao et al., 2002)
RARE	AGGTTA, AGGACA, AGGCTA, AGGTGA, AGTTCA, GGGCCA, GGTTCa, AGTTCG	(Cho et al., 2001)
TRE	AGGACT, TGGTCT, TAAGGAC	(Weber et al., 2002) (Katz und Koenig, 1993; Umesono et al., 1991)
RARE/TRE	AGGTCA, GGGTCA	(Umesono et al., 1991) (Shago und Giguere, 1996)
GATA3	AGATAG, AGATAA, GATGAT, GATAA, TGATAG, TGATAA, AAGATAAG	(Grigorieva et al., 2010; Hong et al., 2006; Okazaki et al., 2009)

Dargestellt sind die in MochiView verwendeten Konsensussequenzen der einzelnen Transkriptionsfaktoren. R = A/G, Y = C/T(U), K = T(U)/G, N = jede Base, S = C/G, TRE = Thyroxid-Bindungselement (*thyroxid response element*), RARE = Retinsäure-Bindungselement (*retinoic acid response element*), CaRE1 = Kalziumbindungselement (*calcium response element*).

2.3 Statistik

2.3.1 Methodische Varianz

Für fast alle Messungen wurden zwei Kalibratorproben als Doppelwerte in allen Arbeitsschritten der Probenaufarbeitung mitgeführt. Aus den Doppelwerten der Kalibratorproben wurde die Streuung nach Formel (5) ermittelt, welche ein Maß für die Präzision in der Serie der Messung war.

Zur Herleitung

Zur Berechnung der gepoolten Varianz wurde die Formel (1) nach Butler (1985) verwendet.

$$s^2 = \frac{(\sum_{i=1}^o (x_i - \bar{x}_i)^2)_a + (\sum_{j=1}^p (x_j - \bar{x}_j)^2)_{a+1} + \dots + (\sum_{k=1}^q (x_k - \bar{x}_k)^2)_n}{(i-1) + (j-1) + \dots + (k-1)} \quad (1)$$

Angepasste Formel zur Herleitung der gepoolten Varianz nach Butler (1985). Laufindex (i,j,k) – Stichprobengröße; tiefgestellter Funktionsindex (a,n) – Anzahl der Stichproben (Doppelwertbestimmungen); s^2 - gepoolte Varianz.

Durch das Vorliegen von Doppelwerten ist die Stichprobengröße 2. Dadurch ergibt sich:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^2 (x_i - \bar{x}_i)^2 &= \left(x_1 - \frac{x_1 + x_2}{2}\right)^2 + \left(x_2 - \frac{x_2 + x_1}{2}\right)^2 \\ &= \left(\frac{x_1 - x_2}{2}\right)^2 + \left(\frac{x_2 - x_1}{2}\right)^2 \quad | \text{Bei } (x_2 - x_1)^2 = (x_1 - x_2)^2 \text{ folgt daraus} \\ &= 2 \times \frac{(x_1 - x_2)^2}{4} \\ &= \frac{1}{2}(x_1 - x_2)^2 \end{aligned} \quad (2)$$

Weiterhin entspricht bei einem Endwert der Laufindizes (i, j, k) in (1) von 2 der Nenner in (1) der Anzahl der Doppelwertbestimmungen n (siehe (4)).

$$(i-1) + (j-1) + \dots + (k-1) = n \quad (4)$$

Somit lässt sich die Gleichung (1) für Stichprobengrößen von i, j, k = 2 durch Einsetzen von (3) und (4) in (1) folgendermaßen vereinfachen:

$$s^2 = \frac{1}{2n} \sum_{l=1}^n (x_1 - x_2)_l^2 \quad (5)$$

Durch das Ziehen der Wurzel der gemeinsamen Varianz aus (5) erhält man die gemeinsame Standardabweichung des Mittelwerts des Kalibrators.

Der Variationskoeffizient (VK) wird berechnet nach (6):

$$VK = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100 \quad (6)$$

Tabelle 5 fasst die methodische Varianz der Untersuchungen für die einzelnen Gene zusammen. Es zeigt sich, dass der Variationskoeffizient (VK) der RT-PCR (inkl. reversen Transkription) für alle bestimmten Gene, außer Sp1, bei $\leq 15\%$ liegt. Bei Sp1 wurde ein VK von 19% erreicht. Als weitere Qualitätskontrolle der Daten wurde zusätzlich zu den Proben in jeder Serie eine Kalibratorprobe mitgeführt. Abb. 6 zeigt für jedes bestimmte Gen den Wert der Kalibratorprobe im Zeitraum der Untersuchung. Es konnten für keines der bestimmten Gene signifikante Trends ermittelt werden.

Tabelle 5: Methodische Varianz der RT-PCR

<i>Gen</i>	<i>VK (%)</i>	<i>n</i>
Tbp	8	13
Prestin	14	10
Gata3	7	3
C/ebp β	13	11
Sp1	19	11
Carf	15	11
Creb1a	15	11
Pou4f3	12	8

Variationskoeffizient (VK) aus den Doppelwerten der Kalibratoren nach Formel (6) bestimmt. n – Anzahl der Untersuchungen.

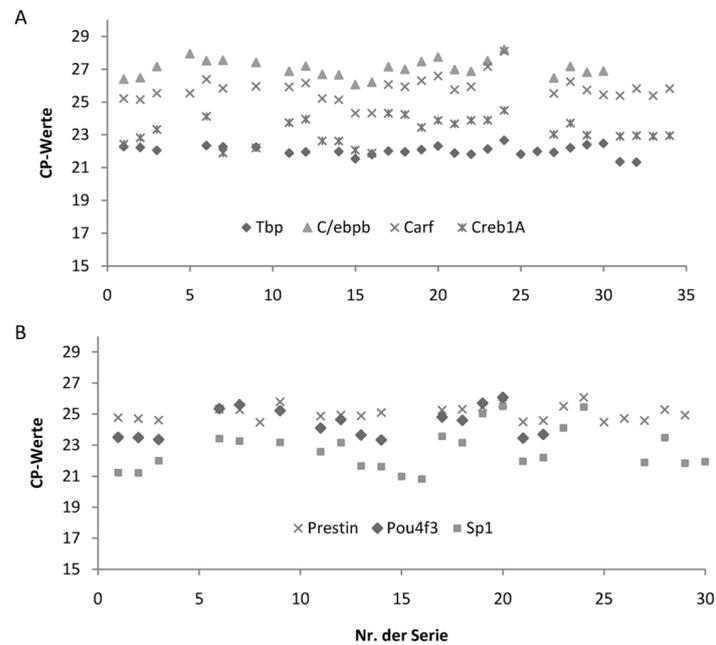


Abb. 6: Veränderung des Kalibratormesswertes jedes Gens im Verlauf der Bearbeitungsserien. In der Abbildung dargestellt ist die fortlaufende Bestimmung der bei jeder Reaktionsserie mitgeführten Kalibratorprobe für die jeweilig bestimmten Gene. In Klammern zu jedem Gen angegeben ist die Gleichung der Regressionsgraden sowie der Korrelationseffizient: A) Tbp ($y = -0,0085x + 22,19$, $R = 0,25$), C/ebp-b ($y = 0,0016x + 27,034$, $R = 0,02$), Carf ($y = 0,013x + 25,546$, $R = 0,18$) und Creb1a ($y = 0,012x + 22,98$, $R = 0,17$). B) Prestin ($y = 0,005x + 24,96$, $R = 0,10$), Pou4f3 ($y = 0,003x + 24,37$) und Sp1 ($y = 0,039x + 22,10$, $R = 0,24$).

2.3.1 Statistische Auswertung

Um die Zuverlässigkeit der Bestimmung der Expression der jeweiligen Gene zu sichern, wurde die Expression jeweils bezogen auf den Gesamt-RNA Gehalt und das Referenzgen Tbp angegeben. Im Folgenden werden nur Veränderungen als relevant betrachtet, die bezogen auf beide Referenzsysteme signifikant sind.

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mithilfe des Programms STATISTICA 6.0 - Studentenversion. Mittelwerte \pm Standardabweichung (Stabw.) bzw. Standardfehler (Std.f.) wurden berechnet und mithilfe des Programms Microsoft Excel 2007 grafisch dargestellt. Die Daten wurden mittels einfaktorieller ANOVA auf Ausreißerwerte analysiert und

mittels *post-hoc*-Test (Scheffé-Test, LSD) verglichen. Als signifikant wurden ein $p < 0,05$ gewertet. Proben mit dazugehörigen Kontrollen wurden mit dem Wilcoxon Paar-Test bewertet. Der konservative Scheffé-Test diente dazu, Gruppenmittelwerte miteinander zu vergleichen, was für eine Signifikanz eine größere Differenz der Mittelwerte erfordert. Neben dem Scheffé-Test wurde der liberalere *Least-Significant-Difference-Test* (LSD) verwendet. Dieser paarweise multiple Vergleichstest detektiert auch geringere signifikante Differenzen durch das Zusammenführen der Varianzen der Gruppen.

2.3.1 Qualitätskontrolle der Probenkonservierung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden bereits bearbeitete Proben aus der Arbeitsgruppe verwendet. Zur Evaluierung der Probenqualität nach der Aufbewahrungsphase wurden die nachbestimmten Ergebnisse der Prestin-Expression mit denen der Erstbestimmung in Abb. 7 in Korrelation gebracht. Es zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen beiden Bestimmungen, was für eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und somit einer guten Qualität der Proben spricht.

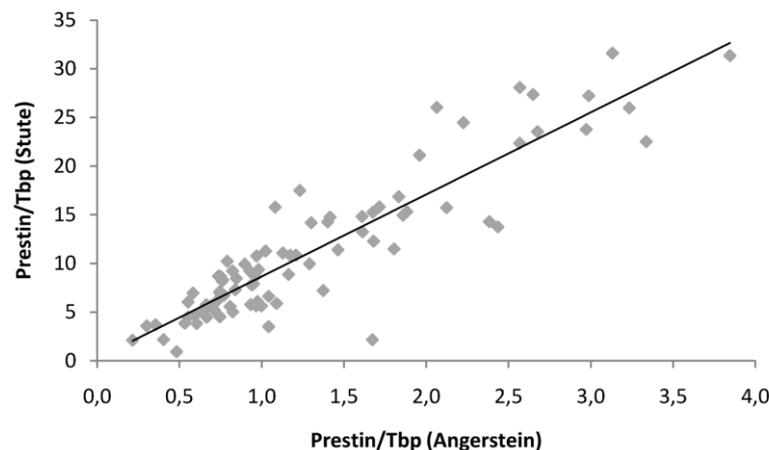


Abb. 7: Korrelation der relativen Prestin-Expression aus den von Kerstin Stute (2011) verwendeten Proben mit der in dieser Arbeit durchgeführten Neubestimmung dieser Proben. Prestin jeweils bezogen auf Tbp. Es besteht eine enge, hochsignifikante Korrelation zwischen beiden Bestimmungen ($R = 0,91$ $p < 0,0001$, $n = 84$). Unterschiede der absoluten Werte resultieren aus der Verwendung unterschiedlicher Kalibratorproben in beiden Bestimmungen.

3 Ergebnisse

3.1 Die postnatale Entwicklung

3.1.1 Betrachtung der Haarzellen

Prestin wird ausschließlich im Innenohr in den äußeren Haarzellen exprimiert (Zheng et al., 2000). Somit hängt der Prestingehalt einer Probe von der Anzahl vitaler äußerer Haarzellen in einem präparierten Segment ab. Um diesen Einflussfaktor zu kontrollieren, wurden von allen Versuchsbedingungen Haarzellfärbungen angefertigt und die inneren und äußeren Haarzellen begutachtet.

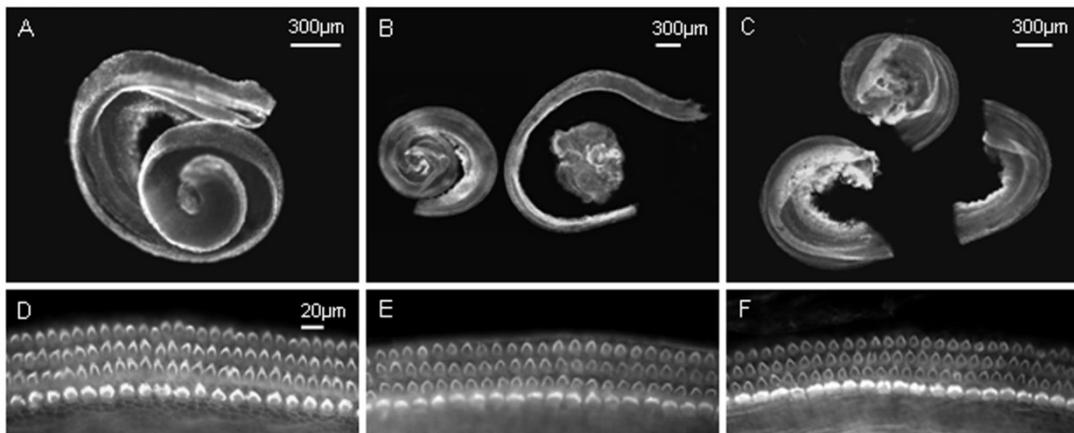


Abb. 8: Präparation des Cortischen Organs, Aufteilung in die Segmente und Darstellung der Haarzellen je Segment. Innenohr einer Ratte, postnataler Tag 5; A) häutiges Labyrinth aus der knöchernen Kapsel gelöst. B) Separieren von Cortischem Organ (links) sowie Stria vascularis und Modiolus (rechts) C) nach Segmenten aufgeteiltes Cortisches Organ; Darstellung der Haarzellen des apikalen (D), medialen (E) und basalen (F) Segments (Gross et al., 2011).

Um eine Aussage über die Gesamtzahl von äußeren Haarzellen pro Segment im Frischpräparat des Cortischen Organs zu erhalten, wurde ihre Anzahl pro Segment bestimmt. Hierzu wurde die Segmentlänge gemessen, die Anzahl der äußeren Haarzellen pro 100 μm gezählt (Tabelle 6) und daraus die Anzahl der ÄHZ pro Segment berechnet.

Tabelle 6: Haarzellendichte im Frischpräparat

<i>Bedingung</i>	<i>ÄHZ</i>			<i>IHZ</i>		
	<i>apikal</i>	<i>medial</i>	<i>basal</i>	<i>apikal</i>	<i>Medial</i>	<i>basal</i>
Frisch (n = 6)	13,1 ± 0,2	13,1 ± 0,9	12,7 ± 0,8	8,7 ± 0,9	8,5 ± 1,2	8,6 ± 1,4

Angegeben ist die mittlere Anzahl ± Stabw. der ÄHZ und IHZ pro 100 µm im Frischpräparat des Cortischen Organs..

Wie Tabelle 6 und Abb. 8 zeigen, ist die Haarzellendichte der äußeren und inneren Haarzellen im Frischpräparat des Cortischen Organs in allen Segmenten gleich groß. Abb. 9 zeigt die mittlere Anzahl der Haarzellen pro Segment, ebenfalls im Frischpräparat des Cortischen Organs. Im apikalen Segment finden sich durchschnittlich 1100 Haarzellen (HZ), im medialen Segment 900 HZ und im basalen Segment 850 HZ. Dabei ist die durchschnittliche Haarzellanzahl apikal signifikant höher als im medialen und basalen Segment.

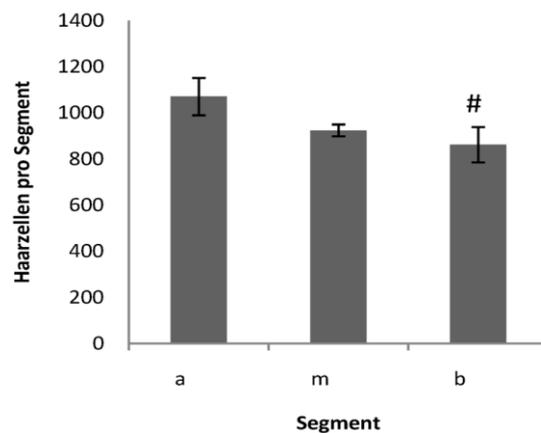


Abb. 9: Anzahl der äußeren Haarzellen im apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segment 5 Tage alter Ratten. Dargestellt sind Mittelwerte ± Stdf. #p < 0,05 (LSD) vs. apikal (n = 5). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe einer Okularstrichplatte (200 Stricheinheiten = 2 mm) und einem Objektmikrometer. Dazu wurden (1) die HZ/100 µm und (2) die Länge des Segments gemessen, um (3) daraus die Anzahl der Haarzellen pro Segment zu berechnen.

Da sowohl die RNA-Masse als auch die Menge der Tbp-mRNA proportional zur Gewebegröße zunehmen, sollte bei einer Normierung auf diese Referenzsysteme der Größenunterschied der Segmente keinen Einfluss auf die gemessenen Expressionsunterschiede haben. Die Gesamtzahl an HZ/Segment ist zur Abschätzung des Prestin mRNA-Gehaltes pro Haarzellen im apikalen, medialen und basalen Bereich sinnvoll (siehe 4.1 Referenzsysteme). Diese Zahl zeigt zugleich, dass das apikale Segment etwas größer als das mediale und basale Segment ist. Insgesamt hat die neugeborene Ratte damit etwa 3000 Haarzellen. Das stimmt mit Untersuchungen aus der Literatur gut überein (Dallos, 1996).

3.1.2 Entwicklung von RNA-Gehalt und Tbp mRNA Expression im Cortischen Organ

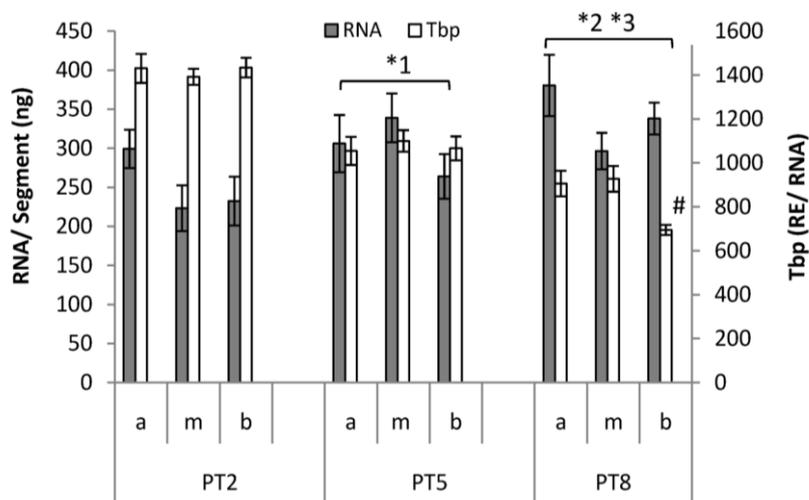


Abb. 10: Veränderung der Gesamt-RNA pro Segment und mRNA-Expression von Tbp während der postnatalen Entwicklung. Apikale (a), mediale (m) und basale (b) Segmente wurden zur Signifikanzberechnung zusammengefasst. Dargestellt sind Mittelwert \pm Stdf., PT – postnataler Tag, $*^1p < 0,0001$ (Tbp) PT5 vs. PT2; $*^2p < 0,0001$ (Tbp) PT8 vs. PT5; $*^3p < 0,006$ (RNA), PT8 vs. PT2 (Scheffé); $^{\#}p < 0,01$ (LSD) basal vs. PT8 apikal oder medial, jeweils $n = 6$, zusammen $n = 18$.

Das Verhalten beider Referenzsysteme unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen zeigt Abb. 10. Es zeigt sich ein leichter Anstieg der Gesamt-RNA von etwa 240 ng pro Segment am postnatalen Tag 2 auf 330 ng pro Segment am postnatalen Tag 8. Da die Gesamt-RNA ein gutes

Maß für die Gesamtmasse an Gewebe ist (siehe 4.1 unten), könnte dieser Anstieg ein Ausdruck für das Wachstum des Cortischen Organs sein. Die Tbp-Expression zeigt überraschenderweise einen 40%igen Abfall zwischen PT2 und PT8. Am PT2 und PT5 liegt eine identische Expression im apikalen, medialen und basalen Segment vor. Nur am PT8 gibt es einen 20%igen Unterschied zwischen dem medialen und basalen Segment.

3.1.3 Entwicklung von der mRNA-Expression von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren

Die Entwicklung von Prestin und Pou4f3 zwischen dem 2. und 8. postnatalen Tag ist in Abb. 11 dargestellt. Der Gehalt von Prestin-mRNA steigt zwischen PT2 und PT8 um den Faktor 6 im apikalen, den Faktor 5 im medialen und den Faktor 2 im basalen Segment an. Dadurch bildet sich innerhalb des Cortischen Organs zum PT8 hin ein apikal-basaler Gradient aus, bei dem Prestin apikal 2,4fach höher exprimiert ist als basal (Scheffé: $p < 0,0001$). Dieser Gradient wurde schon in vorherigen Arbeiten beschrieben (Judice et al., 2002; Gross, Machulik et al. 2005; Mazurek, Haupt et al. 2007). Diese Entwicklung ist in beiden Bezugssystemen nachweisbar.

Bei Pou4f3 gibt es zwischen den apikalen, medialen und basalen Segmenten am postnatalen Tag 2 und 5 keine signifikanten Unterschiede. Zwischen PT5 und PT8 kommt es im apikalen und medialen Segment zu einem deutlichen Anstieg der Pou4f3-Expression. Hierbei steigt Pou4f3 apikal um den Faktor 2 (LSD: $p < 0,001$) und im medialen Segment um den Faktor 1,5 (LSD: $p < 0,02$) an. Basal kommt es zu keinem Anstieg der Expression. Dadurch bildet sich auch bei Pou4f3, wie bei Prestin, ein apikal-basaler Gradient aus. Apikal ist Pou4f3 1,6fach höher exprimiert als basal (LSD: $p < 0,01$).

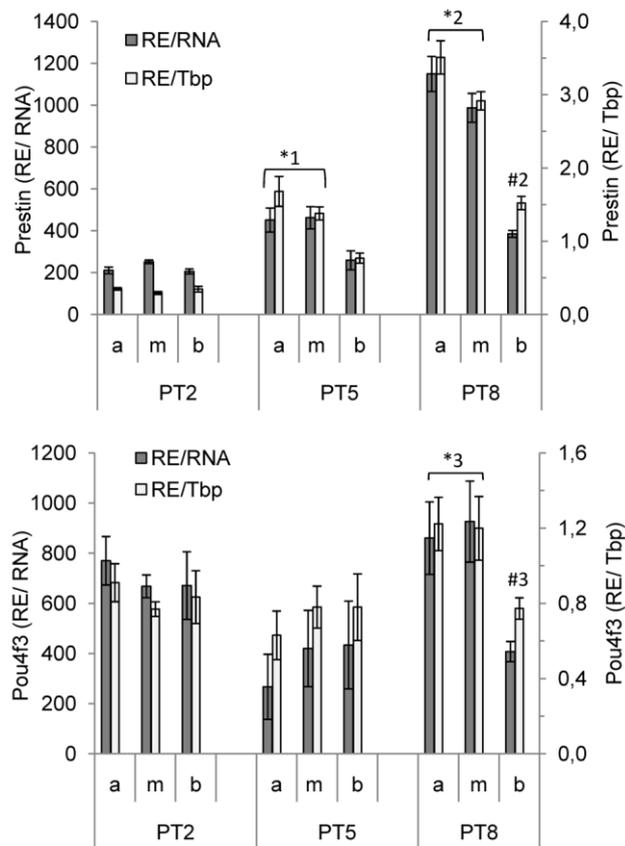


Abb. 11: Veränderung der Expression von Prestin und Pou4f3 im apikalen, medialen und basalen Segment während der postnatalen Entwicklung. Ergebnisse dargestellt in Bezug auf Gesamt-RNA und Tbp als Mittelwert \pm Stdf., Abkürzung siehe Abb. 10. Signifikanzen sind gültig in beiden Referenzsystemen. Prestin: $p^{*1} < 0.007$ versus PT2, $p^{*2} < 0.0001$ vs. PT5, $p^{\#2} < 0.002$ vs. apikal, Pou4f3: $p^{*3} < 0.008$ vs. PT5, $p^{\#3} < 0.02$ vs. apikal.

Sp1 und C/ebp β

Wie in Abb. 12 dargestellt, zeigen die konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren C/ebp β und Sp1 ein unterschiedliches Verhalten in der postnatalen Entwicklung. Die Expression von C/ebp β zeigt keine Veränderung zwischen PT2 und PT5 und steigt zum postnatalen Tag 8 an. Im apikalen und medialen Segment kommt es zu einem 1,6 - 2fachen Anstieg (LSD: $p < 0,001$). Am PT8 ist ein signifikanter apikal-basaler Gradient nachweisbar. Im Unterschied dazu fällt die Expression von Sp1 zwischen dem 2. und 5. postnatalen Tag um 35 % (LSD $p < 0,0001$) in allen Segmenten ab. Dieses Niveau der Expression wird bis zum postnatalen Tag 8 konstant exprimiert. Ein apikal-basaler Gradient wird nicht ausgebildet.

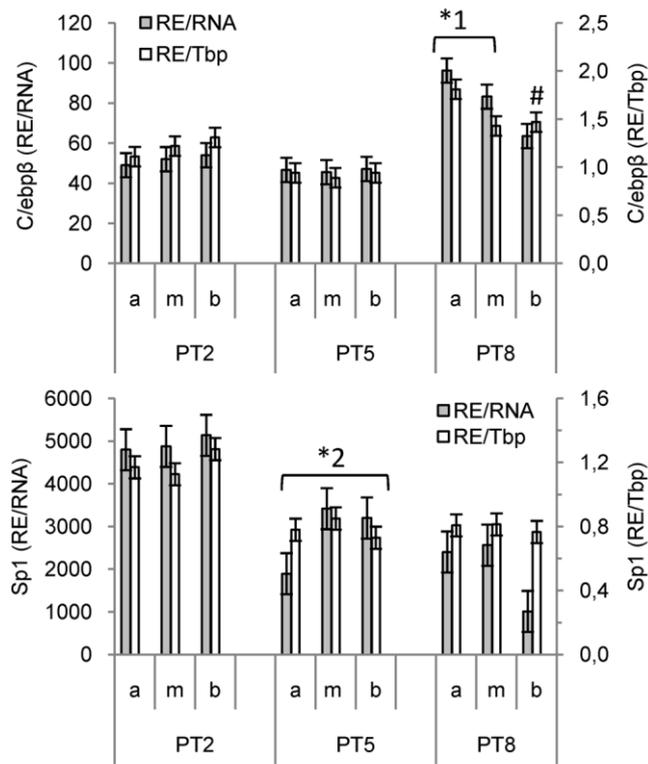


Abb. 12: Veränderung der Expression von C/ebpβ und Sp1 im apikalen, medialen und basalen Segment während der postnatalen Entwicklung. mRNA-Expression in Bezug auf Gesamt-RNA und Tbp dargestellt als Mittelwert \pm Stdf.. Abkürzung siehe Abb. 10. Signifikanzen sind gültig in beiden Referenzsystemen. $*^1p < 0.02$ vs. PT2, (apikalen und mittlere Segmente, Scheffé), $\#p < 0.008$ vs. apikal PT8 (LSD), $*^2p < 0.0001$ vs. PT2 (alle Segmente), $n = 6$.

Carf und Creb1a

In Abb. 13 ist die postnatale Entwicklung der signalabhängigen Transkriptionsfaktoren Carf und Creb zwischen PT2 und PT8 dargestellt. Die Expression beider Gene ändert sich in der postnatalen Entwicklung nicht signifikant und es kommt zu keiner Ausbildung eines apikal-basalen Gradienten. Dies zeigt sich sowohl in der Auswertung bezogen auf RNA als auch auf Tbp.

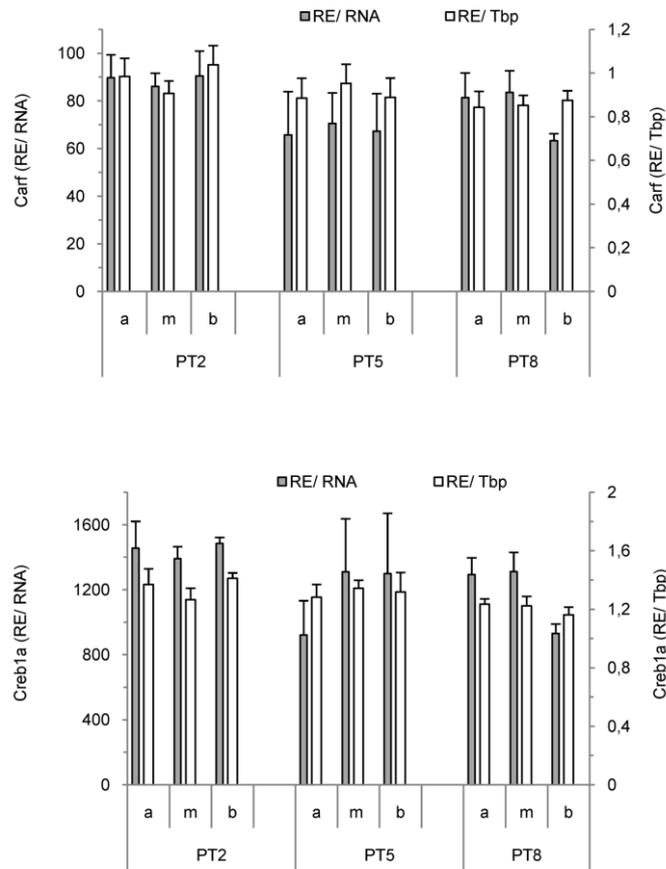


Abb. 13: Veränderung der Expression von Carf und Creb1a im apikalen, medialen und basalen Segment während der postnatalen Entwicklung. Abkürzung siehe Abb. 10. Es kommt zu keinen signifikanten Veränderungen.

3.2 Veränderung der Expression von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren in der organotypischen Kultur unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

3.2.1 Anzahl der Haarzellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

In Tabelle 7 ist die mittlere Anzahl der Haarzellen pro 100 μm (\pm Stabw.) von den untersuchten Gruppen dargestellt. Pro 100 μm finden sich durchschnittlich 12 - 13 ÄHZ und 8 - 9 IHZ. Verglichen mit *in vivo*-Bedingungen (frisch) kommt es *in vitro* (Kultur) zu einer geringen Abnahme der Haarzellanzahl pro 100 μm . Diese resultiert aus dem Wachstum der am Boden der Kulturplatte fixierten Segmente und der damit verbundenen relativen Abnahme der Haarzellendichte. Un-

ter den gewählten experimentellen Bedingungen ist kein signifikanter Abfall der Anzahl von inneren oder äußeren Haarzellen zu beobachten.

Tabelle 7: Anzahl intakter Haarzellen unter verschiedenen Bedingungen

<i>Bedingung</i>	<i>ÄHZ</i>			<i>IHZ</i>		
	<i>apikal</i>	<i>medial</i>	<i>basal</i>	<i>apikal</i>	<i>medial</i>	<i>basal</i>
Kultur (n = 9)	12,1 ± 0,9	12,0 ± 0,8	11,8 ± 1,1	8,0 ± 1,6	8,6 ± 1,2	8,2 ± 1,3
T4 (0,5 µM; n = 3)	13,9 ± 0,8	13,1 ± 0,8	13,3 ± 0,7	10,6 ± 0,4	9,7 ± 1,3	9,7 ± 0,5
KCl^a						
Kontrollen	11,7 ± 0,8	11,8 ± 0,8	12,0 ± 0,4	8,6 ± 1,0	8,6 ± 1,7	9,0 ± 1,2
K (35 mM, n = 3)	12,8 ± 0,6	12,0 ± 0,5	12,2 ± 0,5	9,1 ± 1,1	9,5 ± 0,9	9,1 ± 2,2
K (55 mM, n = 3)	11,1 ± 0,9	11,9 ± 1,1	11,8 ± 0,9	6,6 ± 1,9	6,6 ± 1,7	8,0 ± 2,0
Retinsäure^a						
10 µM (n = 3)	14,6 ± 0,2	14,6 ± 0,5	14,2 ± 0,6	10,7 ± 0,5	10,5 ± 1,6	10,1 ± 0,4
50 µM (n = 4)	14,2 ± 0,8	12,5 ± 2,6	13,3 ± 1,5	10,8 ± 0,4	10,3 ± 2,0	9,2 ± 3,3
100 µM (n = 5)	14,3 ± 1,0	13,2 ± 1,3	13,2 ± 1,4	9,6 ± 2,4	10,5 ± 1,3	9,6 ± 2,4
Natriumbutyrat^a						
10 µM (n = 3)	14,8 ± 0,1	14,6 ± 0,9	14,8 ± 1,1	10,8 ± 0,8	10,7 ± 0,7	10,4 ± 1,7
100 µM (n = 3)	15,0 ± 1,0	14,7 ± 0,4	14,6 ± 0,3	10,8 ± 0,8	10,7 ± 0,7	10,4 ± 1,7
500 µM (n = 3)	15,8 ± 1,0	14,5 ± 1,1	13,3 ± 1,2	11,3 ± 2,8	11,3 ± 0,3	9,9 ± 2,0
1000 µM (n = 3)	13,9 ± 2,1	13,3 ± 2,1	13,8 ± 0,8	9,4 ± 2,1	10,2 ± 2,5	10,6 ± 0,8
2000 µM (n = 2-4)	16,7 ± 1,0	12,9 ± 4,3	14,2 ± 0,9	7,7 ± 3,3	7,7 ± 6,6	7,7 ± 2,5

Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von inneren (IHZ) und äußeren Haarzellen (ÄHZ) pro 100 µm einer Reihe im apikalen, medialen und basalen Segment des Cortischen Organs postnataler Ratten. Angegeben ist der Mittelwert (± Stabw.). Untersucht wurden die Bedingungen, wie sie in Kapitel 2.2.4 oben) aufgeführt sind. ^a Gezählt von Julia Fuchs.

3.2.2 Die normale 48h-Kultur

3.2.2.1 Verhalten der Referenzsysteme

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Referenzsysteme Gesamt-RNA und Tbp als Referenzgen in der normalen Kultur verhalten. In Abb. 14 ist die Entwicklung der Gesamt-RNA und Tbp-Expression in der organotypischen 48h-Kultur getrennt für die apikalen, medialen und basalen Segmente dargestellt. Die mittlere RNA-Masse pro Segment in den Kontrollen liegt bei 250 ng und fällt in der Kultur auf 150 ng pro Segment ab. Tbp als Referenzgen zeigt keine signifikante Veränderung in der Kultur.

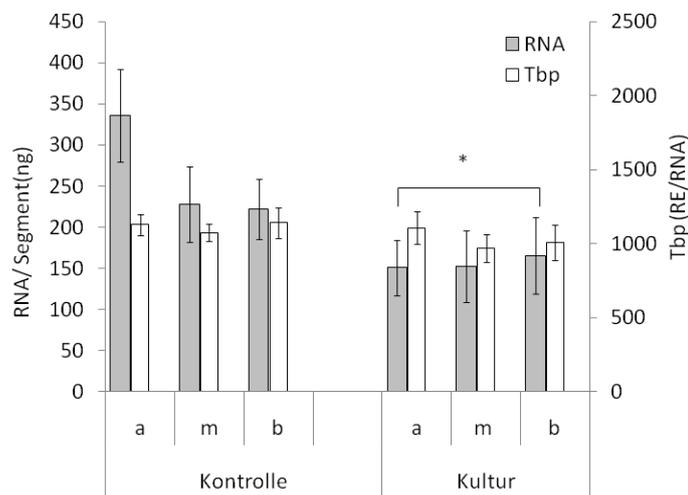


Abb. 14: Veränderung der RNA und Tbp-Expression in den apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segmenten des Cortischen Organs in der organotypischen 48h-Kultur. Für die Signifikanzberechnung wurden die Segmente zusammengefasst. * $p < 0,006$ (LSD) vs. Kontrolle (RNA), Tbp n. s., ($n = 7$ jeweils).

3.2.2.2 *Prestin und Pou4f3*

Abb. 15 zeigt für *Prestin* und *Pou4f3* die Veränderung der Expression in der Kultur im Vergleich zum Frischpräparat (Kontrolle). *Prestin* steigt im apikalen Segment um den Faktor 2,2 (Scheffé: $p = < 0,0014$) und medial um den Faktor 1,4 (LSD: $p < 0,03$) an. Dabei bildet sich ein apikal-basaler Gradient nach 48 h Kultivierung heraus, bei dem *Prestin* nach 48 h im apikalen Segment 2,5fach höher exprimiert ist als im basalen Segment (Scheffé: $p < 0,03$). Dies entspricht dem Gradienten, wie er auch am postnatalen Tag 8 in der normalen Entwicklung zu finden ist, und

deckt sich mit bisherigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe. Pou4f3 hingegen zeigt keine signifikanten Veränderungen.

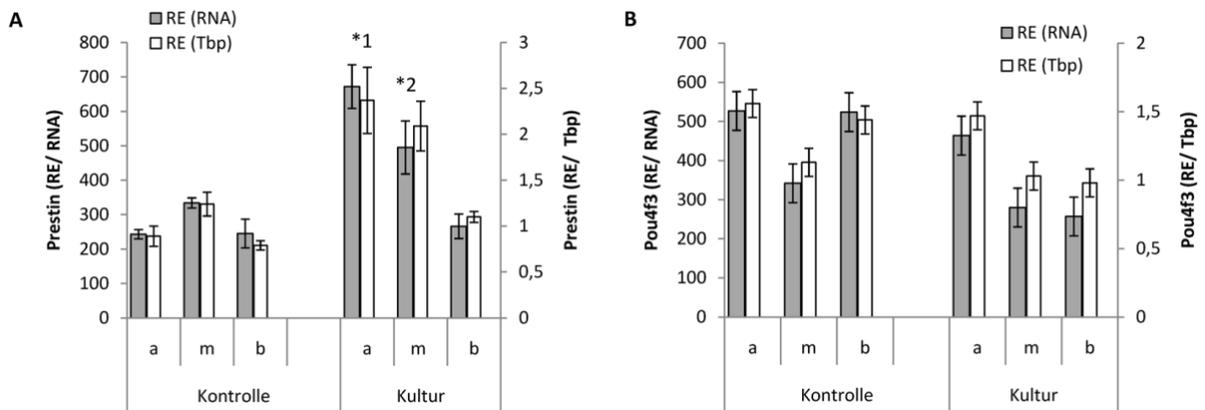


Abb. 15: Veränderung der Expression von Prestin und Pou4f3 in der organotypischen 48h-Kultur im apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segment. Angegeben ist sowohl der Bezug auf Gesamt-RNA und auf Tbp mRNA als Mittelwert \pm Stdf.. **(A) Prestin:** $*^1p < 0,002$ (Scheffé) vs. apikal Kontrolle, $*^2p < 0,03$ (LSD) vs. medial Kontrolle, basal Kultur vs. Kontrolle ($p = n. s.$), **(B) Pou4f3:** es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. ($n = 6$ jeweils).

3.2.2.3 *Sp1, C/ebp β , Carf und Creb1a*

Abb. 16 zeigt das Verhalten der Transkriptionsfaktoren *C/ebp β* , *Sp1*, *Carf* und *Creb1a* in der organotypischen Kultur mit den dazugehörigen Kontrollgruppen. Keiner der Transkriptionsfaktoren bildet einen apikal-basalen Gradienten aus. Fasst man, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Segmenten vorhanden sind, die apikalen, medialen und basalen Segmente in der Betrachtung zusammen, so zeigen sich folgende Veränderungen. *C/ebp β* steigt um 37 % (Scheffé: $p = 0,037$) an. Bei *SP1* kommt es zu einer 30%igen (LSD: $p = 0,08$) Reduktion der Expression. Diese tendenziellen Veränderungen von *C/ebp β* und *Sp1* zeigen sich auch in der normalen postnatalen Entwicklung. Bei *Carf* und *Creb1a* sind keine Veränderungen der mRNA-Expression nachweisbar.

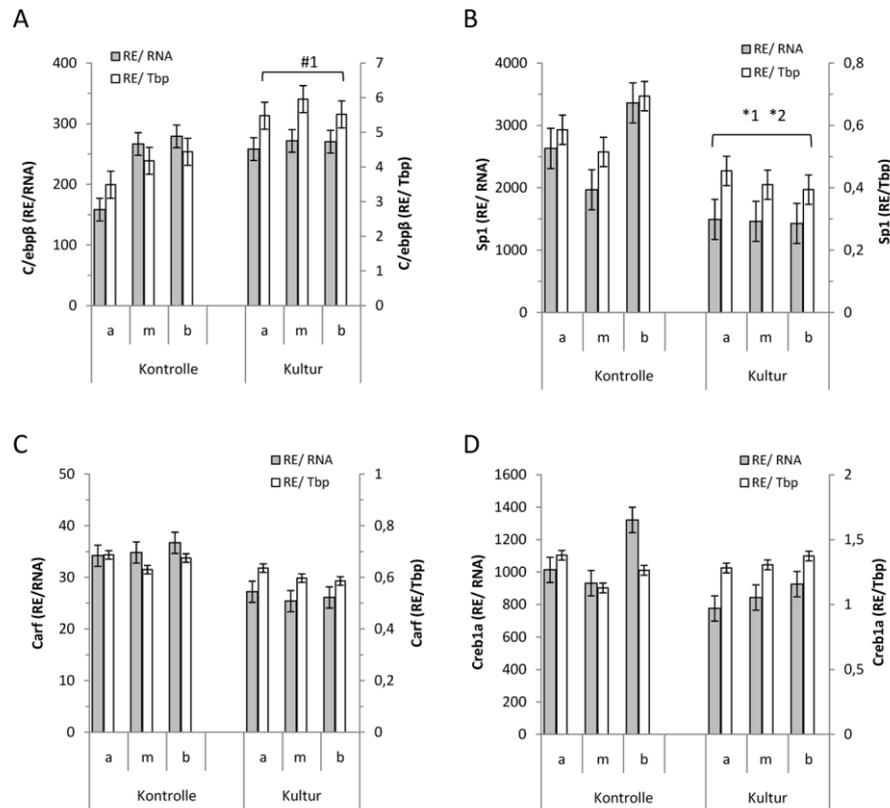


Abb. 16: Expression der Transkriptionsfaktoren C/ebpβ (A), Sp1 (B), Carf (C) und Creb1a (D) in der organotypischen 48h-Kultur (PT3-5). Dargestellt sind die Expression der Transkriptionsfaktoren, bezogen auf die Gesamt-RNA und auf das Referenzgen Tbp als Mittelwert \pm Stdf. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die Segmente bei C/ebpβ und Sp1 zusammengefasst. (A) $^{\#1}p < 0,04$ (Scheffé) vs. Kontrolle Tbp, Kultur vs. Kontrolle RNA ($p = n. s.$), ($n = 6$ jeweils); (B) $^*1p = 0,03$ (Scheffé) vs. Kontrolle RNA, $^*2p = 0,08$ (LSD) vs. Kontrolle Tbp; (C) und (D) keine signifikanten Veränderungen.

3.2.3 Kultivierung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Um die Koexpression der ausgewählten TF zu untersuchen, wurden für die Kultivierung des Cortischen Organs Bedingungen ausgewählt, die geeignet sind, die Prestin-Expression zu verändern. In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass T4- und NB-Zusätze zum Kulturmedium zu einer erhöhten Prestin-Expression und der Zusatz von KCl und Retinsäure zu einer verminderten Expression führen. Um den Einfluss der verschiedenen experimentellen Faktoren auf Prestin und die ausgewählten Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden in allen nachfolgenden Abbil-

dungen die Veränderungen der Expressionen auf die jeweilige Kontrolle bezogen (relative Veränderungen, engl. *fold change*). Dieses Herangehen erlaubt die statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Tests für gepaarte Stichproben.

3.2.3.1 48h-Kultur unter Zusatz von Thyroxin

Die Auswirkungen der Zugabe von 0,5 μM Thyroxin (T4) zur organotypischen Kultur (48 h) auf den RNA-Gehalt und Expression von Tbp ist in Abb. 17 dargestellt. Der RNA-Gehalt pro Segment liegt sowohl in den Kontrollen als auch in der Kultur zwischen 100 und 150 ng pro Segment. Im Gegensatz zur T4-freien Kultur kommt es unter Zugabe von 0,5 μM Thyroxin zu keinem Abfall der Gesamt-RNA pro Segment (vergleiche Abb. 17). Wahrscheinlich ist dieses Verhalten auf die wachstumsstimulierende Wirkung des Thyroxins zurückzuführen (Augustine und Hymer, 1978). Ebenso gibt es keinen Unterschied der Expression von Tbp in der T4-Kultur verglichen mit den dazugehörigen Kontrollen.

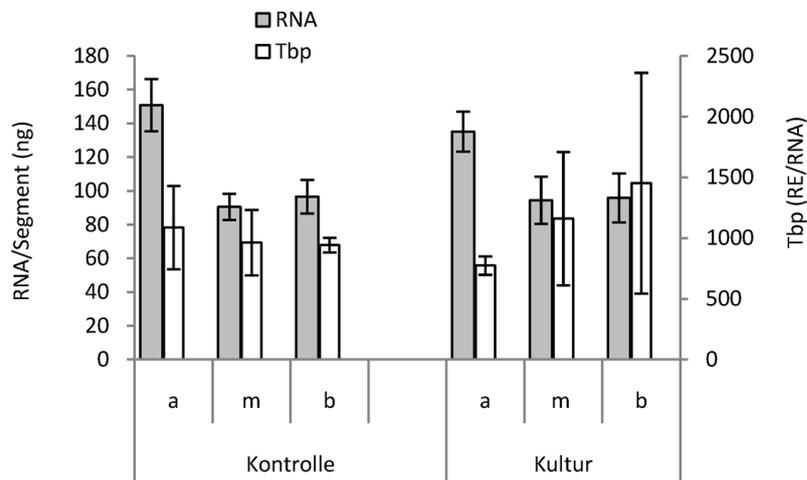


Abb. 17: Die Wirkung von 0,5 μM T4 auf die Entwicklung des RNA-Gehaltes und der Tbp-Expression in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs. Werte angegeben als Mittelwert \pm Stdf.. Für die Signifikanzberechnung wurden die jeweiligen Segmente zusammengefasst. Abkürzung siehe Abb. 10. Es ergeben sich keine signifikanten Veränderungen ($n = 4$ je Segment).

3.2.3.1.1 Prestin und ausgewählte TF

Die Zugabe von 0,5 μM Thyroxin zur organotypische Kultur bewirkt bei Prestin und Pou4f3 einen signifikanten Anstieg der Expression unter Ausbildung eines apikal-basalen Gradienten (Abb. 18). Prestin steigt um den Faktor 4 im apikalen (LSD: $p < 0,001$) und um den Faktor 1,7 im medialen Segment (LSD: $p = 0,03$), bezogen auf die Kontrollen, an. Basal steigt Prestin in dieser Untersuchungsserie nicht signifikant an.

Pou4f3 steigt im apikalen Segment um den Faktor 2,2 (LSD: $p < 0,05$) und medial nicht signifikant um den Faktor 1,7 ($p = 0,09$; $n = 7$) an. Die Tendenz ist allerdings deutlich zu erkennen und das Muster der Veränderungen von Pou4f3 ist der von Prestin sehr ähnlich. Die Expression von C/ebp β steigt deutlich um den Faktor 4,9 (Scheffé: $p < 0,0001$) in allen Segmenten an. Hierbei kommt es zu keiner Ausbildung eines Gradienten. Für Sp1 zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. Carf zeigt eine 25%ige Abnahme der mRNA-Expression (LSD: $p < 0,01$) im apikalen und medialen Segment. Für Creb1a zeigen sich keine signifikanten Veränderungen.

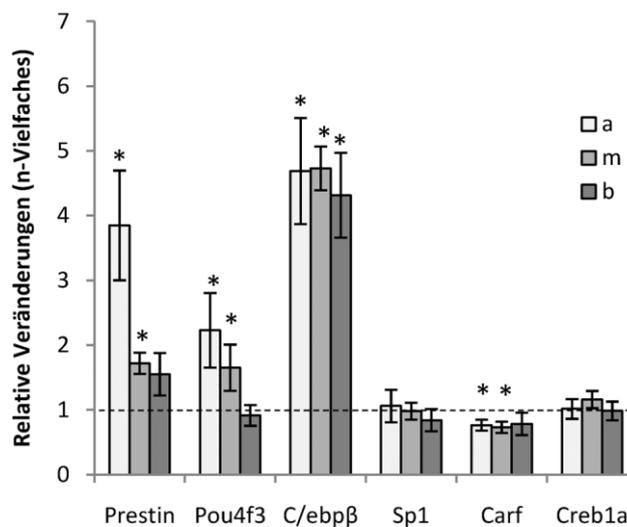


Abb. 18: Expression von Prestin und der untersuchten TF unter Zugabe von 0,5 μM T4 in der organotypischen 48h-Kultur postnataler Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stdf. als relative Veränderungen, bezogen auf die Kontrollgruppe, getrennt nach apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segmenten. In die Berechnung wurden die Veränderungen in beiden Bezugssystemen einbezogen mind. $n = 7$ jeweils; * $p < 0.05$ (Wilcoxon Paar Test).

3.2.3.2 48h-Kultur unter Zusatz von Natriumbutyrat

Da keine systematischen Voruntersuchungen über den Einfluss von Natriumbutyrat auf die Expression von Prestin und die von uns ausgewählten Transkriptionsfaktoren vorliegen, wurde die Dosisabhängigkeit mit einbezogen. In Abb. 19 ist das Verhalten der Gesamt-RNA und Tbp-Expression in der mit Natriumbutyrat versetzten 48h-Kultur dargestellt. Unter steigender Dosierung kommt es ab einer Dosis von 100 μM Natriumbutyrat zu einem Abfall der Gesamt-RNA, bezogen auf Dosierungen von 10 μM (LSD: $p < 0,003$) und dazugehörigen Kontrollgruppen (LSD: $p < 0,02$). Der Abfall ist am ehesten als Wachstumshemmung zu deuten. Das Verhalten von Tbp ist unter der Zugabe von Natriumbutyrat konstant. Einzig die 2000 μM Natriumbutyrat-Gruppe hat einen 20%igen Abfall gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe.

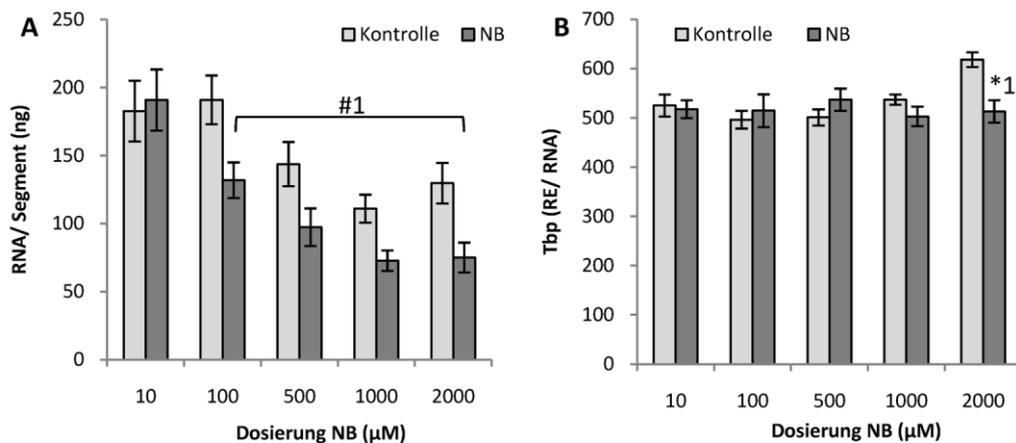


Abb. 19: Verhalten von (A) Gesamt-RNA und (B) Tbp bei Zugabe von steigenden Dosierungen Natriumbutyrats. NB - mit Natriumbutyrat behandelte Kulturen, Kontrolle – dazugehörige Kontrollgruppen. Apikale, mediale und basale Segmente in der Darstellung zusammengefasst. (A) ^{#1} p mind. $< 0,02$ (LSD) je Konzentration: Kontrolle vs. NB. (B) ^{*1} p $< 0,01$ (LSD) 2000 μM NB vs. Kontrolle. ($n = 18$ jeweils).

3.2.3.2.1 Verhalten der untersuchten Transkriptionsfaktoren

In Abb. 20 ist die Wirkung von Natriumbutyrat auf die relativen Veränderungen der Expression von Prestin und Pou4f3 dargestellt. Bei beiden Genen kommt es unter Natriumbutyrat zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Expression in allen Segmenten. Prestin nimmt im apikalen, medialen und basalen Segment bei Dosen von 500 - 2000 μM Natriumbutyrat um den Faktor 1,5 zu

($p < 0,05$). Bei Pou4f3 kommt es zu einer dosisabhängigen Verdopplung der Genexpression in allen Segmenten. Im apikalen und basalen Segment wird das Maximum der Zunahme bei 500 μM erreicht. Höhere Dosierungen führen zu keiner weiteren Zunahme der Expression. Die Transkriptionsfaktoren C/ebp β , Sp1, Carf und Creb1a zeigen keine signifikanten Veränderungen der Expression in der Kultur unter Zugabe von Natriumbutyrat (Daten nicht dargestellt).

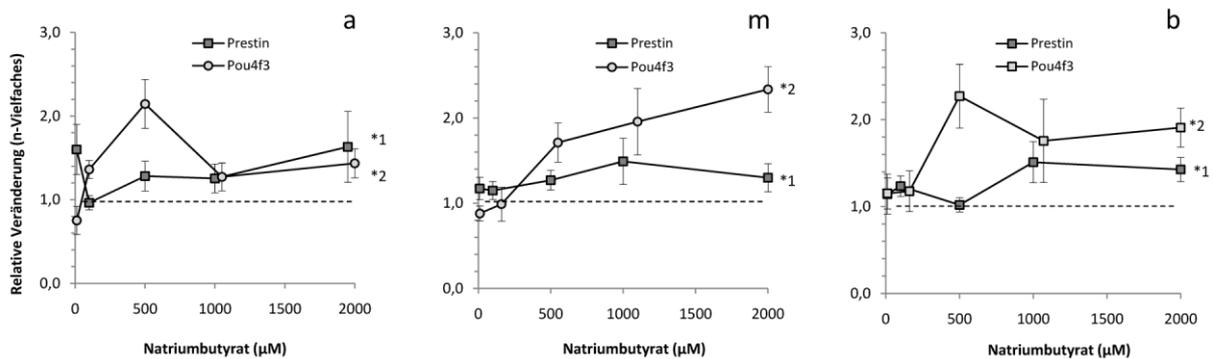


Abb. 20: Einfluss von Natriumbutyrat auf die relativen Veränderungen der Expression von Prestin und Pou4f3 im apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segment. Die Werte von 500 - 2000 μM wurden für die Signifikanzberechnung zusammengefasst. ($n = 10 - 12$ je Segment). Prestin: apikal $*^1p < 0,05$, medial $*^1p < 0,01$, basal $*^1p < 0,02$, Pou4f3: apikal $*^2p < 0,0001$, medial $*^2p < 0,0001$, basal $*^2p < 0,0001$. (Wilcoxon-Test).

3.2.3.3 48h-Kultur unter Zusatz von Kaliumchlorid

Abb. 21 zeigt die Veränderung von RNA-Gesamtkonzentration und Tbp-Expression in der 48h-Kultur unter Zusatz von 50 mM Kaliumchlorid (KCl). Zur Berechnung der Signifikanz wurden die Segmente der jeweiligen Gruppen zusammengefasst. Wie in der normalen Kultur (3.2.2) kommt es zu einer Abnahme der Gesamt-RNA pro Segment, hier von durchschnittlich 110 ng pro Segment auf 80 ng pro Segment. Dies entspricht einem Abfall um 40 % (Scheffé: $p = 0,001$). Tbp hingegen zeigt in keinem Segment einen signifikanten Anstieg oder Abfall. Ein Gradient ist weder bei der Gesamt-RNA noch bei Tbp zu finden.

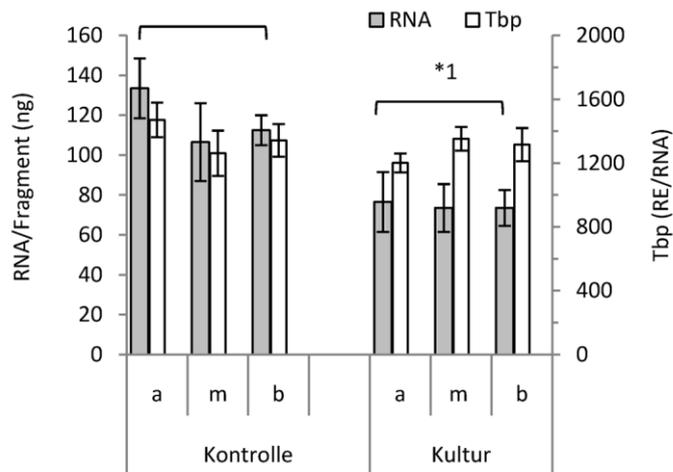


Abb. 21: Entwicklung der Gesamt-RNA pro Fragment und der Tbp-Expression in einer 48h-Kultur unter Zugabe von 50 mM KCl. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Stdf. der jeweiligen Segmente ($n = 6$ jeweils). Für die Signifikanzberechnung wurden die Segmente zusammengefasst. $*^1p < 0,001$ (Scheffé): RNA der Kultur vs. RNA der Kontrollen. ($n = 3-4$ Kultur).

3.2.3.3.1 Prestin und ausgewählte TF

Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass die Zugabe von Kaliumchlorid in die 48h-Kultur zu einer Abnahme der Prestin-Expression führt (Stute, 2011). Abb. 22 gibt eine Zusammenfassung der Veränderungen in der mit 50 mM KCl versetzten organotypischen Kultur. Hierbei kommt es zu einer 50%igen Reduktion der Prestin-Expression im apikalen ($p = 0,02$) und einer 30%igen Reduktion im medialen Segment. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es in einer organotypischen Kultur normal zu einem 80 % Anstieg der Prestin-Expression kommt (s. o.). Ähnlich wie bei Prestin fällt die Carf-Expression in allen Segmenten und in beiden Bezugssystemen um etwa 50 % ab. Pou4f3 und Sp1 zeigen keine sicheren Veränderungen in der Expression. C/ebp β hingegen erfährt einen etwa 4,6fachen Anstieg in der KCl-Kultur ($p < 0,0001$). Dieser Anstieg betrug in der Kultur mit normalem KCl Gehalt 40 % (Abb. 16). Creb1a zeigt einen Anstieg der Expression um etwa 40 % ($p < 0,01$). Ein apikal-basaler Gradient ist nicht vorhanden.

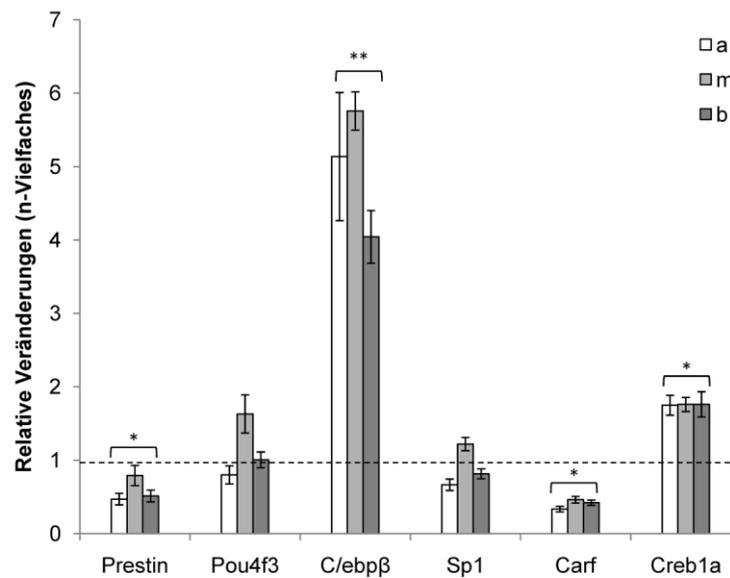


Abb. 22: Veränderung der Expression von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren in der organotypischen Kultur unter Zusatz von 50 mM KCl. Dargestellt sind die relativen Expressionsveränderungen der untersuchten Gene als Mittelwert \pm Stdf. Die relativen Veränderungen in Bezug auf die Gesamt-RNA und Tbp wurden in der Darstellung zusammengefasst. *p mindestens $< 0,05$, $n = 6$ (Wilcoxon-Test).

3.2.3.4 48h-Kultur unter Zusatz von Retinsäure

Abb. 23 zeigt die Veränderung der Gesamt-RNA (ng) pro Fragment und der Tbp-Expression unter steigenden Dosierungen von Retinsäure. Die Gesamt-RNA pro Fragment als auch die Tbp Expression zeigen, bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, keine signifikanten Veränderungen.

3.2.3.4.1 Veränderung der untersuchten Gene

In Abb. 24 sind für die apikalen, medialen und basalen Segmente die relativen Expressionsänderungen für Prestin, Pou4f3 und C/ebpβ bei steigender RS-Konzentration dargestellt. Im apikalen Segment zeigt sich bei RS-Konzentrationen von 50 und 100 μ M die deutlichste Reduktion der Prestin-Expression um den Faktor 2 ($p < 0,01$). Im medialen und basalen Segment ist dieser Abfall geringer ausgeprägt und nur bei 100 μ M zu sehen ($p < 0,01$). Bei Pou4f3 findet sich ein leichter Abfall der Expression um 25 % bei 100 μ M Retinsäure im apikalen und basalen Segment ($p < 0,05$). Für C/ebpβ zeigt sich eine dosisabhängige Zunahme der Expression mit Erreichen einer maximalen Zunahme um den Faktor 2,3 bei 50 μ M apikal und medial bzw. bei 100

μM basal. Für Sp1, Carf und Creb1a weisen keine signifikanten Veränderungen unter dem Einfluss von Retinsäure auf (siehe Abb. 25).

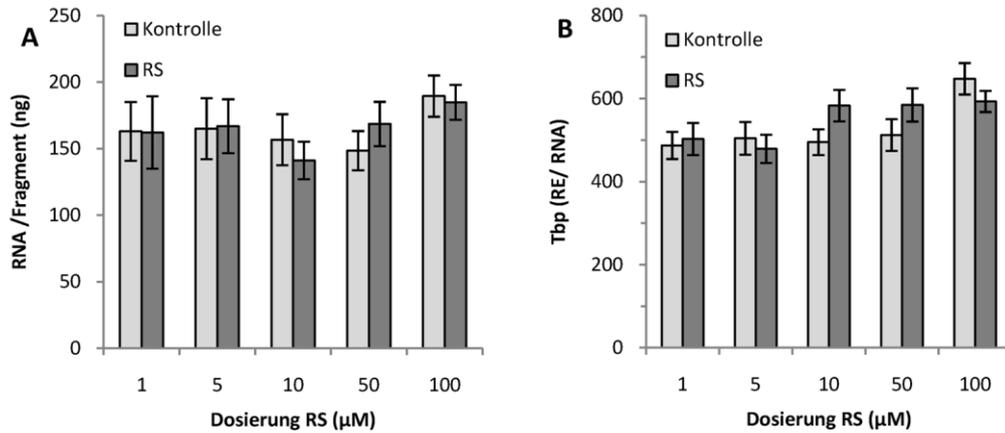


Abb. 23: Veränderung der Gesamt-RNA (A) und von Tbp (B) in Abhängigkeit steigender Dosierungen von Retinsäure (RS) in der organotypischen Kultur. Dargestellt sind die behandelten Gruppen (RS) mit den dazugehörigen Kontrollen (Kontrolle). Es kommt zu keinen signifikanten Veränderungen.

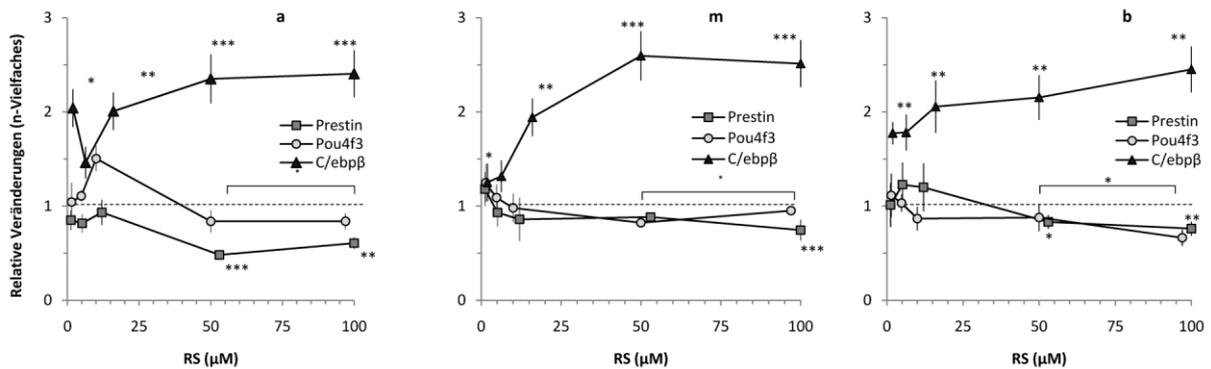


Abb. 24: Verhalten der Expression von Prestin, Pou4f3 und C/ebpβ in der 48h-Kultur unter steigender Dosierung von RS. Dargestellt ist Mittelwert \pm Stdf. der relativen Expressionsveränderung der apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segmente. Bei Pou4f3 wurden 50 μM und 100 μM für die Signifikanzberechnung zusammengefasst * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, (n = 16 - 18 jeweils).

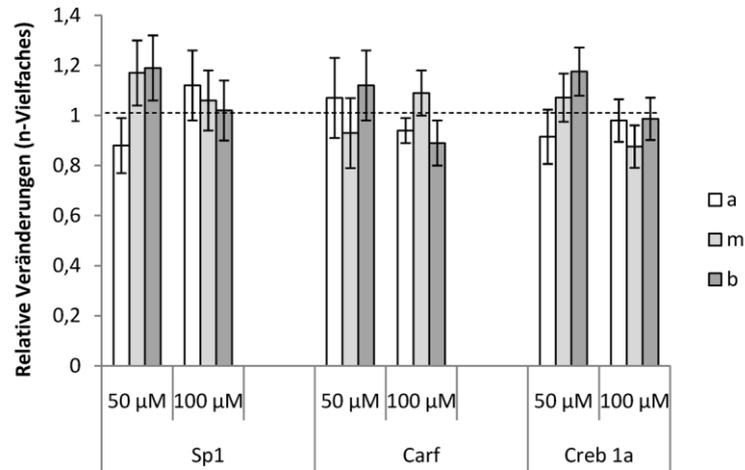


Abb. 25: Verhalten der Transkriptionsfaktoren Sp1, Carf und Creb1a in der organotypischen Kultur unter 50 und 100 µM Retinsäure (RS). Dargestellt sind Mittelwert \pm Stdf. der relativen Expressionsveränderungen. Die Veränderungen bezogen auf Gesamt-RNA und Tbp wurden zusammengefasst. Keine signifikanten Veränderungen ($n = 12 - 14$).

3.3 Korrelation

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Muster der Veränderungen in der Genexpression miteinander verglichen. Um die Beziehung der Expression von Prestin zu den ausgewählten Transkriptionsfaktoren weiter zu untersuchen, wurde die Korrelation zwischen Prestin und den Transkriptionsfaktoren berechnet. Tabelle 8 zeigt die signifikanten Korrelationen zwischen der Expression von TF und Prestin in der postnatalen Entwicklung und unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Es zeigte sich, dass es eine enge Korrelation zwischen Prestin und Pou4f3 gibt, welche in der postnatalen Entwicklung zwischen PT5 und PT8 sowie *in vitro* unter allen experimentellen Bedingungen, außer unter Zusatz von Retinsäure, nachweisbar ist. Zwischen Prestin und C/ebp β besteht in den Gruppen PT5 und PT8 sowie unter Zusatz von T4 eine enge Korrelation. In der Kultur unter Zusatz von Retinsäure ist eine negative Korrelation zwischen Prestin und C/ebp β nachzuweisen ($p \leq 0,01$). Unter Zugabe von 50 mM KCl kommt es zu einer engen ($r = 0,73$) Korrelation zwischen Carf und Prestin ($p < 0,001$).

Tabelle 8: Korrelation von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren

<i>Transkriptionsfaktor</i>	<i>Bedingung</i>	<i>r, p, n</i>
Pou4f3-Prestin	PT5-PT8	0.84; 0.0000 (36)
	Kultur, T4	0.76; 0.0016 (24)
	Kultur, BA	0.73; 0.01 (15)*
	Kultur, KCl	0.63; 0.001 (24)
C/ebpβ-Prestin	PT5-PT8	0.74; 0.0000 (36)
	Kultur, T4	0.61; 0.003 (24)
	Kultur, RA	-0.76; 0.01 (15)*
Carf-Prestin	Kultur, T4	0.55; 0.008 (24)
	Kultur, KCl	0.65; 0.0006 (24)

PT-postnataler Tag; Kulturen mit Exposition von Thyroxin (T4), Natriumbutyrat (NB) und Retinsäure (RS). *r* – Pearsonscher Korrelationskoeffizient, *p* – Statistische Signifikanz, *n* - Anzahl. Signifikante Korrelationen wurden auch innerhalb der Segmente beobachtet (alle PT5 - PT8 Gruppen, *n* = 12; fast alle Kulturgruppen, *n* = 8. *Korrelation der Mittelwerte verschiedener Konzentrationen.

3.4 Vergleich der Genexpression

Um die Expression der verschiedenen Gene in beiden Referenzsystemen vergleichen zu können, wurde ein Diagramm konstruiert, wobei auf der Abszisse die Expressionswerte bezogen auf die Gesamt-RNA und auf der Ordinate die Expressionswerte bezogen auf das Referenzgen *Tbp* dargestellt sind. Am höchsten exprimiert sind *Gata3* (10000 - 50000 RE/RNA), *Sp1* (1000 - 10000 RE/RNA), *Prestin*, *Pou4f3* und *Creb* sind mittelstark exprimiert (100 - 1000 RE/RNA), wohingegen *Carf* und *C/ebpβ* am geringsten exprimiert sind (10 - 200 RE/RNA). Insgesamt zeigt sich, dass beide Referenzsysteme für *Prestin* und alle TF signifikant miteinander korrelieren, bis auf *Creb1a*, wo die gemessenen Veränderungen in der Entwicklung und durch veränderte Bedingungen kleiner waren als der methodische Fehler.

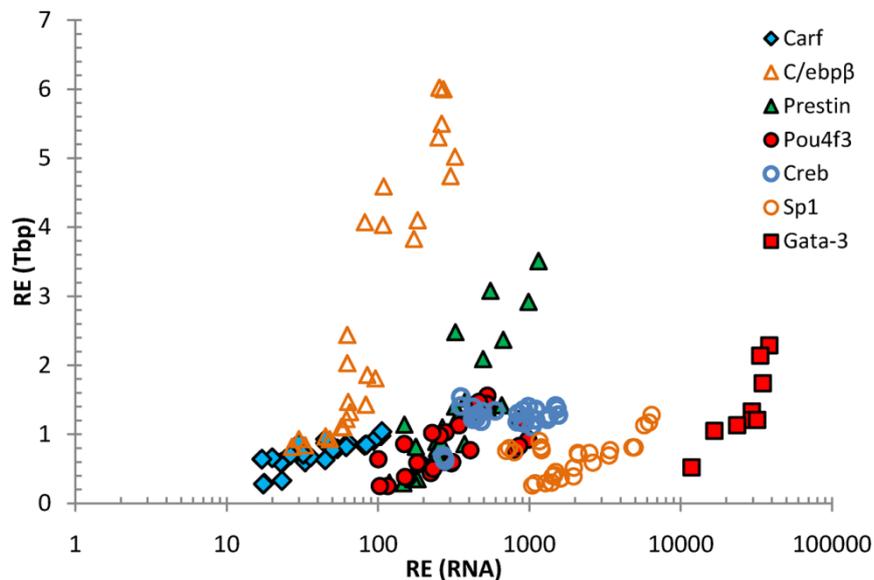


Abb. 26: Genexpressionsdiagramm. Das Diagramm zeigt die Expression der in dieser Studie untersuchten Gene. Es sind die Mittelwerte der folgenden Gruppen dargestellt (jeweils apikal, medial, basal): PT2, PT5, PT8; Kultur, T4, NB, KCl, RS (jeweils Kontrolle und experimentelle Gruppe). Korrelationskoeffizient (R): Prestin (0,83), Pou4f3 (0,65), C/ebp β (0,91), Sp1 (0,69), Carf (0,79). Alle Korrelationen sind signifikant mit ($p < 0,01$ $n = 27$). Creb (0,36) n. s. ($n = 27$ jeweils, außer Gata3: $n = 9$).

3.5 Untersuchungen zur regionalen Verteilung der Transkriptionsfaktoren

Die Segmente, so wie sie in 3.1 charakterisiert wurden, bestehen im Wesentlichen aus Cortischem Organ und Limbus. Um einen Einblick in die regionale Verteilung der Transkriptionsfaktoren zu erhalten, wurde die Präparationstechnik dahingehend modifiziert, dass das Cortische Organ und der Limbus getrennt präpariert und untersucht wurden. Der Teil des Limbus besteht hauptsächlich aus Bindegewebe (Kimura et al., 1990) und radiären Nervenfaserbündeln mit möglichen restlichen Ganglienzellen (Abb. 1).

3.5.1 Die Verteilung von RNA und Tbp im Cortischen Organ und Limbus

Zuerst galt es zu untersuchen, wie sich der RNA-Gehalt und die Tbp-Expression im Cortischen Organ und im Limbus verhalten. In Abb. 27 ist der Gehalt von RNA in ng/Segment und die Ex-

pression von Tbp am postnatalen Tag 2, 5 und 8 jeweils im apikalen, medialen und basalen Segment im Cortischen Organ und Limbus dargestellt.

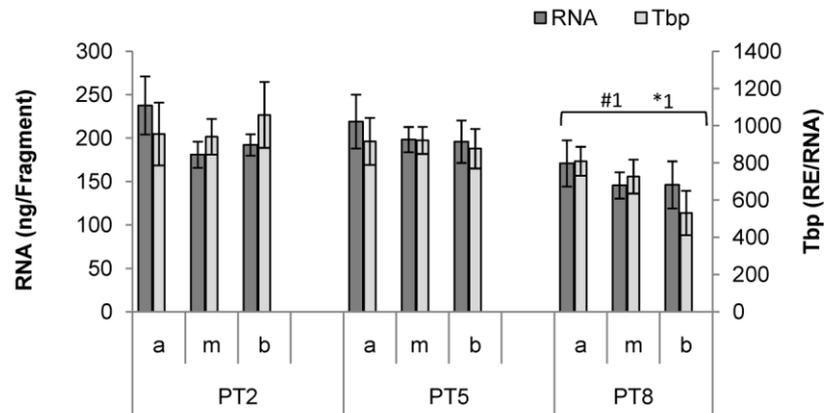
Im Cortischen Organ gibt es keine Unterschiede im Entwicklungsmuster von RNA und Tbp. Zwischen PT2 und PT5 kommt es zu keiner signifikanten Veränderung von Gesamt-RNA und Tbp-Expression. In allen Segmenten findet sich eine durchschnittliche RNA-Masse von 200 ng/Segment. Am postnatalen Tag 8 kommt es zu einer 25%igen Reduktion der RNA pro Segment ($p < 0,01$) sowie der Tbp-Expression ($p = 0,02$). Im Limbus hingegen zeigt sich bei annähernd konstanter RNA-Menge pro Segment ein 70%iger Abfall der Tbp-Expression zwischen dem postnatalen Tag 2 und 8.

3.5.1 Verteilung der Transkriptionsfaktoren im Cortischen Organ und Limbus

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Gata3 eng mit der Prestin-Expression korreliert. Gata3 wurde sowohl in Haarzellen als auch in dem benachbarten Gewebe nachgewiesen. Um die Verteilung weiter zu spezifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Gehalt von Gata3 im Cortischen Organ und Limbus untersucht. Abb. 28 stellt die unterschiedliche Verteilung der Gata3-Expression zwischen Cortischem Organ und Limbus dar. Es zeigt sich, dass Gata3 um den Faktor 4 - 6 höher im Cortischen Organ exprimiert wird, als im Limbus. Gata3 fällt zum PT8 hin um 28 % ab ($p < 0,02$ - LSD). Auch im Limbus kommt es ab PT5 zu einem Abfall der Gata3-Expression.

Ebenfalls in Abb. 28 dargestellt ist die Expression von Pou4f3 im Cortischen Organ und Limbus. Den Erwartungen aus der Literatur entsprechend, ist Pou4f3 ausschließlich im Cortischen Organ exprimiert. Hier zeigt sich ein Abfall der Expression von PT2 zu PT8.

A) Corti



B) Limbus

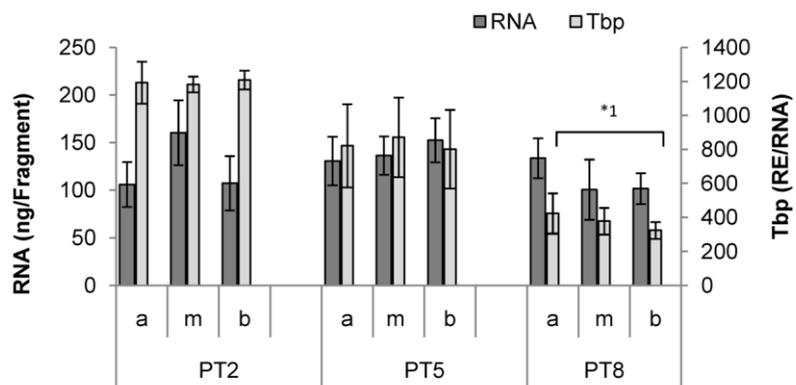


Abb. 27: Veränderung der Gesamt-RNA pro Segment und der Tbp-Expression während der postnatalen Entwicklung im apikalen, medialen und basalen Segment des Innenohrs postnataler Ratten, getrennt nach (A) Cortischem Organ und (B) Limbus. Abkürzung siehe Abb. 10. Für die Signifikanzberechnung wurden die Segmente eines postnatalen Tages zusammengefasst. A) *¹p < 0,01 (LSD) vs. RNA PT5, #¹p = 0,02 (LSD) vs. Tbp PT5. B) *¹p < 0,001 (Scheffé) PT8 vs. PT2 Tbp, (n = 6 je Segment).

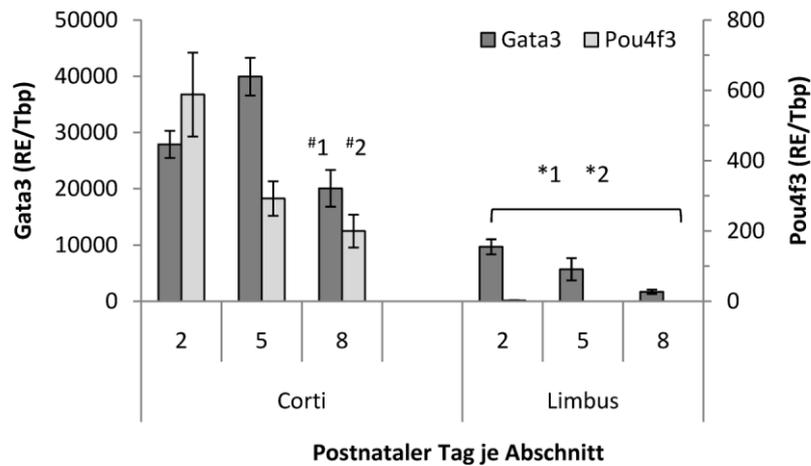


Abb. 28: Verteilung von Gata3 und Pou4f3 zwischen Cortischem Organ und Limbus am PT2, PT5 und PT8. Dargestellt sind Mittelwert \pm Stdf., Expression bezogen auf Gesamt-RNA. $p^{\#1} < 0,02$ (LSD): Gata3 PT2 vs. PT8, $p^{\#2} < 0,03$ (LSD): Pou4f3 PT2 vs. PT8, $*^1p < 0,008$ (Scheffé): Gata3 - Limbus vs. Corti an jedem PT, $*^2p < 0,00001$ (Scheffé): Pou4f3 - Limbus vs. Corti (an jedem PT). (Corti: mindestens $n = 18$, Limbus: $n = 12$).

Die C/ebp β -Expression ist im Cortischen Organ deutlich höher exprimiert als im Limbus (Abb. 29). Die Expression von Sp1, Carf und Creb1a hingegen unterscheidet sich in ihrer Ausprägung nicht zwischen dem Cortischen Organ und dem Limbus. Im Unterschied zu dem Gesamtpräparat (Abb. 12 und Abb. 13) wird ein Abfall von Sp1, Carf und Creb vom PT2 zu PT8 beobachtet.

Tabelle 9 fasst die Verteilung im Innenohr der untersuchten Transkriptionsfaktoren zusammen. Während Pou4f3, Gata3 und C/ebp β ausschließlich bzw. vorwiegend in den Haarzellen im Cortischen Organ exprimiert werden, kommen Sp1, Carf und Creb1a in beiden Teilregionen etwa gleichverteilt vor. Durch die Bestätigung der ausschließlichen bzw. überwiegenden Expression der Transkriptionsfaktoren Pou4f3, Gata3 und C/ebp β in der Haarzellregion des auditiven Innenohres wird die postulierte Bedeutung bezüglich ihres Einflusses auf die Regulation von Prestin unterstützt.

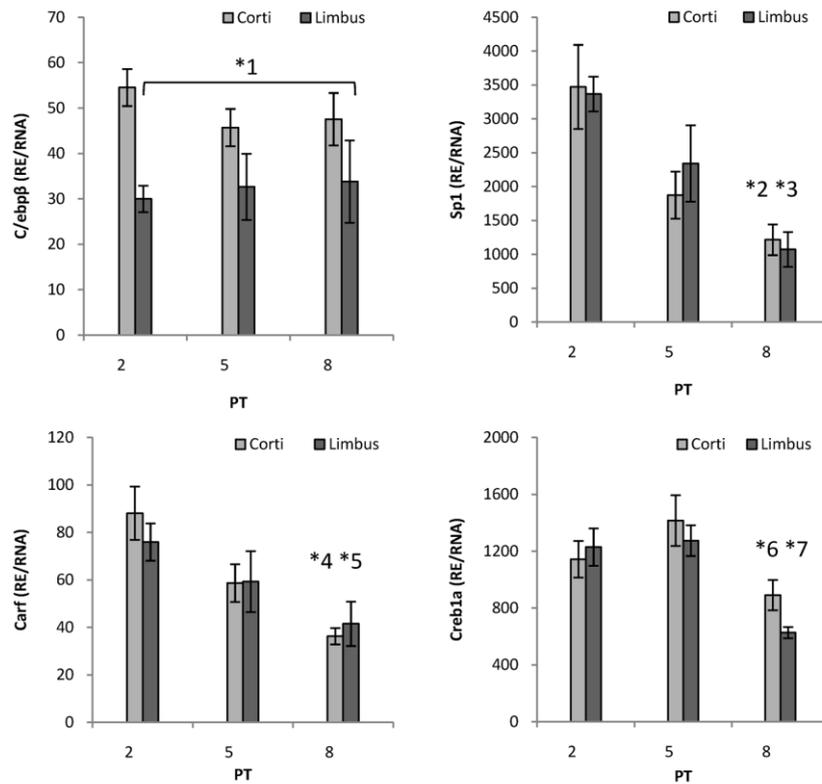


Abb. 29: Expression der Transkriptionsfaktoren Sp1, C/ebpβ, Carf und Creb1a im Cortischen Organ und Limbus des Innenohrs in der postnatalen Entwicklung. PT-postnataler Tag (A) C/ebpβ: $*^1p < 0,001$ - Corti vs. Limbus (an jedem PT), (B) SP1: $*^2p < 0,0001$ - Corti PT2 vs. PT8, $*^3p < 0,004$ - Limbus PT2 vs. PT8, (C) Carf: $*^4p < 0,0001$ - Corti PT2 vs. PT8, $*^5p < 0,04$ - Limbus PT2 vs. PT8, (D) Creb1a: $*^6p < 0,001$ - Corti PT5 vs. PT8, $*^7p < 0,01$ - Limbus PT2 vs. PT8 (Corti: n = 24; Limbus: n = 12).

Tabelle 9: Zusammenfassung der Verteilung der Transkriptionsfaktorexpression zwischen Cortischem Organ und Limbus

Transkriptionsfaktoren	Verteilung
Pou4f3	Ausschließlich in Haarzellregion
Gata3, C/ebpβ	Überwiegend in Haarzellregion
Sp1, Carf, Creb1a	Gleich verteilt

Verteilung der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren zwischen Cortischem Organ und dem anliegenden Limbusgewebe.

4 Diskussion

4.1 Referenzsysteme

Die Methode der RT-PCR umfasst von der Gewebepreparation bis zum Ergebnis eine große Anzahl von Arbeitsschritten. Dementsprechend groß ist die Gefahr der einfließenden Fehler. In dieser Arbeit wurden deshalb als Referenz für die RT-PCR zwei unterschiedliche Referenzsysteme herangezogen. Zum einen wurden die Messergebnisse auf die Gesamt-RNA der präparierten Probe bezogen, zum anderen auf die mRNA eines geeigneten Referenzgens normiert.

Die Gesamt-RNA

Sie ist ein guter Marker für das Gesamtmaterial von Gewebe. Bei unserer Präparationstechnik ist die Gesamt-RNA im apikalen Segment größer als im medialen und basalen Segment. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Haarzellzählung innerhalb der Segmente (Abb. 9). Es finden sich apikal etwa 30 % mehr Haarzellen als basal.

Während der postnatalen Entwicklung findet man einem Anstieg der RNA-Masse pro Segment von 20 %. Dies ist Ausdruck des Wachstums des Cortischen Organs in der postnatalen Entwicklung. Im Gegensatz dazu sieht man in der organotypischen Kultur einem Abfall der RNA-Masse. Auch wenn bei der Präparation mit größter Vorsicht gearbeitet wurde, handelt es sich hierbei um eine potentiell gewebschädigende Prozedur, die zum Absterben des geschädigten Gewebes führen kann. Außerdem kommt es wahrscheinlich im umliegenden Gewebe zu einer Proliferationshemmung und Degeneration der Zellen und damit zu einem Abfall der RNA (Parker et al., 1986; Slattery et al., 2009; Utesch et al., 1993). Interessanterweise ist dieser Abfall in der T4-Kultur nicht zu beobachten. Dies lässt sich auf die wachstumsstimulierende Wirkung von Thyroxin zurückführen (Augustine und Hymer, 1978).

Die Normierung der PCR-Ergebnisse auf die Gesamt-RNA bringt auch Probleme mit sich. So besteht die Gesamt-RNA zum überwiegenden Anteil aus ribosomaler RNA (rRNA), so dass ein konstantes Verhältnis zwischen rRNA:mRNA Voraussetzung ist. Dies wäre eine Erklärung für die etwas größere Streuung, die in den Ergebnissen, bezogen auf RNA, bestehen. Aus diesen Gründen wurde ein 2. Referenzsystem genutzt, welches die Ergebnisse der einzelnen untersuchten mRNA mit einem Referenzgen vergleicht.

Das Referenzgen

Die Normierung der PCR-Messergebnisse gegen ein Referenzgen hat den Vorteil, dass zwei Gene auf mRNA-Niveau miteinander verglichen werden. Dies hat zur Konsequenz, dass sowohl Referenzgen als auch Zielgen den gleichen Arbeitsschritten unterliegen.

Ein Referenzgen sollte im untersuchten Gewebe unter allen experimentellen Bedingungen stabil exprimiert werden (Hendriks-Balk et al., 2007). Desweiteren darf es keiner regulatorischen Veränderung unterliegen. Insofern spiegelt die Expression des Referenzgens (auch Haushaltsgen genannt) die generelle transkriptionelle Aktivität eines Gewebes wider (Huggett et al., 2005). In vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe stellte sich Tbp als geeignetes Referenzgen heraus und wurde dementsprechend auch für diese Untersuchung ausgewählt. Tbp zeigte im Gegensatz zur Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) ein stabileres Verhalten in der postnatalen Entwicklung und in der organotypischen Kultur (Stute, 2011).

Im Rahmen dieser Untersuchung kam es im Gesamtfragment zu einem 40%igen Abfall der Tbp-Expression während der postnatalen Entwicklung. Bei der Differenzierung zwischen Cortischem Organ und Limbusanteil zeigte sich im Limbus bei annähernd konstanter RNA-Menge pro Segment ein 70%iger Abfall der Tbp-Expression zwischen dem zweiten und achten postnatalen Tag. Dieser Abfall ist deutlich höher als der 30%ige Abfall der Tbp-Expression im Cortischen Organ.

Eine Erklärung für den Abfall der Tbp-Expression könnte die Abnahme der postnatalen transkriptionellen Aktivität sein. Auch könnte der Abfall der Tbp-Expression mit den unterschiedlichen Präparationsbedingungen am PT2 und PT8 sowie der unterschiedlichen Beschaffenheit des bearbeiteten Gewebes zusammenhängen. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer immer stärker werdenden Verknöcherung des Limbus spiralis und damit anscheinend zu einer abnehmenden transkriptionellen Aktivität der Genexpression im Gewebe. So zeigt sich, dass der Abfall der Tbp-Expression im Cortischen Organ etwas geringer ausfällt als im Gesamtfragment der Präparation. Trotz dieses Abfalls in der Expression von Tbp zeigten sich gleiche Entwicklungsmuster in beiden Referenzsystemen, so dass beide Systeme für die Normierung der mRNA-Expression geeignet sind.

Haarzellen

Die Bestimmung der Haarzellanzahl unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen ist eine weitere Qualitätskontrolle, da Prestin ausschließlich in den ÄHZ vorkommt. Die Anzahl der

ÄHZ sollte durch die experimentellen Bedingungen nicht verändert werden. Tabelle 7 zeigt, dass keine numerischen Veränderungen der äußeren Haarzellen vorliegen. Eine geringe partielle Schädigung kann nicht vollständig verhindert werden. Darüber hinaus kann die Zahl der Haarzellen pro Segment als Referenzsystem für die Prestin-Expression dienen. Aus Tabelle 7 und Abb. 9 geht hervor, dass bei der manualen Präparation das apikale Segment etwa 20 % mehr ÄHZ enthält. Dies sollte allerdings keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben, da sowohl beim Bezug der Ergebnisse auf die Gesamt-RNA wie auch auf das Referenzgen Tbp Größenunterschiede dieser Art ausgeglichen werden.

4.2 Zur Verteilung von RNA und mRNA auf das Cortische Organ und den Limbus

Die organotypische Kultur des Cortischen Organs nach der Präparation von Sobkowicz et al. (1997) enthält nicht nur Gewebe des unmittelbaren Cortischen Organs, sondern auch Anteile des Limbus. Für die Beurteilung der Koexpression von Transkriptionsfaktoren in Relation zu Prestin ist es wichtig, die Verteilung der Transkriptionsfaktoren auf das unmittelbare Cortische Organ bzw. den Limbus zu kennen. Transkriptionsfaktoren, die stärker im Limbus exprimiert werden als im Cortischen Organ, könnten zu einer Fehlinterpretation führen. Die Zusammensetzung des Sobkowicz-Präparates ist wichtig für das Anheften des Segmentes auf der Zellkulturplatte und das Wachstum der Kultur. Fehlt der Limbusanteil, wächst das Präparat nicht am Boden der Kulturplatte an und es gibt sogenannte „Schwimmer“. Daher wurde die unterschiedliche Expression der Transkriptionsfaktoren nur in den Frischpräparaten vom PT2, PT5 und PT8 untersucht.

Unterschiede in der Verteilung wurden für die Gene Gata3, Pou4f3 und C/ebp β gefunden. Diese Transkriptionsfaktoren werden im Cortischen Organ stärker exprimiert als im Limbus. Die höhere Expression deutet auf eine spezifische Funktion im Cortischen Organ hin. Erwartungsgemäß waren Prestin und Pou4f3 im Limbus nicht nachweisbar.

Interessant ist der starke Abfall der Tbp-Expression von PT2 zu PT8 im Limbus. Der Abfall im unmittelbaren Cortischen Organ beträgt 20 % (Abb. 27). Das bedeutet, dass bei der Präparation des Cortischen Organs nach Sobkowicz (1997) der Anteil von Limbus im Gesamtpräparat mitbestimmt, wie sich der Tbp-mRNA-Gehalt zum PT8 hin ändert. Wie oben dargestellt, wurde in der vorliegenden Studie ein Abfall des Tbp-mRNA-Gehaltes um 40 % gefunden, während in der vorangegangenen Untersuchung kein Abfall festgestellt wurde (Gross et al., 2010). Möglicherweise sind präparative Unterschiede Ursache für diese Diskrepanz. Wie die Ergebnisse zeigen,

ist der Abfall des Tbp-mRNA-Gehaltes in der Limbusregion nicht relevant für die Aussagen bzgl. die Veränderungen der Expression während der postnatalen Entwicklung und des apikal-basalen Gradienten.

Betrachtet man die postnatalen Veränderungen im Cortischen Organ und Limbus für Carf, Sp1 und Creb, so findet man in beiden Regionen einen deutlichen Abfall im Unterschied zum Sobkowicz-Präparat. Die Ursache dieses Abfalls ist unklar. Es ist denkbar, dass der mRNA-Gehalt dieser Gene innerhalb des Limbus unterschiedlich zellulär verteilt ist. Der Limbus ist ein zellulär heterogen zusammengesetztes Gewebe, bestehend aus verschiedenen Fibrozyten, Interdentaltzellen, inneren Sulcuszellen und Kapillaren (Kimura et al., 1990). Welche Zellen im Ergebnis der Präparation besonders schnell absterben, ist nicht bekannt. Es könnte sich auch um präparative Artefakte handeln. Im Allgemeinen gelingt die Trennung von Cortischem Organ und *Stria vascularis* sehr gut, die präzise Trennung von Cortischem Organ und Limbus wird mit zunehmendem Alter der Tiere schwieriger.

4.3 Der apikal-basale Gradient

In vorherigen Untersuchungen konnte in der postnatalen Entwicklung die Ausbildung eines apikal-basaler Gradienten von Prestin sowohl bei Ratten (Gross et al., 2005) als auch bei Meereschnecken nachgewiesen werden (Mazurek et al., 2007). Dieser Gradient ist sowohl auf mRNA-Ebene (Gross et al., 2005) als auch auf Proteinebene zu finden, wie mittels in-situ-Hybridisierung und Immunhistologie gezeigt werden konnte (Gross et al., 2010; Judice et al., 2002). Weiterhin zeigt eine Überschlagsrechnung (Tabelle 10) aus den vorliegenden Daten nach Gleichung (1), dass der relative Prestingehalt pro Haarzelle im apikalen Bereich deutlich höher ist als im basalen Segment.

$$\frac{\text{Konzentration}_{\text{Prestin}} \left[\frac{\text{RE}_{\text{Prestin}}}{\text{ng}} \right] \times \text{Masse}_{(\text{RNA})} \left[\frac{\text{ng}}{\text{Segment}} \right]}{\text{Haarzellen} \left[\frac{\text{Haarzellen}}{\text{Segment}} \right]} = \frac{\text{RE}_{\text{Prestin}}}{\text{Haarzelle}} \quad (1)$$

Tabelle 10: Übersichtsrechnung zur Bestimmung des Prestin mRNA Gehaltes pro Haarzelle

<i>Segment</i>	<i>Prestin/RNA</i>	<i>RNA/Segment</i>	<i>Haarzellen/Segment</i>	<i>Prestin/Haarzelle</i>
Apikal	500 RE/ng	300 ng/Segment	1100	<u>136 RE</u>
Basal	300 RE/ng	250 ng/Segment	850	<u>88 RE</u>

Mittelwerte der Berechnung für das apikale und basale Segment, entnommen aus Abb. 9, Abb. 10 und Abb. 11.

Auch für andere Proteine wie KCNQ4 ist ein apikal-basaler Gradient in den ÄHZ beschrieben worden (Beisel et al., 2000). Dies wirft die Frage auf, ob der Gradient das Ergebnis eines regulatorischen Mechanismus der Prestin-Expression oder einfach Ausdruck unterschiedlicher Morphologie der Haarzellen in den verschiedenen Regionen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die apikalen ÄHZ länger sind als die basalen und ein großes Zellvolumen haben (Sato et al., 1999). Diese Tatsache könnte den apikal-basalen Gradienten von Prestin und Pou4f3 erklären, da beide Proteine im Cortischen Organ ausschließlich in den ÄHZ vorkommen.

Allerdings lässt sich damit nicht der bereits beschriebene Gradient von Gata3 und von C/ebp β begründen, der ebenfalls über der tonotopischen Achse zu finden ist. Die mRNA beider Gene ist zwar konzentriert in der Region der ÄHZ zu finden, allerdings nicht ausschließlich in den ÄHZ. Weiterhin konnte für Gata3 mittels Immunfärbung gezeigt werden, dass die Expression im basalen Segment geringer als im apikalen Segment erscheint (Gross et al., 2010). Abb. 30 zeigt, dass es während der postnatalen Entwicklung zu keiner wesentlichen Volumen- und Oberflächenzunahme der Haarzellen in den apikalen und basalen Segmenten kommt, die die beschriebene Gradientenausbildung erklären könnte. So findet sich zwar eine Zunahme der Zelloberfläche während der postnatalen Entwicklung, doch ist diese apikal und basal mit einer Vergrößerung um den Faktor 1,3 identisch.

Durch Oliver und Fakler (1999) wurde der spannungsabhängige Ladungstransfer, ausgedrückt als nichtlineare Kapazität $C_{\text{nicht-linear}}$, über der Membran der ÄHZ in der postnatalen Entwicklung gemessen. Dieser stellt das elektrophysiologische Äquivalent des Motorproteins Prestin in der lateralen Zellmembran dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass es einen apikal-basalen Gradienten in der Entwicklung der nichtlinearen Kapazität gibt. Am PT0 war die $C_{\text{nicht-linear}}$ nur apikal, aber nicht basal detektierbar. Während der weiteren Entwicklung stieg die $C_{\text{nicht-linear}}$ kontinuier-

lich an und war im apikalen Teil dem basalen Teil bis zum PT9 durchschnittlich einen Tag voraus (Santos-Sacchi et al., 1998). Mahendrasingam et. al. (2010) untersuchten mittels Immunmarkierung von Prestin die ÄHZ im apikalen und basalen Segment am PT7 und PT16 neugeborener Ratten. Dadurch konnten sie auf die Dichte und Verteilung von Prestin in der lateralen Wand rückschließen. Sie fanden am PT7 einen apikal-basalen Gradienten der Prestindichte in der lateralen Wand der ÄHZ vom Faktor 2,5. Dieser Faktor entspricht dem apikal-basalen Prestingradienten, der in dieser Untersuchung auf mRNA-Ebene gemessen werden konnte.

Diese Befunde, und die Tatsache, dass der Gradient sowohl in Bezug auf die Gesamt-RNA, das Referenzgen und die Haarzellen gezeigt werden konnte, legt die Vermutung nahe, dass es in den unterschiedlichen Regionen des Cortischen Organs eine ortsspezifische Regulation der Prestin-Expression in den äußeren Haarzellen gibt. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass ein apikal-basaler Gradient nicht nur für Prestin und Gata3, sondern auch für Pou4f3 und C/ebp β nachweisbar ist. Es ist gut möglich, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren beitragen zur Ausbildung des apikal-basalen Prestingradienten.

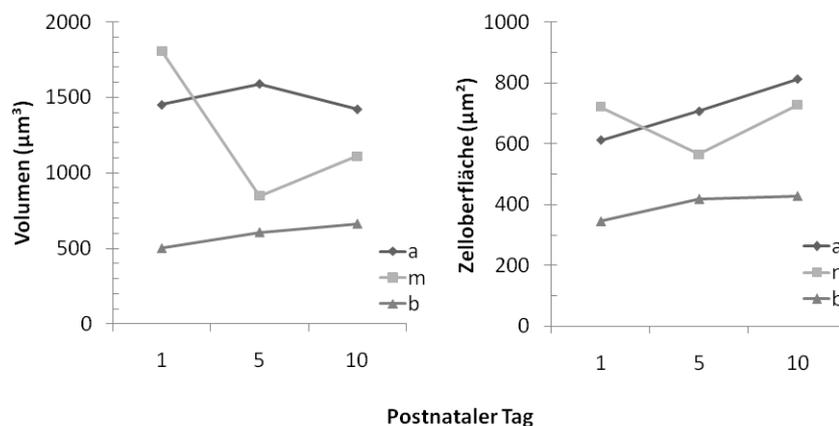


Abb. 30: Verhalten von Volumen und Zelloberfläche der äußeren Haarzellen in der postnatalen Entwicklung von Katzen. Dargestellt sind getrennt nach apikalem, medialem und basalem Segment für die postnatalen Tage 2, 5 und 8 die errechneten Werte für Volumen und Zelloberfläche. Basisdaten für die Berechnung entnommen aus (Sato et al., 1999). Volumen berechnet nach: $V = Zelldurchmesser^2 \times \pi \times \frac{Zellhöhe}{4}$ und Manteloberfläche nach: $A_{(Mantel)} = \pi \times Zelldurchmesser \times Zellhöhe$ (Berechnungsmodell eines Zylinders).

4.4 Die Koexpression von Prestin und untersuchten Transkriptionsfaktoren

4.4.1 Prestin und Pou4f3

Die parallelen Veränderungen von Pou4f3 und Prestin *in vivo* und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen *in vitro* unterstützen die Vermutung, dass Pou4f3 einen Einfluss auf die Regulation von Prestin hat. Es ist also möglich, dass Pou4f3 neben seiner bisher bekannten Bedeutung für die korrekte Entwicklung und das Überleben der vestibulären und auditorischen Haarzellen in der späten embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung (Xiang et al., 1997) auch für die Regulation von Prestin, dem Motorprotein der äußeren Haarzellen, notwendig ist.

In dieser Untersuchung führte die Zugabe von Natriumbutyrat zu der organotypischen 48h-Kultur zu einer Steigerung der Expression von Prestin und Pou4f3 in allen Segmenten des Cortischen Organs. Die anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren und das Referenzgen Tbp zeigten hingegen keine Veränderungen der Expression. Natriumbutyrat hemmt die Histondeacetylase (HDAC), was zu einer verminderten Deacetylierung der Histone führt (Davie, 2003). Die Acetylierung der Histone bestimmt die Bindungsaffinität der Histone zur DNA und reguliert darüber die Transkriptionsrate eines Genes. Dieser Weg wird als ein Mechanismus der epigenetischen Modifikation der Expressionsregulation von Genen gesehen (Peserico und Simone, 2011). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen für die Möglichkeit einer epigenetischen Regulation der Prestin-Expression über die Veränderung des HAT/HDAC-Status. Auch hier kommt es zu einer gleichsinnigen Regulation von Prestin und Pou4f3.

Die Modifikation der organotypischen Kultur mit Retinsäure und mit Thyroxin führte zu einer unterschiedlichen Veränderung der Expression von Prestin und Pou4f3. Während es unter der Zugabe von 0,5 mM Thyroxin zu einem deutlichen Anstieg der Expression von Prestin und Pou4f3 kommt, hemmte die Zugabe von Retinsäure zur Kultur die Expression von Prestin und Pou4f3 deutlich. Von beiden Hormonen ist außerdem bekannt, dass sie bei der Haarzellentwicklung im Cortischen Organ eine bedeutende Rolle spielen (Raz und Kelley, 1997).

Sowohl Thyroxin als auch Retinsäure binden als Hormone über nukleäre Hormonrezeptoren an die DNA und führen über eine Interaktion mit Coaktivatoren und Corepressoren zu einer Beeinflussung auf die Transkriptionsrate der von ihnen regulierten Gene. Hierbei entscheidet die Zusammensetzung der Hormonrezeptorendimere (THR, RAR, RXR) und der Abstand der Dimeruntereinheiten an der DNA über eine aktivierende oder repressorische Wirkung. Dies er-

klärt, warum beide Substanzen bei gleichen Hormonrezeptoren eine entgegengesetzte Wirkung auf die Expression von Prestin und Pou4f3 haben können.

Physiologischerweise fällt die Konzentration von Retinsäure im Cortischen Organ postnatal ab (Kelley et al., 1993) und wird im adulten Cortischen Organ nicht mehr exprimiert (Bryant et al., 2002). Hingegen kommt es postnatal zu einem Anstieg des Schilddrüsenhormons mit einem Punktum maximum um den 15. postnatalen Tag (Adigamov et al., 1988). Für Prestin konnte gezeigt werden, dass TR β für die Wirkung von T4 auf die Expressionssteigerung von Prestin notwendig ist (Winter et al., 2006).

Das Verhalten der Pou4f3-Expression zeigt Ähnlichkeiten und Unterschiede gegenüber der Expression von Gata3, für das sich in vorangegangenen Untersuchungen Hinweise auf eine Regulation der Prestinexpression ergeben haben (Gross et al., 2010). Beide Gene zeigen einen apikal-basalen Gradienten und korrelieren eng mit der Prestin-Expression. Pou4f3 ist allerdings nicht in den Stützzellen, sondern ausschließlich in den äußeren Haarzellen im Cortischen Organ zu finden (Xiang et al., 1997). Des Weiteren zeigte sich, dass die Expression von Pou4f3 auch nach dem PT5 ansteigt, wohingegen die Expression von Gata3 unverändert bleibt (Gross et al., 2010). Möglicherweise sind beide Transkriptionsfaktoren in kooperativer Weise an der transkriptionellen Regulation von Prestin beteiligt, wobei der Einfluss von Gata3 ein Zusammenwirken mit den umliegenden Unterstützungszellen ermöglicht.

4.4.2 Prestin und C/ebp β

Ein paralleles Verhalten von C/ebp β und Prestin findet sich *in vivo* zwischen PT5 und PT8 sowie in mit T4 versetzten Kulturen. Neben Pou4f3 ist C/ebp β der einzige hier untersuchte Transkriptionsfaktor, der am PT8 ebenfalls einen apikal-basalen Gradienten ausbildet und im Cortischen Organ gegenüber Limbus deutlich stärker exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter KCl ein Anstieg der C/ebp β Expression. Auch Sun et.al (2007) konnten zeigen, dass es in kortikalen Neuronen nach vierstündiger 25 mM KCl-Kultur zu einer Induktion von C/ebp β kommt. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Yukawa et al. (1998), die zeigen konnten, dass eine Membrandepolarisation zu einem Anstieg der C/ebp β mRNA-Expression führen kann. Dies ist wahrscheinlich auf die Aktivitätssteigerung nach CaMKIV-abhängiger Phosphorylierung von Creb1a zurückzuführen. In dieser Untersuchung wurde unter KCl ebenfalls eine starke ($R = 0,81$) und unter T4 eine leichte ($R = 0,73$)

Korrelation zwischen C/ebp β und Creb in der Entwicklung gefunden. Ein intrazellulärer Anstieg von cAMP führt zu einer Phosphorylierung von C/ebp β an mehreren Bindungsstellen (Trautwein et al., 1994) und geht mit einer erhöhten DNA-Bindung und Steigerung der Transkriptionsaktivität einher (Persson et al., 2005). Die Hochregulation von C/ebp β nach verstärkter Depolarisation ist entscheidend für die Exotoxizität bei Hirnschäden (Cortes-Canteli et al., 2008).

Unter Zugabe von T4 kam es in dieser Arbeit zu einem Anstieg der C/ebp β -Expression und zu einer positiven Korrelation mit Prestin. In dem Promotor von Prestin konnte die Existenz funktioneller Schilddrüsenhormonbindungsstellen nachgewiesen werden, die zu einer Steigerung der Expression führen (Weber et al., 2002; Winter et al., 2006). Ein Anstieg von C/ebp β unter Zugabe von Schilddrüsenhormonen wurde im Leberstoffwechsel beschrieben und eine TRE-Bindungsstelle im Promotor von C/ebp α nachgewiesen (Menendez-Hurtado et al., 2000; Wang et al., 2009). Es ist gut möglich, dass dem gemeinsamen Anstieg von C/ebp β und Prestin eine Interaktion mit der TRE-Bindungsstelle zu Grunde liegt.

Insgesamt ist C/ebp β ein Faktor, der in einer Vielzahl von regulatorischen Wegen eine Rolle spielt. So wurden in PC12-Zellen 115 Gene gefunden, die mit C/ebp β assoziiert sind (Kfoury und Kapatos, 2009). Dabei kann es sowohl zu einer Aktivierung wie auch zu einer Repression kommen. Im Unterschied zu der KCl- und T4-Kultur ist die Expression von C/ebp β in der Natriumbutyrat- und Normalkultur unverändert. Die Ursachen sind unbekannt. Offensichtlich bietet die Normalkultur und die Natriumbutyratkultur eine geringere Stressausübung auf das Gewebe.

4.4.3 Prestin und Sp1

In dieser Untersuchung zeigte sich für Sp1 unter keiner Bedingung ein korrelatives Verhalten der Expressionsentwicklung im Vergleich zu Prestin. Dementsprechend ist zu vermuten, dass Sp1 eher keinen spezifischen Einfluss auf das Verhalten der Prestin-Expression hat. Unter allen Bedingungen zeigte es eine konstante Expression, was der Funktion eines konstitutiven Transkriptionsfaktors entspricht. Nicht untersucht wurde die Regulation von Sp1 auf posttranskriptioneller Ebene. So ist bekannt, dass die Aktivität von Sp1 durch Phosphorylierung verstärkt werden kann. Insgesamt wurden 9 Kinasen beschrieben, die eine Phosphorylierung bewirken können (Wierstra, 2008). Neben der Phosphorylierung sind Acetylierung, Glykosylierung,

Ubiquitylierung und Sumoylation beschrieben (Wierstra, 2008). Dies zeigt, dass die Regulation von Sp1 weit über die Regulation auf Transkriptionsebene hinausgeht.

Auch wurden Interaktionen von Sp1 mit von uns untersuchten Transkriptionsfaktoren beschrieben. C/ebp β reguliert die gewebespezifische Aktivierung von CD11c über eine Interaktion mit Sp1 (Lopez-Rodriguez et al., 1997). Die Interaktion von C/ebp β und Sp1 konnte ebenfalls im CYP2D5-Gen gezeigt werden, wo es die Bindung von C/ebp β verstärkt (Lee et al., 1994). Sp1 könnte auch über die Interaktion mit Pou4f3 und Gata3 wirken. Für beide Transkriptionsfaktoren sind entsprechende Wechselwirkungen aufgezeigt worden. So wurden Mutationen in der 5'-flankierenden Region im Pou4f3-Gen beschrieben, die zu einer veränderten Bindungsaffinität von Sp1 führten (Nolan et al., 2007). Diese Mutationen im Pou4f3-Gen gehen mit einem „*late onset hearing loss*“, einem späteinsetzenden Hörverlust bei diesen Patienten, einher. Bei der Untersuchung der Dopamin-beta-Hydroxylase (DBH) zeigte sich eine Wechselwirkung zwischen Sp1 und Gata3 (Hong et al., 2008). Hier kam es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Sp1 und Gata3, die eine Bindung von Gata3 an den Promotor von DBH trotz fehlender Gata3-Bindungsstellen, ermöglicht. Für Prestin gibt es Hinweise darauf, dass Gata3 an der Regulation der Transkription beteiligt ist.

Das in dieser Arbeit beobachtete Muster der Sp1-Expression passt am ehesten zu der Funktion als konstitutiver Aktivator eines Haushaltsgens, das normalerweise nicht reguliert ist (Wierstra, 2008). Die Funktion auf posttranskriptioneller Ebene bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4.4 Prestin und Carf

Carf spielt im neuronalen Gewebe eine große Rolle für die aktivitätsgesteuerte Regulation (Xia und Storm, 2002). In den hier untersuchten Bedingungen zeigten sich für Carf Veränderungen der Expression in den Kulturen unter Zusatz von KCl und T4. In beiden Kulturen wurde Carf deutlich herunter reguliert. Dieser Abfall korreliert eng mit dem Verlauf von Prestin.

Carf ist ein aktivitätsgesteuerter Transkriptionsfaktor, der unter intrazellulärem Ca²⁺-Anstieg aktiviert wird und zu einer Expressionssteigerung der Zielgene führt (Xia und Storm, 2002). Kulturen mit hohen KCl-Konzentrationen simulieren eine dauerhafte Aktivierung der Zelle und führen zu einer Membrandepolarisation. Damit verbunden kommt es zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Haarzellen, was eine Aktivierung von Carf nach sich zieht. Segal (1990) beobachtete, dass Ca²⁺-Ionen frühe Messenger für die Wirkung des Schilddrüsenhormons sind. Er

zeigte, dass die Ca^{2+} -Aufnahme ein sehr frühes Ereignis nach Bindung des Hormons an den entsprechenden Membranrezeptor ist. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration könnte ein Signal zur Veränderung der Expression dieses Transkriptionsfaktors sein. Darüber hinaus sind weitere regulatorische Wege an der Aktivierung von Carf beteiligt. Tao et al. (2002) konnten zeigen, dass es bei einer durch Ionomycin getriggerten intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung nicht zu einer gesteigerten Carf-Aktivität kommt. Singer postulierte, dass der Anstieg von Carf unter chronischer Salicylsäuregabe auf einer dosisabhängigen Beeinflussung von L-Typ-Kalzium-Kanälen beruht (Singer et al., 2008).

Auch unter Lärm kommt es zu einer verstärkten Depolarisation der Haarzellen mit damit vergesellschafteter Ca^{2+} -Erhöhung. Es ist gut möglich, dass an der Entstehung von lärminduziertem Tinnitus auch eine Herunterregulation von Prestin beteiligt ist. Eine Abnahme von Prestin in den äußeren Haarzellen könnte zu einer Senkung der Hörschwelle und Verminderung der Frequenzdiskrimination führen. Es wurde beschrieben, dass eine verminderte periphere cochleäre Aktivität zentral zur Ausbildung von Tinnitus führen kann (Eggermont, 2005; Jastreboff, 1990). Andererseits schützen hohe Kaliumkonzentrationen das Überleben der inneren und äußeren Haarzellen neugeborener Ratten vor Ischämie induzierten Schäden (Mazurek et al., 2006).

McDowell et. al. (2010) haben eine Knockout-Maus für Carf generiert. Es zeigten sich keine Auffälligkeiten im Verhalten, die auf eine Hörminderung, vermittelt durch eine verminderte Prestin-Expression, schließen ließen. Auffällig war eine erhöhte Expression GABAerger Proteine bei unveränderter Anzahl glutamaterger Synapsen. Es zeigten sich dezente Hinweise auf eine schwächere Gedächtnisfunktion, wobei eine verminderte BDNF-Exon-IV-Expression beteiligt sein könnte.

4.4.5 Prestin und Creb

Creb gehört ebenfalls zu den signalabhängigen Transkriptionsfaktoren. In der vorliegenden Untersuchung zeigte Creb1 nur in den hochdosierten KCl-Kulturen eine Veränderung der mRNA-Expression. Hier kam es zu einem 40 % Anstieg gegenüber den Kontrollen. Doch weder *in vivo* noch *in vitro* kam es zu einer signifikanten Korrelation zwischen Creb und Prestin. Dies lässt vermuten, dass die Veränderungen von Creb auf RNA-Ebene unabhängig von der Prestin-Expression erfolgen. Neben der Regulation auf mRNA-Ebene unterliegt Creb einer deutlichen Beeinflussung durch posttranskriptionelle Modifikationen. Die Stimulus-induzierte Aktivierung

von Creb wird über Phosphorylierung von Serinbindungsstellen (Ser133 und Ser142) vermittelt (Sheng et al., 1991).

Für die Wirkung der Phosphorylierung auf CREB gibt es einige Hinweise und Vermutungen. Die Bindungsaffinität von CREB an CRE-Bindungsstellen kann gesteigert werden, was allerdings vor allem für schwache Bindungsstellen gilt (Shaywitz und Greenberg, 1999). Desweiteren unterstützt die Phosphorylierung an Ser133 eine Dimerisierung mit CREB oder anderen bZIP-Faktoren, wie z. B. CREM und ATF-1 (Shaywitz und Greenberg, 1999). Hierbei haben CREB/CREB-Homodimere die längste Halbwertszeit. Die Dimerisierung scheint nötig zu sein für eine Ca^{2+} -getriggerte Aktivierung der Transkription (Shaywitz und Greenberg, 1999). Mehrere regulatorische Signalwege münden in einer Phosphorylierung von CREB: (I) Hormonaktivierte G-Protein-Rezeptoren führen über cAMP-Erhöhung zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), (II) Sympathische Aktivität führt über einen Ca^{2+} -Anstieg zur Aktivierung von CaMKIV, (III) Wachstumshormone können den RAS-Signalweg RSK2 aktivieren und (IV) bei Stress freigesetzte inflammatorische Zytokine können MSK (*mitogen- and stress-activated kinase*) und MAPKAP-K2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2*) aktivieren (De Cesare et al., 1999). Eine Membrandepolarisation und der damit einhergehende Ca^{2+} -Einfluss führen ebenfalls zu einer Phosphorylierung an Ser133 und damit zu einer Aktivierung von CREB (De Cesare et al., 1999). Die Beeinflussung der Stabilität und Translokation des Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern scheint bei Creb keine primäre Wirkung der Phosphorylierung zu sein (Shaywitz und Greenberg, 1999).

CREB ist ein typischer Transkriptionsfaktor, der in der Neuroplastizität involviert ist (Tardito et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass neuronale Aktivität und Ca^{2+} ein wichtiger Stimulus bei der Ausbildung von synaptischen Verbindungen sind (Shaywitz und Greenberg, 1999). Hierbei wird ein Einfluss von CREB auf die Expression von BDNF diskutiert, das eine wichtige Rolle in der Ausbildung synaptischer Verbindungen in der Entwicklung des ZNS spielt (Tao et al., 1998). So könnten eine verstärkte Depolarisation und ein möglicher, damit verbundener Anstieg von Creb zu einer Festigung synaptischer Verbindungen zwischen Haarzellen und Nervenzellen führen.

4.5 Computerbasierte Analyse der Promotoren

Das Vorhandensein von Bindungsstellen für einen Transkriptionsfaktor im Promotorbereich eines Genes deutet auf eine potentielle Rolle dieses Faktors in der Regulation hin. Die Bindung eines Transkriptionsfaktors lässt sich nur experimentell, z. B. durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), bestätigen. Aufgrund des experimentellen Aufwandes dieser Untersuchung bedarf es einer vorherigen Selektion potentieller Transkriptionsfaktoren. Zahlreiche computergestützte Algorithmen wurden entwickelt, um die Bindungsstärke eines Transkriptionsfaktors an einer gegebenen DNA-Sequenz zu berechnen (Bailey, 2008). Allerdings ist eine berechnete Bindungswahrscheinlichkeit nicht beweisend für eine wirkliche Bindung bzw. eine funktionell bedeutende Bindung. Zur Reduktion falsch positiver Bindungsstellen ist die vorherige Eingrenzung infrage kommender DNA-Abschnitte notwendig. Diesem Vorgehen liegt die Annahme zu Grunde, dass funktionell bedeutende Bereiche in einer Promotorregion evolutionär konserviert sind. Durch einen phylogenetischen Vergleich unterschiedlicher Spezies lassen sich so konservierte Bereiche ermitteln. Dieser Ansatz wurde auch in dem Genomatix®-Projekt verfolgt (Cartharius et al., 2005). So wurden für Prestin drei mögliche Promotorregionen ermittelt, die in der vorliegenden Untersuchung auf mögliche Transkriptionsbindungsstellen hin untersucht wurden.

4.5.1 Promotorbereiche

Die Transkriptionsaktivität eines Gens wird durch die zugehörige Promotorregion des Genes reguliert. Diese befindet sich üblicherweise in der 5' UTR und kann das erste Exon mit umfassen. Daneben wurde die Existenz alternativer Promotoren beschrieben, die alternative Expressionsprodukte (Isoformen) hervorbringen können (Kimura et al., 2006). Hierbei können die alternativen Promotoren sowohl bis zu 100 kB weiter distal im 5'-UTR-Bereich, als auch innerhalb des Gens liegen. Beides ist für das Dystrophin beim Menschen beschrieben. Für das menschliche Prestin sind bereits mehrere Isoformen bekannt (Teek et al., 2009).

Im Weiteren wurde evaluiert, inwieweit bei der Ratte die für Prestin durch das Genanalyseprogramm MatInspector® von Genomatix® vorhergesagten Promotorbereiche typische Promotorelemente enthalten. Abb. 3 zeigt einen Ausschnitt des Promotorsets 3 (-250 Bp bis -168 Bp vor ATG). Dieser enthält im Bereich um -200 Bp vor ATG typische Core-Promotorelemente (Butler und Kadonaga, 2002). So ist es wahrscheinlich, dass diese Region Promotorfunktion für Prestin

inne hat. Die DNA-Sequenz, unmittelbar um das Startcodon von Prestin (-5 bis +6 Bp) lokalisiert, ist eine Kozak-Sequenz (Kozak, 1987), wie sie homolog auch für Prestin der Maus gefunden worden ist (Zheng et al., 2003). Diese typische Sequenz ist häufig um das Startcodon eukaryonter Gene zu finden.

4.5.2 In silico Analyse von Transkriptionsbindungsstellen

Falls die Korrelation zwischen der Prestin-Expression und der Expression von Pou4f3, C/ebp β und Carf auf dem Vorliegen von Bindungsstellen in der Promotorregion von Prestin für diese Transkriptionsfaktoren beruht, sollten sich diese in einer in silico Analyse nachweisen lassen. Das Vorhandensein der Bindungsstellen im Genom mehrerer Spezies erhöht die Wahrscheinlichkeit deren biologischer Relevanz (Elnitski et al., 2006). Daher wurde die Promotorregion von Prestin bei Ratte, Maus, Rind und Mensch mit Hilfe des Sequenzanalyseprogramms MochiView (Abb. 5) auf Bindungsstellen der Faktoren hin untersucht. Als Matrix dienten hierzu in der Literatur veröffentlichte Konsensussequenzen der einzelnen Transkriptionsfaktoren (Tabelle 4). Der Schwellenwert zur Anzeige einer Bindungsstelle berechnet sich aus der vorgegebenen Konsensussequenz.

Zunächst wurden die Promotorregionen von Prestin auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für TRE und RARE untersucht. Tabelle 11 zeigt das Auftreten vorhergesagter Bindungsstellen bzw. die Anzahl der Bindungsstellen im Promotor. Dabei wurde geschaut, ob das Auftreten dieser Bindungsstellen häufiger vorkam als in einer willkürlich erstellten Sequenz gleicher Zusammensetzung. Interessanterweise kam es in PS3 zu einer Anreicherung von RARE- und TRE-Bindungsstellen. Die Promotorbereiche PS1 und PS2 zeigten eine identische Verteilung der Bindungsstellen in der genetischen und den zufällig gemischten Sequenzen. Daher wurden die weiteren in silico Untersuchungen nur von PS3 durchgeführt.

Die Bindungsstellen, die in PS3 gefunden werden konnten, sind in Tabelle 12 dargestellt. Weiterhin wurde geschaut, wie häufig die Motive in einer zufälligen Sequenz gleicher Basenzusammensetzung auftreten und ob das Auftreten in den Promotorbereichen überproportional häufig vorkommt. Tabelle 12 fasst die Ergebnisse der Analyse zusammen. Es zeigt sich, dass Bindungsstellen für Pou4f3, C/ebp β und Carf bei allen untersuchten Spezies in der Promotorregion von Prestin überzufällig häufig vorhanden sind.

Tabelle 11: Auftreten vorhergesagter Bindungsstellen in den Promotorregionen von Prestin

<i>Motive</i>	<i>Prestin PS3 (n = 50)</i>	<i>Prestin PSI (N = 50)</i>	<i>Prestin PS2 (N = 50)</i>
RARE/TRE	2 (0,9±0,7)	0 (0,4±0,6)	0 (0,4±0,5)
RARE	3 (1,0±0,4)	2 (2,3±1,3)	2 (2,3±1,4)
TRE	3 (1,0±0,4)	1 (0,6±0,9)	0 (0,5±0,8)

Promotoren wurden mittels Genomatix ermittelt, Bindungsstellen wurden mittels MochiView identifiziert. In Klammern: Auftreten der Motive in gemischt rearrangierten Sequenzen der Promotoren (n = 50; Mittelwert ± Stabw).

Zur Bestätigung bedarf es einer experimentellen Validierung der vorhergesagten Bindungsstellen. Dies geschieht in der Promotoranalyse über experimentelle Veränderung von Sequenzen innerhalb definierter DNA-Abschnitte im Promotor und konsekutive Messung eines Markerproteins, z. B. durch die direkte Messung der Proteinbindung an die DNA mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*). Der neueste Ansatz ist die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP). Mit dieser Methode werden *in vivo* an die DNA gebundene Transkriptionsfaktoren detektiert mit der Erfordernis, dass diese vorher bekannt sind (Orlando, 2000). Genexpressionsassays messen die Veränderung eines Reportergens in Abhängigkeit cis-aktiver regulatorischer Signale.

Tabelle 12: Bindungsstellen von Pou4f3, C/ebp β und Carf in der Promotorregion von Prestin

<i>Motiv</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Häufigkeit des Auftretens</i>	<i>Spezies</i>
Pou4f3	5'- <u>AAATGA</u> - 3'	BDNF und NT-3^a	
	5'-G <u>AAAATGAAA</u> -3' (+)	3 (1, 0-1)	Ratte, 89-98 ^d
	5'-G <u>CAAATGAAA</u> -3' (+)	5 (2, 1-5)	Maus
	5'-G <u>CAAATGAGA</u> -3' (+)	<u>2 (1, 0-5)</u>	Rind
	5'-A <u>AAAATGACC</u> -3' (-)	<u>1 (0, 0-1)</u>	Mensch
C/ebp β	5'- <u>TKNNGNAAK</u> -3'	Konsensussequenz^b	
	5'- <u>TGGAGGAAG</u> -3' (-)	<u>2 (1, 0-4)</u>	Ratte, 56-48 ^d
	5'- <u>TGGAGGAAG</u> -3' (-)	3 (0, 10)	Maus
	5'- <u>TGGAGGGGC</u> -3' (+)	7 (2, 0-6)	Rind
	5'- <u>TGGAGAGGA</u> -3'(+)	4 (1, 0-3)	Mensch
CaRF	5'- <u>ANAACGAGGC</u> -3'(+)	CaRE1 von BDNF^c	
	5'-CAGGAGAGGC-3'(+)	<u>3 (1, 0-3)</u>	Ratte, 450-441 ^d
	5'-CTTGGGAGGC-3'(-)	7 (4, 1-5)	Maus
	5'-CCTGTGAGGC-3'(+)	<u>3 (2, 0-6)</u>	Rind
	5'-GGGAAGAGGC-3'(+)	5 (2, 0-3)	Mensch

^aClough et al. 2004; ^bOsada et al. 1996; ^cPfenning et al. 2010; ^dAuftreten der Bindungsstellen in der Promotorregion nach Genomatix (GXP_19572). Der Sequenzvergleich zeigt Sequenzkonservierungen zwischen Ratte, Maus, Rind und Mensch im PS3-Prestin-Promotor. Konstante Kernsequenzen, die in allen Spezies konserviert sind, sind unterstrichen. Die homologen Sequenzen von PS3 können unter NCBI/HomoloGene/SLC26a5, Zugriffsnummer NW_047687 (Rattus norvegicus), NT_165760.2 (Mus musculus), NW_001494886.1 (Bos taurus), NT_007933.15 (Homo sapiens) identifiziert werden. In Klammern ist angegeben, wie häufig die Motive in einer zufälligen Mischung der Sequenzen auftreten (Median, Min-Max, jeweils n = 30). Der Wald-Wolfowitz-Test zeigt signifikante Unterschiede zwischen dem beobachteten und der zufälligen Häufigkeiten für jede untersuchte Sequenz (jeweils p < 0,001).

5 Bedeutung der Untersuchung und Schlussfolgerungen

Folgende Aussagen können auf der Grundlage dieser Arbeit getroffen werden: (I) In dieser Arbeit wurde erstmalig die Koexpression zwischen ausgewählten Transkriptionsfaktoren und Prestin während der postnatalen Entwicklung untersucht. (II) Diese Arbeit zeigt, dass neben Gata3 auch die Transkriptionsfaktoren Pou4f3, C/ebp β und Carf möglicherweise an der Regulation von Prestin beteiligt sind. Es zeigte sich ein paralleles Verhalten zwischen Prestin und Pou4f3 *in vivo* und zum Teil *in vitro*. C/ebp β und Carf hingegen korrelieren unter ausgewählten Bedingungen eng mit der Expression von Prestin. (III) Die Arbeit trägt ferner zum Verständnis der Entwicklung des apikal-basalen Gradienten bei. Die ebenfalls einen Gradienten ausbildenden Transkriptionsfaktoren Pou4f3 und C/ebp β könnten mit der tonotopischen Expression von Prestin in Verbindung stehen. (IV) Weiterhin wurde die regionale Verteilung der ausgewählten TF zwischen Cortischem Organ und Limbus untersucht, wobei sich bestätigte, dass Pou4f3 ausschließlich sowie C/ebp β und Gata3 vermehrt im Cortischen Organ exprimiert werden.

Durch diese Erkenntnisse trägt die Arbeit zum Grundlagenwissen der postnatalen Innenohrentwicklung bei und bietet mit der möglichen Beeinflussung von Prestin therapeutische Möglichkeiten. Prestin ist ein für den Hörprozess bedeutendes Protein, dass bei einem Funktionsverlust zu einer Minderung des Hörvermögens um etwa 40 dB führt (Lieberman et al., 2002). Starker Lärm führt neben einer Schädigung der äußeren Haarzellen und damit verbundenen Hörstörungen auch zu einer Hochregulation von Prestin (Mazurek et al., 2007). Ebenso löst die chronische Einnahme von Salicylsäure reversibel Tinnitus aus und führt über einen Anstieg der Prestin-Expression (Yu et al., 2008) zu einem Anstieg der Elektromotilität der ÄHZ (Yang et al., 2009). Der Typ I der Tinnitusklassifikation nach Zenner (1998) wird als Motortinnitus bezeichnet und beruht auf der verstärkten Hypermotilität der äußeren Haarzellen. Prestin als Motorprotein steht in der Diskussion als möglicher Auslöser (Mazurek et al., 2006).

Die Arbeit zeigt einerseits Möglichkeiten zur Beeinflussung der Prestin-Expression und versucht andererseits, Zusammenhänge potentieller Mechanismen der Expressionsregulation von Prestin darzulegen. Ich bin mir allerdings bewusst, dass Transkriptionsfaktoren auf der Ebene der Transkription wirken und dass weitere Möglichkeiten der Proteinregulation vorhanden sind. Weiterhin beziehen sich diese Ergebnisse auf die frühe postnatale Entwicklung im Tiermodell bzw. auf die organotypische Kultur des Innenohres. Allerdings könnten diese Ergebnisse auf grundlegende Prozesse im adulten Tier hindeuten.

Es sind weitere experimentelle Untersuchungen nötig, um tiefgreifendere Erkenntnisse zur Regulation der Prestinexpression zu erlangen. Bei dieser Arbeit handelt es sich lediglich um Koexpressionsuntersuchungen und somit indirekte Hinweise auf die Rolle der Transkriptionsfaktoren. Mögliche weitere Untersuchungen wären eine selektivere Präparation der ÄHZ, die Extraktion der mRNA mittels Einzelzell-PCR, die Anwendung eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays zur Bestimmung spezifischer Transkriptionsbindungsstellen und die kontrollierte Ausschaltung einzelner Transkriptionsfaktoren mittels siRNA.

6 Zusammenfassung

Prestin ist das Motorprotein der äußeren Haarzellen im Cortischen Organ des Innenohres. Durch seine mechanosensorische Kopplung ist es maßgeblich für die hohe Sensitivität des Hörens verantwortlich. Die molekularen Mechanismen der Expressionsregulation von Prestin werden immer noch unzureichend verstanden.

In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von Prestin und die der Transkriptionsfaktoren Pou4f3 (*POU domain, class 4, transcription factor 3*), C/ebp β (*CCAAT/enhancer binding protein beta*), Sp1 (*specificity protein 1*), Carf (*calcium response factor*) und Creb1 (*cAMP response element binding protein*) bei Ratten mittels Echtzeit-PCR unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bestimmt und auf zwei Bezugssysteme bezogen. Hierfür dienten der totale RNA-Gehalt einer Probe und der mRNA-Gehalt des Haushaltsgens Tbp. Die Expression von Prestin und die der ausgewählten Transkriptionsfaktoren wurden verglichen hinsichtlich: 1.) des Musters der Expression, 2.) der Korrelation des mRNA-Gehalts und 3.) der Existenz von Bindungsstellen für die untersuchten Transkriptionsfaktoren in den Promotorbereichen von Prestin und der Transkriptionsfaktoren.

Es wurden Bedingungen gewählt, von denen bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf die Expression von Prestin haben. Dies sind zum einen die Expressionsveränderungen während der postnatalen Entwicklung der Ratte zwischen dem 2. und dem 8. postnatalen Tag. Zum anderen wurden Expressionsveränderungen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs gezielt induziert. Hierzu wurden der Kultur Thyroxin (T4), Kaliumchlorid (KCl), Natriumbutyrat (NB) bzw. Retinsäure (RS) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Außerdem erfolgte die Suche nach Expressionsveränderungen entlang der apikal-basalen Achse des Cortischen Organs.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die mRNA-Expressionen von Prestin und Pou4f3 in der postnatalen Entwicklung sowie in der organotypischen Kultur unter Zugabe von Thyroxin (0,5 μ M), Natriumbutyrat (bis 2000 μ M) und erhöhter KCl-Konzentration (50 mM) signifikant miteinander korrelieren. Beide Gene bilden außerdem sowohl in der postnatalen Entwicklung als auch in der 48h-Kultur unter Zugabe von Thyroxin (0,5 mM) einen apikal-basalen Gradienten entlang der apikal-basalen Achse des Cortischen Organs aus. Für C/ebp β und Prestin zeigte sich in der postnatalen Entwicklung und in den 48h-Kulturen unter Zugabe von Thyroxin (0,5 mM) sowie Retinsäure (bis 100 μ M) eine signifikante Korrelation zwischen der Expression beider Gene. Auch C/ebp β bildet in der postnatalen Entwicklung einen apikal-basalen Gradienten im Corti-

schen Organ aus. Die Expression des Transkriptionsfaktors Carf korreliert mit der Prestinexpression sowohl in der Kultur unter Zugabe von Thyroxin (0,5 mM) als auch unter Zugabe von KCl (50 mM). Für die Faktoren Sp1 und Creb1a sind keine signifikanten Korrelationen nachweisbar.

Mithilfe einer modifizierten Präparationsmethode wurde analysiert, inwieweit im Innenohr eine unterschiedliche Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren im Bereich der Haarzellen und der angrenzenden Limbusregion vorliegt. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptionsfaktoren Gata3 und C/ebp β im Cortischen Organ höher exprimiert werden als im Limbus. Für Pou4f3 ist eine spezifische Expression in den äußeren Haarzellen des Cortischen Organ bekannt. Für Sp1, Carf und Creb konnte keine höhere Expression im Cortischen Organ gefunden werden.

In einer *in silico*-Analyse der Promotorregionen von Prestin bei Mensch, Ratte, Maus und Rind fanden sich Hinweise darauf, dass homologe Bindungsstellen für Pou4f3, C/ebp β und Carf in der Promotorregion von Prestin zu finden sind. Auch Bindungsstellen für Retinsäure und Thyroxin finden sich häufiger in den Promotorsequenzen von Prestin als in zufälligen Sequenzen gleicher Basenzusammensetzung.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren Pou4f3, C/ebp β und Carf an der Regulation der Expression von Prestin beteiligt sein können. Es bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen, um die funktionelle Relevanz der Transkriptionsfaktoren und Bindungsstellen zu beweisen.

Literaturverzeichnis

- Adigamov, L. F. ; Smirnova, D. ; Nipontov, V.D. und CERNIKOV, M. P. (1988): Untersuchung der hormonalen Regulation der anabolen Prozesse un der Effektivität der Proteinverwertung in der frühen postnatalen Periode, *Die Nahrung* 32 [5], Seite 427-431.
- Adler, H. J.; Belyantseva, I. A.; Merritt, R. C., Jr., et al. (2003): Expression of prestin, a membrane motor protein, in the mammalian auditory and vestibular periphery, *Hear Res* 184 [1-2], Seite 27-40.
- Aid-Pavlidis, T.; Pavlidis, P. und Timmusk, T. (2009): Meta-coexpression conservation analysis of microarray data: a "subset" approach provides insight into brain-derived neurotrophic factor regulation, *BMC Genomics* 10, Seite 420.
- Akira, S.; Isshiki, H.; Sugita, T., et al. (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family, *EMBO J* 9 [6], Seite 1897-906.
- Alberini, C. M.; Ghirardi, M.; Metz, R. und Kandel, E. R. (1994): C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*, *Cell* 76 [6], Seite 1099-114.
- Andersen, B. und Rosenfeld, M. G. (2001): POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease, *Endocr Rev* 22 [1], Seite 2-35.
- Ashmore, J. (2008): Cochlear outer hair cell motility, *Physiol Rev* 88 [1], Seite 173-210.
- Augustine, E. C. und Hymer, W. C. (1978): Thyroid hormone effects on protein and RNA metabolism in the rat anterior pituitary, *Mol Cell Endocrinol* 10 [2], Seite 225-38.
- Bai, J. P.; Surguchev, A.; Montoya, S., et al. (2009): Prestin's anion transport and voltage-sensing capabilities are independent, *Biophys J* 96 [8], Seite 3179-86.
- Bai, J. P.; Surguchev, A.; Ogando, Y., et al. (2010): Prestin Surface Expression and Activity Are Augmented by Interaction with Map1s, a Microtubule Associated Protein, *J Biol Chem*.
- Bailey, Timothy L. (2008): *Discovering Sequence Motifs*, Keith, Jonathan M., Bioinformatics 1, Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, Totowa, NJ.
- Beisel, K. W.; Nelson, N. C.; Delimont, D. C. und Fritzsche, B. (2000): Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear hair cells correlate with progressive hearing loss in DFNA2, *Brain Res Mol Brain Res* 82 [1-2], Seite 137-49.
- Bell, A. C.; West, A. G. und Felsenfeld, G. (2001): Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic, *Science* 291 [5503], Seite 447-50.
- Belyantseva, I. A.; Adler, H. J.; Curi, R.; Frolenkov, G. I. und Kachar, B. (2000): Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells, *J Neurosci* 20 [24], Seite RC116.
- Benninghoff und Drenckhahn (2004): *Anatomie 2*, 16. Auflage, Asan, Esther, Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut, 2, Urban und Fischer, München, ISBN: 3-437-42350-9.
- Berrier, A.; Siu, G. und Calame, K. (1998): Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells, *J Immunol* 161 [5], Seite 2267-75.
- Brivanlou, A. H. und Darnell, J. E., Jr. (2002): Signal transduction and the control of gene expression, *Science* 295 [5556], Seite 813-8.

- Bryant, J.; Goodyear, R. J. und Richardson, G. P. (2002): Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms, *Br Med Bull* 63, Seite 39-57.
- Butler, Christopher (1985): Parametric tests of significance, *Statistics in Linguistics* Seite 84, Blackwell, Oxford.
- Butler, J. E. und Kadonaga, J. T. (2002): The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes Dev* 16 [20], Seite 2583-92.
- Cano, M. L.; Cassimeris, L.; Joyce, M. und Zigmond, S. H. (1992): Characterization of tetramethylrhodaminyl-phalloidin binding to cellular F-actin, *Cell Motil Cytoskeleton* 21 [2], Seite 147-58.
- Cartharius, K.; Frech, K.; Grote, K., et al. (2005): MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, *Bioinformatics* 21 [13], Seite 2933-42.
- Cazals, Y. (2000): Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate, *Prog Neurobiol* 62 [6], Seite 583-631.
- Chen, Z. Y. und Corey, D. P. (2002): Understanding inner ear development with gene expression profiling, *J Neurobiol* 53 [2], Seite 276-85.
- Cho, S.; Chung, J. J.; Choe, Y., et al. (2001): A functional retinoic acid response element (RARE) is present within the distal promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene, *Brain Res Mol Brain Res* 87 [2], Seite 204-13.
- Chrivia, J. C.; Kwok, R. P.; Lamb, N., et al. (1993): Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP, *Nature* 365 [6449], Seite 855-9.
- Cortes-Canteli, M.; Luna-Medina, R.; Sanz-Sancristobal, M., et al. (2008): CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury, *J Cell Sci* 121 [Pt 8], Seite 1224-34.
- Czech, B. und Hannon, G. J. (2011): Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes, *Nat Rev Genet* 12 [1], Seite 19-31.
- Dallos, P. (1992): The active cochlea, *J Neurosci* 12 [12], Seite 4575-85.
- Dallos, P. (1996): The cochlea, Dallos, P., Springer handbook of auditory research 8. Seite 1-43, Springer, New York ; Berlin ; Singapore ; Tokyo ; Heidelberg ; Barcelona ; Budapest ; Hong Kong ; London ; Milan ; Paris ; Santa Clara.
- Dallos, P. (1996): Overview: Cochlear Neurobiology, Dallos, P.; Popper, A. N. und Fay, R. R., *The Cochlea* Seite 1-5, Springer, New York, Berlin.
- Davie, J. R. (2003): Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate, *J Nutr* 133 [7 Suppl], Seite 2485S-2493S.
- De Cesare, D.; Fimia, G. M. und Sassone-Corsi, P. (1999): Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation, *Trends Biochem Sci* 24 [7], Seite 281-5.
- de Heer, A. M.; Huygen, P. L.; Collin, R. W.; Kremer, H. und Cremers, C. W. (2009): Mild and variable audiometric and vestibular features in a third DFNA15 family with a novel mutation in POU4F3, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 118 [4], Seite 313-20.
- Deak, L.; Zheng, J.; Orem, A., et al. (2005): Effects of cyclic nucleotides on the function of prestin, *J Physiol* 563 [Pt 2], Seite 483-96.
- Drenckhahn, D (2004): Hör- und Gleichgewichtssystem, Benninghoff und Drenckhahn, D, *Anatomie* 2, 16. Auflage, Seite 706-754, Urban und Fischer, München.
- Eggermont, J. J. (2005): Tinnitus: neurobiological substrates, *Drug Discov Today* 10 [19], Seite 1283-90.

- Elnitski, L.; Jin, V. X.; Farnham, P. J. und Jones, S. J. (2006): Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques, *Genome Res* 16 [12], Seite 1455-64.
- Farber, C. R. und Lusic, A. J. (2008): Integrating global gene expression analysis and genetics, *Adv Genet* 60, Seite 571-601.
- Farnham, P. J. (2009): Insights from genomic profiling of transcription factors, *Nat Rev Genet* 10 [9], Seite 605-16.
- Foka, P.; Kousteni, S. und Ramji, D. P. (2001): Molecular characterization of the *Xenopus* CCAAT-enhancer binding protein beta gene promoter, *Biochem Biophys Res Commun* 285 [2], Seite 430-6.
- Garcia-Villalba, P.; Jimenez-Lara, A. M.; Castillo, A. I. und Aranda, A. (1997): Histone acetylation influences thyroid hormone and retinoic acid-mediated gene expression, *DNA Cell Biol* 16 [4], Seite 421-31.
- Genomatix (2008): Gene2Promotor, Matrix Family Library 7.1, 28.10.2008
- Georges, A. B.; Benayoun, B. A.; Caburet, S. und Veitia, R. A. (2010): Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from?, *FASEB J* 24 [2], Seite 346-56.
- Gidoni, D.; Dynan, W. S. und Tjian, R. (1984): Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters, *Nature* 312 [5993], Seite 409-13.
- Gonzalez, G. A. und Montminy, M. R. (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133, *Cell* 59 [4], Seite 675-80.
- Goodman, R. H. (1990): Regulation of neuropeptide gene expression, *Annu Rev Neurosci* 13, Seite 111-27.
- Graves, B. J.; Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1986): Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene, *Cell* 44 [4], Seite 565-76.
- Grigorieva, I. V.; Mirczuk, S.; Gaynor, K. U., et al. (2010): Gata3-deficient mice develop parathyroid abnormalities due to dysregulation of the parathyroid-specific transcription factor Gcm2, *J Clin Invest* 120 [6], Seite 2144-55.
- Gross, J.; Angerstein, M.; Fuchs, J.; Stute, K. und Mazurek, B. (2011): Expression Analysis of Prestin and Selected Transcription Factors in Newborn Rats, *Cell Mol Neurobiol*.
- Gross, J.; Machulik, A.; Amarjargal, N.; Fuchs, J. und Mazurek, B. (2005): Expression of prestin mRNA in the organotypic culture of rat cochlea, *Hear Res* 204 [1-2], Seite 183-90.
- Gross, J.; Machulik, A.; Amarjargal, N., et al. (2007): Expression of apoptosis-related genes in the organ of Corti, modiolus and stria vascularis of newborn rats, *Brain Res* 1162, Seite 56-68.
- Gross, J.; Stute, K.; Fuchs, J., et al. (2011): Effects of retinoic acid and butyric acid on the expression of prestin and gata-3 in organotypic cultures of the organ of corti of newborn rats, *Dev Neurobiol* 71 [7], Seite 650-61.
- Gross, J.; Stute, K.; Moller, R., et al. (2010): Expression of prestin and Gata-3,-2,-1 mRNA in the rat organ of Corti during the postnatal period and in culture, *Hear Res* 261 [1-2], Seite 9-21.
- Halili, M. A.; Andrews, M. R.; Sweet, M. J. und Fairlie, D. P. (2009): Histone deacetylase inhibitors in inflammatory disease, *Curr Top Med Chem* 9 [3], Seite 309-19.

- Hendriks-Balk, M. C.; Michel, M. C. und Alewijnse, A. E. (2007): Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data, *Basic Res Cardiol* 102 [3], Seite 195-7.
- Holley, M. C.; Kneebone, A. und Milo, M. (2007): Information for gene networks in inner ear development: a study centered on the transcription factor *gata2*, *Hear Res* 227 [1-2], Seite 32-40.
- Homann, O. R. und Johnson, A. D. (2010): MochiView: versatile software for genome browsing and DNA motif analysis, *BMC Biol* 8, Seite 49.
- Hong, S. J.; Choi, H. J.; Hong, S., et al. (2008): Transcription factor GATA-3 regulates the transcriptional activity of dopamine beta-hydroxylase by interacting with Sp1 and AP4, *Neurochem Res* 33 [9], Seite 1821-31.
- Hong, S. J.; Huh, Y.; Chae, H., et al. (2006): GATA-3 regulates the transcriptional activity of tyrosine hydroxylase by interacting with CREB, *J Neurochem* 98 [3], Seite 773-81.
- Huggett, J.; Dheda, K.; Bustin, S. und Zumla, A. (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations, *Genes Immun* 6 [4], Seite 279-84.
- Jastreboff, P. J. (1990): Phantom auditory perception (tinnitus): mechanisms of generation and perception, *Neurosci Res* 8 [4], Seite 221-54.
- Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1989): Eukaryotic transcriptional regulatory proteins, *Annu Rev Biochem* 58, Seite 799-839.
- Jones, K. A.; Yamamoto, K. R. und Tjian, R. (1985): Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro, *Cell* 42 [2], Seite 559-72.
- Judice, T. N.; Nelson, N. C.; Beisel, C. L., et al. (2002): Cochlear whole mount in situ hybridization: identification of longitudinal and radial gradients, *Brain Res Brain Res Protoc* 9 [1], Seite 65-76.
- Kachar, B.; Brownell, W. E.; Altschuler, R. und Fex, J. (1986): Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells, *Nature* 322 [6077], Seite 365-8.
- Kakehata, S. und Santos-Sacchi, J. (1996): Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge, *J Neurosci* 16 [16], Seite 4881-9.
- Kalinec, F.; Holley, M. C.; Iwasa, K. H.; Lim, D. J. und Kachar, B. (1992): A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [18], Seite 8671-5.
- Katz, R. W. und Koenig, R. J. (1993): Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity, *J Biol Chem* 268 [26], Seite 19392-7.
- Keithley, E. M.; Erkman, L.; Bennett, T.; Lou, L. und Ryan, A. F. (1999): Effects of a hair cell transcription factor, *Brn-3.1*, gene deletion on homozygous and heterozygous mouse cochleas in adulthood and aging, *Hear Res* 134 [1-2], Seite 71-6.
- Kelley, M. W.; Xu, X. M.; Wagner, M. A.; Warchol, M. E. und Corwin, J. T. (1993): The developing organ of Corti contains retinoic acid and forms supernumerary hair cells in response to exogenous retinoic acid in culture, *Development* 119 [4], Seite 1041-53.
- Kfoury, N. und Kapatos, G. (2009): Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins, *Mol Cell Neurosci* 40 [3], Seite 313-27.
- Kimura, K.; Wakamatsu, A.; Suzuki, Y., et al. (2006): Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes, *Genome Res* 16 [1], Seite 55-65.

- Kimura, R. S.; Nye, C. L. und Southard, R. E. (1990): Normal and pathologic features of the limbus spiralis and its functional significance, *Am J Otolaryngol* 11 [2], Seite 99-111.
- Kornhauser, J. M.; Cowan, C. W.; Shaywitz, A. J., et al. (2002): CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events, *Neuron* 34 [2], Seite 221-33.
- Kozak, M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Res* 15 [20], Seite 8125-48.
- Lanahan, A. und Worley, P. (1998): Immediate-early genes and synaptic function, *Neurobiol Learn Mem* 70 [1-2], Seite 37-43.
- Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 [6822], Seite 860-921.
- Lee, S. und Privalsky, M. L. (2005): Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties, *Mol Endocrinol* 19 [4], Seite 863-78.
- Lee, Y. H.; Yano, M.; Liu, S. Y., et al. (1994): A novel cis-acting element controlling the rat CYP2D5 gene and requiring cooperativity between C/EBP beta and an Sp1 factor, *Mol Cell Biol* 14 [2], Seite 1383-94.
- Lefebvre, P.; Martin, P. J.; Flajollet, S., et al. (2005): Transcriptional activities of retinoic acid receptors, *Vitam Horm* 70, Seite 199-264.
- Lieberman, M. C.; Gao, J.; He, D. Z., et al. (2002): Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier, *Nature* 419 [6904], Seite 300-4.
- Lomberk, G. und Urrutia, R. (2005): The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins, *Biochem J* 392 [Pt 1], Seite 1-11.
- Lopez-Rodriguez, C.; Botella, L. und Corbi, A. L. (1997): CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins, *J Biol Chem* 272 [46], Seite 29120-6.
- Lowenheim, H.; Kil, J.; Gultig, K. und Zenner, H. P. (1999): Determination of hair cell degeneration and hair cell death in neomycin treated cultures of the neonatal rat cochlea, *Hear Res* 128 [1-2], Seite 16-26.
- Mahendrasingam, S.; Beurg, M.; Fettiplace, R. und Hackney, C. M. (2010): The ultrastructural distribution of prestin in outer hair cells: a post-embedding immunogold investigation of low-frequency and high-frequency regions of the rat cochlea, *Eur J Neurosci* 31 [9], Seite 1595-605.
- Marini, A. M.; Jiang, X.; Wu, X., et al. (2004): Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype, *Restor Neurol Neurosci* 22 [2], Seite 121-30.
- Martin, D. I. (2001): Transcriptional enhancers--on/off gene regulation as an adaptation to silencing in higher eukaryotic nuclei, *Trends Genet* 17 [8], Seite 444-8.
- Mazurek, B. (2007): Die Rolle von Hypoxie und Ischämie bei der Entstehung von Hörstörungen, *Habil.-Schrift, Freie Univ., Berlin*.
- Mazurek, B.; Amarjargal, N.; Haupt, H. und Gross, J. (2006): High potassium concentrations protect inner and outer hair cells in the newborn rat culture from ischemia-induced damage, *Hear Res* 215 [1-2], Seite 31-8.

- Mazurek, B.; Fuchs, J.; Stute, K., et al. (2011): Decrease of prestin expression by increased potassium concentration in organotypic cultures of the organ of Corti of newborn rats, *Neurosci Lett*.
- Mazurek, B.; Haupt, H.; Amarjargal, N., et al. (2007): Up-regulation of prestin mRNA expression in the organs of Corti of guinea pigs and rats following unilateral impulse noise exposure, *Hear Res* 231 [1-2], Seite 73-83.
- Mazurek, B.; Haupt, H. und Gross, J. (2006): [Pharmacotherapy in acute tinnitus. The special role of hypoxia and ischemia in the pathogenesis of tinnitus], *HNO* 54 [1], Seite 9-15.
- McDowell, K. A.; Hutchinson, A. N.; Wong-Goodrich, S. J., et al. (2010): Reduced cortical BDNF expression and aberrant memory in Carf knock-out mice, *J Neurosci* 30 [22], Seite 7453-65.
- Menendez-Hurtado, A.; Santos, A. und Perez-Castillo, A. (2000): Characterization of the promoter region of the rat CCAAT/enhancer-binding protein alpha gene and regulation by thyroid hormone in rat immortalized brown adipocytes, *Endocrinology* 141 [11], Seite 4164-70.
- Nedivi, E.; Hevroni, D.; Naot, D.; Israeli, D. und Citri, Y. (1993): Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning, *Nature* 363 [6431], Seite 718-22.
- Niehof, M.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (1997): CREB controls LAP/C/EBP beta transcription, *Mol Cell Biol* 17 [7], Seite 3600-13.
- Nolan, L.; Jagutpal, S.; Cadge, B.; Woo, P. und Dawson, S. (2007): Identification and functional analysis of common sequence variants in the DFNA15 gene, *Brn-3c, Gene* 400 [1-2], Seite 89-97.
- Nolan, L. S.; Jagutpal, S. S.; Cadge, B. A.; Woo, P. und Dawson, S. J. (2007): Identification and functional analysis of common sequence variants in the DFNA15 gene, *Brn-3c, Gene* 400 [1-2], Seite 89-97.
- Ogbourne, S. und Antalis, T. M. (1998): Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes, *Biochem J* 331 (Pt 1), Seite 1-14.
- Okazaki, M.; Maeda, G.; Chiba, T.; Doi, T. und Imai, K. (2009): Identification of GATA3 binding sites in Jurkat cells, *Gene* 445 [1-2], Seite 17-25.
- Oliver, D. und Fakler, B. (1999): Expression density and functional characteristics of the outer hair cell motor protein are regulated during postnatal development in rat, *J Physiol* 519 Pt 3, Seite 791-800.
- Oliver, D.; He, D. Z.; Klocker, N., et al. (2001): Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein, *Science* 292 [5525], Seite 2340-3.
- Orlando, V. (2000): Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation, *Trends Biochem Sci* 25 [3], Seite 99-104.
- Osada, S.; Yamamoto, H.; Nishihara, T. und Imagawa, M. (1996): DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family, *J Biol Chem* 271 [7], Seite 3891-6.
- Pares-Matos, E. I.; Milligan, J. S. und Bina, M. (2006): Exploring transcription factor binding properties of several non-coding DNA sequence elements in the human NF-IL6 gene, *J Mol Biol* 357 [3], Seite 732-47.
- Parker, M. I.; de Haan, J. B. und Gevers, W. (1986): DNA hypermethylation in sodium butyrate-treated WI-38 fibroblasts, *J Biol Chem* 261 [6], Seite 2786-90.

- Pauw, R. J.; van Drunen, F. J.; Collin, R. W., et al. (2008): Audiometric characteristics of a Dutch family linked to DFNA15 with a novel mutation (p.L289F) in POU4F3, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134 [3], Seite 294-300.
- Persson, E.; Voznesensky, O. S.; Huang, Y. F. und Lerner, U. H. (2005): Increased expression of interleukin-6 by vasoactive intestinal peptide is associated with regulation of CREB, AP-1 and C/EBP, but not NF-kappaB, in mouse calvarial osteoblasts, *Bone* 37 [4], Seite 513-29.
- Peserico, A. und Simone, C. (2011): Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance, *J Biomed Biotechnol* 2011, Seite 371832.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res* 29 [9], Seite e45.
- Pfenning, A. R.; Kim, T. K.; Spotts, J. M., et al. (2010): Genome-wide identification of calcium-response factor (CaRF) binding sites predicts a role in regulation of neuronal signaling pathways, *PLoS One* 5 [5], Seite e10870.
- Puschner, B. und Schacht, J. (1997): Energy metabolism in cochlear outer hair cells in vitro, *Hear Res* 114 [1-2], Seite 102-6.
- Rajagopalan, L.; Organ-Darling, L. E.; Liu, H., et al. (2010): Glycosylation regulates prestin cellular activity, *J Assoc Res Otolaryngol* 11 [1], Seite 39-51.
- Ramji, D. P. und Foka, P. (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J* 365 [Pt 3], Seite 561-75.
- Raz, Y. und Kelley, M. W. (1997): Effects of retinoid and thyroid receptors during development of the inner ear, *Semin Cell Dev Biol* 8 [3], Seite 257-264.
- Rice, P.; Longden, I. und Bleasby, A. (2000): EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite, *Trends Genet* 16 [6], Seite 276-7.
- Ryan, A. und Dallos, P. (1975): Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold, *Nature* 253 [5486], Seite 44-6.
- Ryan, A. K. und Rosenfeld, M. G. (1997): POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes, *Genes Dev* 11 [10], Seite 1207-25.
- Salvi, R. J.; Wang, J. und Ding, D. (2000): Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage, *Hear Res* 147 [1-2], Seite 261-74.
- Santoro, C.; Mermod, N.; Andrews, P. C. und Tjian, R. (1988): A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs, *Nature* 334 [6179], Seite 218-24.
- Santos-Sacchi, J.; Kakehata, S.; Kikuchi, T.; Katori, Y. und Takasaka, T. (1998): Density of motility-related charge in the outer hair cell of the guinea pig is inversely related to best frequency, *Neurosci Lett* 256 [3], Seite 155-8.
- Sato, M.; Leake, P. A. und Hradek, G. T. (1999): Postnatal development of the organ of Corti in cats: a light microscopic morphometric study, *Hear Res* 127 [1-2], Seite 1-13.
- Schmitz, Michael "shuffleseq", Lawrence Berkeley Labs, USA
- Segal, J. (1990): Calcium is the first messenger for the action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane: first evidence for an acute effect of thyroid hormone on calcium uptake in the heart, *Endocrinology* 126 [5], Seite 2693-702.

- Sellick, P. M.; Patuzzi, R. und Johnstone, B. M. (1982): Measurement of basilar membrane motion in the guinea pig using the Mossbauer technique, *J Acoust Soc Am* 72 [1], Seite 131-41.
- Shago, M. und Giguere, V. (1996): Isolation of a novel retinoic acid-responsive gene by selection of genomic fragments derived from CpG-island-enriched DNA, *Mol Cell Biol* 16 [8], Seite 4337-48.
- Shaywitz, A. J. und Greenberg, M. E. (1999): CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals, *Annu Rev Biochem* 68, Seite 821-61.
- Sheng, M.; Thompson, M. A. und Greenberg, M. E. (1991): CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases, *Science* 252 [5011], Seite 1427-30.
- Singer, W.; Panford-Walsh, R.; Watermann, D., et al. (2008): Salicylate alters the expression of calcium response transcription factor 1 in the cochlea: implications for brain-derived neurotrophic factor transcriptional regulation, *Mol Pharmacol* 73 [4], Seite 1085-91.
- Slattery, E. L.; Speck, J. D. und Warchol, M. E. (2009): Epigenetic influences on sensory regeneration: histone deacetylases regulate supporting cell proliferation in the avian utricle, *J Assoc Res Otolaryngol* 10 [3], Seite 341-53.
- Sobkowicz, H. M.; August, B. K. und Slapnick, S. M. (1997): Cellular interactions as a response to injury in the organ of corti in culture, *International Journal of Developmental Neuroscience* 15 [4-5], Seite 463-485.
- Sobkowicz, H. M.; Bereman, B. und Rose, J. E. (1975): Organotypic development of the organ of Corti in culture, *J Neurocytol* 4 [5], Seite 543-72.
- Sobkowicz, H. M.; Loftus, J. M. und Slapnick, S. M. (1993): Tissue culture of the organ of Corti, *Acta Otolaryngol Suppl* 502, Seite 3-36.
- Strachan, Tom und Read, Andrew P. (2005): *Molekulare Humangenetik*, 3. Auflage, Elsevier, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, ISBN: 3-8274-1493-8.
- Stute, Kerstin (2011): Einflussfaktoren auf die Prestin-Expression im Cortischen Organ der neugeborenen Ratte, Promotion, Humboldt-Universität, Berlin.
- Sun, W.; Choi, S. H.; Park, S. K., et al. (2007): Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons, *J Neurochem* 100 [1], Seite 269-78.
- Tan, X. ; Pecka, J. ; Tang, J., et al. (2010): Identification of the electromotility motif in prestin, the motor protein of cochlear outer hair cells, 47th Inner Ear Biology Workshop, Prague.
- Tan, X.; Pecka, J. L.; Tang, J., et al. (2010): From Zebrafish to Mammal: Functional Evolution of Prestin, the Motor Protein of Cochlear Outer Hair Cells, *J Neurophysiol*.
- Tao, X.; Finkbeiner, S.; Arnold, D. B.; Shaywitz, A. J. und Greenberg, M. E. (1998): Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism, *Neuron* 20 [4], Seite 709-26.
- Tao, X.; West, A. E.; Chen, W. G.; Corfas, G. und Greenberg, M. E. (2002): A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF, *Neuron* 33 [3], Seite 383-95.
- Tardito, D.; Perez, J.; Tiraboschi, E., et al. (2006): Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview, *Pharmacol Rev* 58 [1], Seite 115-34.

- Teek, R.; Oitmaa, E.; Kruustuk, K., et al. (2009): Splice variant IVS2-2A>G in the SLC26A5 (Prestin) gene in five Estonian families with hearing loss, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73 [1], Seite 103-7.
- Tong, Q.; Tsai, J.; Tan, G.; Dalgin, G. und Hotamisligil, G. S. (2005): Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation, *Mol Cell Biol* 25 [2], Seite 706-15.
- Trautwein, C.; van der Geer, P.; Karin, M.; Hunter, T. und Chojkier, M. (1994): Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements, *J Clin Invest* 93 [6], Seite 2554-61.
- Tsankova, N. M.; Kumar, A. und Nestler, E. J. (2004): Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures, *J Neurosci* 24 [24], Seite 5603-10.
- Umesono, K.; Murakami, K. K.; Thompson, C. C. und Evans, R. M. (1991): Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors, *Cell* 65 [7], Seite 1255-66.
- Utesch, D.; Traiser, M.; Gath, I., et al. (1993): Effects of sodium butyrate on DNA content, glutathione S-transferase activities, cell morphology and growth characteristics of rat liver nonparenchymal epithelial cells in vitro, *Carcinogenesis* 14 [3], Seite 457-62.
- Vallejo, M.; Ron, D.; Miller, C. P. und Habener, J. F. (1993): C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [10], Seite 4679-83.
- Vaquerizas, J. M.; Kummerfeld, S. K.; Teichmann, S. A. und Luscombe, N. M. (2009): A census of human transcription factors: function, expression and evolution, *Nat Rev Genet* 10 [4], Seite 252-63.
- Venters, B. J. und Pugh, B. F. (2009): How eukaryotic genes are transcribed, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44 [2-3], Seite 117-41.
- Wang, S.; Zhang, S.; Zhao, B. und Lun, L. (2009): Up-regulation of C/EBP by thyroid hormones: a case demonstrating the vertebrate-like thyroid hormone signaling pathway in amphioxus, *Mol Cell Endocrinol* 313 [1-2], Seite 57-63.
- Wangemann, P. (2002): K⁺ cycling and the endocochlear potential, *Hear Res* 165 [1-2], Seite 1-9.
- Weber, T.; Gopfert, M. C.; Winter, H., et al. (2003): Expression of prestin-homologous solute carrier (SLC26) in auditory organs of nonmammalian vertebrates and insects, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [13], Seite 7690-5.
- Weber, T.; Zimmermann, U.; Winter, H., et al. (2002): Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [5], Seite 2901-6.
- Wegner, M.; Cao, Z. und Rosenfeld, M. G. (1992): Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta, *Science* 256 [5055], Seite 370-3.
- West, A. E.; Griffith, E. C. und Greenberg, M. E. (2002): Regulation of transcription factors by neuronal activity, *Nat Rev Neurosci* 3 [12], Seite 921-31.
- Wierstra, I. (2008): Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes, *Biochem Biophys Res Commun* 372 [1], Seite 1-13.

- Winter, H.; Braig, C.; Zimmermann, U., et al. (2006): Thyroid hormone receptors TR α 1 and TR β differentially regulate gene expression of Kcnq4 and prestin during final differentiation of outer hair cells, *J Cell Sci* 119 [Pt 14], Seite 2975-84.
- Xia, Z. und Storm, D. R. (2002): CaRF: a neuronal transcription factor that CaREs, *Neuron* 33 [3], Seite 315-6.
- Xiang, M.; Gan, L.; Li, D., et al. (1997): Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [17], Seite 9445-50.
- Xiang, M.; Zhou, L.; Macke, J. P., et al. (1995): The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons, *J Neurosci* 15 [7 Pt 1], Seite 4762-85.
- Yang, K.; Huang, Z. W.; Liu, Z. Q.; Xiao, B. K. und Peng, J. H. (2009): Long-term administration of salicylate enhances prestin expression in rat cochlea, *Int J Audiol* 48 [1], Seite 18-23.
- Yi, J. H.; Park, S. W.; Kapadia, R. und Vemuganti, R. (2007): Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage, *Neurochem Int* 50 [7-8], Seite 1014-27.
- Yu, N.; Zhu, M. L.; Johnson, B., et al. (2008): Prestin up-regulation in chronic salicylate (aspirin) administration: an implication of functional dependence of prestin expression, *Cell Mol Life Sci* 65 [15], Seite 2407-18.
- Yu, N.; Zhu, M. L. und Zhao, H. B. (2006): Prestin is expressed on the whole outer hair cell basolateral surface, *Brain Res* 1095 [1], Seite 51-8.
- Yukawa, K.; Tanaka, T.; Tsuji, S. und Akira, S. (1998): Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca²⁺/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons, *J Biol Chem* 273 [47], Seite 31345-51.
- Yun, Y. D.; Dumoulin, M. und Habener, J. F. (1990): DNA-binding and dimerization domains of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-responsive protein CREB reside in the carboxyl-terminal 66 amino acids, *Mol Endocrinol* 4 [6], Seite 931-9.
- Zenner, H. P. (1998): [Systematics for mechanisms of tinnitus development], *HNO* 46 [8], Seite 699-704.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L. und Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol* 7 [1-2], Seite 203-14.
- Zhao, H. B. und Santos-Sacchi, J. (1999): Auditory collusion and a coupled couple of outer hair cells, *Nature* 399 [6734], Seite 359-62.
- Zheng, J.; Long, K. B.; Matsuda, K. B., et al. (2003): Genomic characterization and expression of mouse prestin, the motor protein of outer hair cells, *Mamm Genome* 14 [2], Seite 87-96.
- Zheng, J.; Shen, W.; He, D. Z., et al. (2000): Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells, *Nature* 405 [6783], Seite 149-55.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ÄHZ	äußere Haarzellen
AMPA	Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
Bp	Basenpaar
BRE	Transkriptionsfaktor IIB Erkennungselement
Brn2	POU domain, class 3, transcription factor 2
BSG	Buffered Saline Glucose
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain
C	Cytosin
C/ebpβ	<i>CCAAT/enhancer binding protein beta</i>
Ca ²⁺	Kalzium
Carf	<i>calcium response factor</i>
CBP	CREB-Binding Protein
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Creb	<i>cAMP response element binding protein</i>
CREs	„ <i>cAMP-response elements</i> “
Cys	Cysteine
dB	Dezibel
DCN	Nucleus cochlearis dorsalis
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	relative Einheiten
DRE	abwärtsgelegenen Kernpromotorelement
egr-1	early Growth Response Protein 1
EKR2	extracellular signal-related kinase 2
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>).
et. al	und andere
G	Guanin
GABA	Gammaaminobuttersäure
Gapdh	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylasen
His	Histidin
HZ	Haarzellen
IHZ	innere Haarzellen
Il-	Interleukin-
Inr	Initiator
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
I κ B	Inhibitor of κ B
kB	1000 Basenpaare
kDA	1000 Dalton
kHz	1000 Hertz
KLF	krüppel-like-factor
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	Least significant difference
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MAPKAP	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2
MAPS	Mikrotubuli-assoziierte-Protein-1S
mPrestin	Prestin der Maus
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
n	Anzahl
ns	Nicht signifikant
NCoR-1	nukleärer Rezeptor-Korepressor 1
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLK	nichtlineare Kapazitätanz
NLS	Nuclear localization signal
NT-3	Neurotrophin-3
p	Signifikanz
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PC12	pheochromocytoma-Zellen
PI3 Kinase	Phosphoinositide 3-kinase
PKG	Proteinkinase G
Pou4f3	POU domain, class 4, transcription factor 3
pSer	Phosphoryliertes Serin
PSSM	positionsspezifische Wertungsmatrizen
PT	postnataler Tag
PWS	position

r	Korrelationskoeffizient
RAR	<i>retinoic acid receptors</i> (Retinsäurerezeptoren),
RARE	<i>retinoic acid response elements</i> (Retinsäurebindungselemente)
ras	RAt Sarcoma
RE	relative Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rPrestin	Prestin der Ratte
RREB-1	Ras-responsive element-binding protein 1
RS	Retinsäure
RT-PCR	realtime-polymerasechainreaktion
RXR	<i>Retinoid X</i> Rezeptoren
S.	Seite
Ser	Serin
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
Stabw	Standardabweichung
Std.f.	Standardfehler
T	Thymin
T4	Thyroxin
TAF	Tbp assoziierten Faktoren
Tbp	TATA-box bindenden Protein
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstellen
Thr	Threonin
TNF α	Tumor necrosis factor
TR	Thyroxinrezeptor
TRE	thyroidhormon response elements
TSP	Transkriptionsstartpunkt
UpM	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslatierten Region
vegf	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

- Abb. 1: Querschnitt durch den Schneckengang.** Dargestellt sind die drei Scalae der Cochlea, zentral das Cortische Organ mit den inneren (IHZ) und äußeren Haarzellen (ÄHZ) auf der Basilarmembran liegend, (links) der Limbus spiralis und (rechts) die Stria vascularis (Aus Benninghoff und Drenckhahn, 2004 S.726, mit freundlicher Genehmigung).....2
- Abb. 2: Verteilung der Kaliumkonzentration im Cortischen Organ.** Dargestellt sind die Konzentrationen von Kalium in der Endolympe, Perilymphe sowie der Transport und Verlauf des Kaliums (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).3
- Abb. 3: Core-Promotor von Prestin der Ratte.** Dargestellt ist die 5'-UTR von Prestin (Ratte) im Bereich von -250 bis -168 Bp vor ATG mit den Elementen des Core-Promotors nach Butler und Kadonaga (2002). BRE – “*TFIIB recognition element*” [Transkriptionsfaktor IIB Erkennungselement], TATA - Box, Inr – „Initiator“ [Initiator], DRE – „*downstream core promotor element*“ [abwärtsgelegene Kernpromotorelement]. Nach Butler und Kadonaga (2002) auf die 5'-UTR von Prestin (Ratte) angewandt.....8
- Abb. 4: Haarzellfärbung mit Phalloidin.** Angefärbt sind die hufeneisenförmig aufgereihten Stereozillien der drei Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ) und der einen Reihe innerer Haarzellen (IHZ). Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 10 µM.26
- Abb. 5: *in silico* DNA-Analyseprogramm MochiView 1.45 (Homann und Johnson, 2010).** Dargestellt ist die Promotorregion von Prestin (Ratte). Angezeigt wird die Bindungswahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktoren an dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt.....34
- Abb. 6: Veränderung des Kalibratormesswertes jedes Gens im Verlauf der Bearbeitungsserien.** In der Abbildung dargestellt ist die fortlaufende Bestimmung der bei jeder Reaktionsserie mitgeführten Kalibratorprobe für die jeweilig bestimmten Gene. In Klammern zu jedem Gen angegeben ist die Gleichung der Regressionsgraden sowie der Korrelationseffizient: A) Tbp ($y = -0,0085x + 22,19$, $R = 0,25$), C/ebp-b ($y = 0,0016x + 27,034$, $R = 0,02$), Carf ($y = 0,013x + 25,546$, $R = 0,18$) und Creb1a ($y = 0,012x + 22,98$, $R = 0,17$). B) Prestin ($y = 0,005x + 24,96$, $R = 0,10$), Pou4f3 ($y = 0,003x + 24,37$) und Sp1 ($y = 0,039x + 22,10$, $R = 0,24$).....38
- Abb. 7: Korrelation der relativen Prestin-Expression aus den von Kerstin Stute (2011) verwendeten Proben mit der in dieser Arbeit durchgeführten Neubestimmung dieser Proben.** Prestin jeweils bezogen auf Tbp. Es besteht eine enge, hochsignifikante Korrelation zwischen beiden Bestimmungen ($R = 0,91$ $p < 0,0001$, $n = 84$). Unterschiede der absoluten Werte resultieren aus der Verwendung unterschiedlicher Kalibratorproben in beiden Bestimmungen.39
- Abb. 8: Präparation des Cortischen Organs, Aufteilung in die Segmente und Darstellung der Haarzellen je Segment.** Innenohr einer Ratte, postnataler Tag 5; A) häutiges Labyrinth aus der knöchernen Kapsel gelöst. B) Separieren von Cortischem Organ (links) sowie Stria vascularis und Modiolus (rechts) C) nach Segmenten aufgeteiltes Cortisches Organ; Darstellung der Haarzellen des apikalen (D), medialen (E) und basalen (F) Segments (Gross et al., 2011).40
- Abb. 9: Anzahl der äußeren Haarzellen im apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segment 5 Tage alter Ratten.** Dargestellt sind Mittelwerte \pm Stdf. $\#p < 0,05$ (LSD) vs. apikal ($n = 5$). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe einer Okularstrichplatte (200 Stricheinheiten = 2 mm) und einem Objektmikrometer. Dazu wurden (1) die HZ/100 µm und (2) die Länge des Segments gemessen, um (3) daraus die Anzahl der Haarzellen pro Segment zu berechnen.41

- Abb. 10: Veränderung der Gesamt-RNA pro Segment und mRNA-Expression von Tbp während der postnatalen Entwicklung.** Apikale (a), mediale (m) und basale (b) Segmente wurden zur Signifikanzberechnung zusammengefasst. Dargestellt sind Mittelwert \pm Stdf., PT – postnataler Tag, $^*p < 0,0001$ (Tbp) PT5 vs. PT2; $^*p < 0,0001$ (Tbp) PT8 vs. PT5; $^*p < 0,006$ (RNA), PT8 vs. PT2 (Scheffé); $^{\#}p < 0,01$ (LSD) basal vs. PT8 apikal oder medial, jeweils $n = 6$, zusammen $n = 18$42
- Abb. 11: Veränderung der Expression von Prestin und Pou4f3 im apikalen, medialen und basalen Segment während der postnatalen Entwicklung.** Ergebnisse dargestellt in Bezug auf Gesamt-RNA und Tbp als Mittelwert \pm Stdf., Abkürzung siehe Abb. 10. Signifikanzen sind gültig in beiden Referenzsystemen. Prestin: $p^{*1} < 0.007$ versus PT2, $^*p < 0.0001$ vs. PT5, $^{\#}p < 0.002$ vs. apikal, Pou4f3: $^*p < 0.008$ vs. PT5, $^{\#}p < 0.02$ vs. apikal.....44
- Abb. 12: Veränderung der Expression von C/ebp β und Sp1 im apikalen, medialen und basalen Segment während der postnatalen Entwicklung.** mRNA-Expression in Bezug auf Gesamt-RNA und Tbp dargestellt als Mittelwert \pm Stdf.. Abkürzung siehe Abb. 10. Signifikanzen sind gültig in beiden Referenzsystemen. $^*p < 0.02$ vs. PT2, (apikalen und mittlere Segmente, Scheffé), $^{\#}p < 0.008$ vs. apikal PT8 (LSD), $^*p < 0.0001$ vs. PT2 (alle Segmente), $n = 6$45
- Abb. 13: Veränderung der Expression von Carf und Creb1a im apikalen, medialen und basalen Segment während der postnatalen Entwicklung.** Abkürzung siehe Abb. 10. Es kommt zu keinen signifikanten Veränderungen.....46
- Abb. 14: Veränderung der RNA und Tbp-Expression in den apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segmenten des Cortischen Organs in der organotypischen 48h-Kultur.** Für die Signifikanzberechnung wurden die Segmente zusammengefasst. $^*p < 0,006$ (LSD) vs. Kontrolle (RNA), Tbp n. s., ($n = 7$ jeweils).....48
- Abb. 15: Veränderung der Expression von Prestin und Pou4f3 in der organotypischen 48h-Kultur im apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segment.** Angegeben ist sowohl der Bezug auf Gesamt-RNA und auf Tbp mRNA als Mittelwert \pm Stdf.. (A) Prestin: $^*p < 0,002$ (Scheffé) vs. apikal Kontrolle, $^*p < 0,03$ (LSD) vs. medial Kontrolle, basal Kultur vs. Kontrolle ($p = n. s.$), (B) Pou4f3: es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. ($n = 6$ jeweils).49
- Abb. 16: Expression der Transkriptionsfaktoren C/ebp β (A), Sp1 (B), Carf (C) und Creb1a (D) in der organotypischen 48h-Kultur (PT3-5).** Dargestellt sind die Expression der Transkriptionsfaktoren, bezogen auf die Gesamt-RNA und auf das Referenzgen Tbp als Mittelwert \pm Stdf. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die Segmente bei C/ebp β und Sp1 zusammengefasst. (A) $^{\#}p < 0,04$ (Scheffé) vs. Kontrolle Tbp, Kultur vs. Kontrolle RNA ($p = n. s.$), ($n = 6$ jeweils); (B) $^*p = 0,03$ (Scheffé) vs. Kontrolle RNA, $^*p = 0,08$ (LSD) vs. Kontrolle Tbp; (C) und (D) keine signifikanten Veränderungen.50
- Abb. 17: Die Wirkung von 0,5 μ M T4 auf die Entwicklung des RNA-Gehaltes und der Tbp-Expression in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.** Werte angegeben als Mittelwert \pm Stdf.. Für die Signifikanzberechnung wurden die jeweiligen Segmente zusammengefasst. Abkürzung siehe Abb. 10. Es ergeben sich keine signifikanten Veränderungen ($n = 4$ je Segment).51
- Abb. 18: Expression von Prestin und der untersuchten TF unter Zugabe von 0,5 μ M T4 in der organotypischen 48h-Kultur postnataler Ratten.** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stdf. als relative Veränderungen, bezogen auf die Kontrollgruppe, getrennt nach apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segmenten. In die Berechnung wurden die Veränderungen in beiden Bezugssystemen einbezogen mind. $n = 7$ jeweils; $^*p < 0.05$ (Wilcoxon Paar Test).52

- Abb. 19: Verhalten von (A) Gesamt-RNA und (B) Tbp bei Zugabe von steigenden Dosierungen Natriumbutyrate.** NB - mit Natriumbutyrate behandelte Kulturen, Kontrolle – dazugehörige Kontrollgruppen. Apikale, mediale und basale Segmente in der Darstellung zusammengefasst. (A) ^{#1}p mind. < 0,02 (LSD) je Konzentration: Kontrolle vs. NB. (B) *¹p < 0,01 (LSD) 2000 µM NB vs. Kontrolle. (n = 18 jeweils).....53
- Abb. 20: Einfluss von Natriumbutyrate auf die relativen Veränderungen der Expression von Prestin und Pou4f3 im apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segment.** Die Werte von 500 - 2000 µM wurden für die Signifikanzberechnung zusammengefasst. (n = 10 - 12 je Segment). Prestin: apikal *¹p < 0,05, medial *¹p < 0,01, basal *¹p < 0,02, Pou4f3: apikal *²p < 0,0001, medial *²p < 0,0001, basal *²p < 0,0001. (Wilcoxon-Test).....54
- Abb. 21: Entwicklung der Gesamt-RNA pro Segment und der Tbp-Expression in einer 48h-Kultur unter Zugabe von 50 mM KCl.** Dargestellt sind Mittelwerte ± Stdf. der jeweiligen Segmente (n = 6 jeweils). Für die Signifikanzberechnung wurden die Segmente zusammengefasst. *¹p < 0,001 (Scheffé): RNA der Kultur vs. RNA der Kontrollen. (n = 3-4 Kultur).....55
- Abb. 22: Veränderung der Expression von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren in der organotypischen Kultur unter Zusatz von 50 mM KCl.** Dargestellt sind die relativen Expressionsveränderungen der untersuchten Gene als Mittelwert ± Stdf. Die relativen Veränderungen in Bezug auf die Gesamt-RNA und Tbp wurden in der Darstellung zusammengefasst. *p mindestens < 0,05, n = 6 (Wilcoxon-Test).....56
- Abb. 23: Veränderung der Gesamt-RNA (A) und von Tbp (B) in Abhängigkeit steigender Dosierungen von Retinsäure (RS) in der organotypischen Kultur.** Dargestellt sind die behandelten Gruppen (RS) mit den dazugehörigen Kontrollen (Kontrolle). Es kommt zu keinen signifikanten Veränderungen.....57
- Abb. 24: Verhalten der Expression von Prestin, Pou4f3 und C/ebpβ in der 48h-Kultur unter steigender Dosierung von RS.** Dargestellt ist Mittelwert ± Stdf. der relativen Expressionsveränderung der apikalen (a), medialen (m) und basalen (b) Segmente. Bei Pou4f3 wurden 50 µM und 100 µM für die Signifikanzberechnung zusammengefasst *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, (n = 16 - 18 jeweils).....57
- Abb. 25: Verhalten der Transkriptionsfaktoren Sp1, Carf und Creb1a in der organotypischen Kultur unter 50 und 100 µM Retinsäure (RS).** Dargestellt sind Mittelwert ± Stdf. der relativen Expressionsveränderungen. Die Veränderungen bezogen auf Gesamt-RNA und Tbp wurden zusammengefasst. Keine signifikanten Veränderungen (n = 12 - 14).....58
- Abb. 26: Genexpressionsdiagramm.** Das Diagramm zeigt die Expression der in dieser Studie untersuchten Gene. Es sind die Mittelwerte der folgenden Gruppen dargestellt (jeweils apikal, medial, basal): PT2, PT5, PT8; Kultur, T4, NB, KCl, RS (jeweils Kontrolle und experimentelle Gruppe). Korrelationskoeffizient (R): Prestin (0,83), Pou4f3 (0,65), C/ebpβ (0,91), Sp1 (0,69), Carf (0,79). Alle Korrelationen sind signifikant mit (p < 0,01 n = 27). Creb (0,36) n. s. (n = 27 jeweils, außer Gata3: n = 9).....60
- Abb. 27: Veränderung der Gesamt-RNA pro Segment und der Tbp-Expression während der postnatalen Entwicklung im apikalen, medialen und basalen Segment des Innenohrs postnataler Ratten, getrennt nach (A) Cortischem Organ und (B) Limbus.** Abkürzung siehe Abb. 10. Für die Signifikanzberechnung wurden die Segmente eines postnatalen Tages zusammengefasst. A) *¹p < 0,01 (LSD) vs. RNA PT5, ^{#1}p = 0,02 (LSD) vs. Tbp PT5. B) *¹p < 0,001 (Scheffé) PT8 vs. PT2 Tbp, (n = 6 je Segment).....62
- Abb. 28: Verteilung von Gata3 und Pou4f3 zwischen Cortischem Organ und Limbus am PT2, PT5 und PT8.** Dargestellt sind Mittelwert ± Stdf., Expression bezogen auf Gesamt-RNA. p^{#1}

< 0,02 (LSD): Gata3 PT2 vs. PT8, $p^{#2} < 0,03$ (LSD): Pou4f3 PT2 vs. PT8, $*^1p < 0,008$ (Scheffé): Gata3 - Limbus vs. Corti an jedem PT, $*^2p < 0,00001$ (Scheffé): Pou4f3 - Limbus vs. Corti (an jedem PT). (Corti: mindestens n = 18, Limbus: n = 12).	63
Abb. 29: Expression der Transkriptionsfaktoren Sp1, C/ebpβ, Carf und Creb1a im Cortischen Organ und Limbus des Innenohrs in der postnatalen Entwicklung. PT-postnataler Tag (A) C/ebp β : $*^1p < 0,001$ - Corti vs. Limbus (an jedem PT), (B) SP1: $*^2p < 0,0001$ - Corti PT2 vs. PT8, $*^3p < 0,004$ - Limbus PT2 vs. PT8, (C) Carf: $*^4p < 0,0001$ - Corti PT2 vs. PT8, $*^5p < 0,04$ - Limbus PT2 vs. PT8, (D) Creb1a: $*^6p < 0,001$ - Corti PT5 vs. PT8, $*^7p < 0,01$ - Limbus PT2 vs. PT8 (Corti: n = 24; Limbus: n = 12).	64
Abb. 30: Verhalten von Volumen und Zelloberfläche der äußeren Haarzellen in der postnatalen Entwicklung von Katzen. Dargestellt sind getrennt nach apikalem, medialem und basalem Segment für die postnatalen Tage 2, 5 und 8 die errechneten Werte für Volumen und Zelloberfläche. Basisdaten für die Berechnung entnommen aus (Sato et al., 1999). Volumen berechnet nach: $V = \text{Zelldurchmesser}^2 \times \pi \times \text{Zellhöhe}$ und Manteloberfläche nach: $A(\text{Mantel}) = \pi \times \text{Zelldurchmesser} \times \text{Zellhöhe}$ (Berechnungsmodell eines Zylinders).	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer der in dieser Untersuchung verwendeten Gene	22
Tabelle 2: Parameter der RT-PCR nach Primeroptimierung.....	30
Tabelle 3: Promotorbereiche Prestin Ratte	33
Tabelle 4: Konsensussequenzen der untersuchten Transkriptionsfaktoren	35
Tabelle 5: Methodische Varianz der RT-PCR	37
Tabelle 6: Haarzellichte im Frischpräparat.....	41
Tabelle 7: Anzahl intakter Haarzellen unter verschiedenen Bedingungen	47
Tabelle 8: Korrelation von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren	59
Tabelle 9: Zusammenfassung der Verteilung der Transkriptionsfaktorexpression zwischen Cortischem Organ und Limbus	64
Tabelle 10: Überschlagsrechnung zur Bestimmung des Prestin mRNA Gehaltes pro Haarzelle.....	69
Tabelle 11: Auftreten vorhergesagter Bindungsstellen in den Promotorregionen von Prestin	79
Tabelle 12: Bindungsstellen von Pou4f3, C/ebp β und Carf in der Promotorregion von Prestin.....	80

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Maximilian Angerstein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genexpressionsmuster von Prestin und ausgewählten Transkriptionsfaktoren im Cortischen Organ postnataler Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Potsdam, Mai 2012

Maximilian Angerstein

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen meinen Dank aussprechen, die mich während der Entstehung dieser Arbeit so vielseitig unterstützt haben.

Frau PD. Dr. med. B. Mazurek danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, für ihr Vertrauen und ihre Geduld, die sie mir während der Zeit der Entstehung entgegengebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt Prof. J. Gross für die interessante Themengestaltung, die stete Förderung dieser Arbeit und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Ich danke den Kollegen und Mitarbeitern des molekularbiologischen Forschungslabors für die vielfältige Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Frau Nyamaa Amarjargal und Frau Julia Fuchs für die Durchführung der Feinpräparationsarbeiten und Frau Astrid Machulik für die fundierte Anleitung und Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken.

Meiner Vorgängerin Frau Kerstin Stute danke ich für das Überlassen der präparierten Kulturproben zu weiteren Analyse.

Martina Herzog danke ich für ihre kompetente Hilfe bezüglich der orthographischen Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Eltern und meinen Freunden danke ich für die vielfältige Unterstützung, Motivation und das immer dargebrachte Verständnis während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner geliebten Frau Annika, die mit mir gemeinsam das Medizinstudium und die parallele Entstehung der Promotion zusammen durchgestanden hat und mir immerwährend Kraft und Liebe war.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Gross, J., **M. Angerstein**, J. Fuchs, K. Stute and B. Mazurek (2011). "Expression Analysis of Prestin and Selected Transcription Factors in Newborn Rats." Cell Mol Neurobiol.

Gross, J., K. Stute, J. Fuchs, **M. Angerstein**, N. Amarjargal and B. Mazurek (2011). "Effects of retinoic acid and butyric acid on the expression of prestin and Gata-3 in organotypic cultures of the organ of Corti of newborn rats." Dev Neurobiol.

Gross, J., K. Stute, R. Moller, J. Fuchs, N. Amarjargal, E. E. Pohl, **M. Angerstein**, A. Smorodchenko and B. Mazurek (2010). "Expression of prestin and Gata-3,-2,-1 mRNA in the rat organ of Corti during the postnatal period and in culture." Hear Res **261**(1-2): 9-21.

Mazurek, B., J. Fuchs, K. Stute, **M. Angerstein**, N. Amarjargal, H. Olze and J. Gross (2011). "Decrease of prestin expression by increased potassium concentration in organotypic cultures of the organ of Corti of newborn rats." Neurosci Lett.

Poster

Gross, J., **M. Angerstein**, et al. (2010). Expression analysis of prestin and selected transcription factors in newborn rats. 47th Inner Ear Biology Workshop. Prague, Czech Republic.