

Aus dem Tinnituszentrum und dem Molekularbiologischen  
Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik  
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Mechanismen der Zytokin- und Ubichinon-  
induzierten Otoprotektion gegenüber Cisplatin**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisabeth Freutel, geb. Gerschner

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

# Inhaltsverzeichnis

1	Kurzzusammenfassung.....	5
2	Abstract .....	7
3	Einleitung .....	9
3.1	Anatomie des Innenohres .....	9
3.1.1	Cochlea.....	9
3.1.2	Cortisches Organ .....	10
3.1.3	Neuroanatomie des Innenohres .....	11
3.2	Physiologie des Innenohres .....	12
3.3	Pathophysiologie der Cochlea und des Hörens – Ein Ausschnitt.....	14
3.4	Cisplatin.....	15
3.4.1	Cisplatin-induzierte Ototoxizität.....	15
3.5	Zytokine der Interleukin-6-Familie .....	16
3.5.1	Interleukin-6 .....	17
3.5.2	Oncostatin M.....	18
3.6	Ubichinon .....	19
3.7	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 .....	20
3.8	Apoptoseregulation – Ein Ausschnitt.....	21
3.9	Herleitung der Aufgabenstellung.....	22
4	Material und Methoden .....	25
4.1	Explantation und Kultur der OCs .....	25
4.2	Behandlung der Explantate.....	26
4.2.1	Cisplatin .....	26
4.2.2	IL-6.....	27
4.2.3	OSM .....	27
4.2.4	Ubichinon .....	27

4.2.5	STAT3 Inhibitor III WP 1066.....	28
4.3	Western Blotting.....	28
4.3.1	Proteinextraktion der Explantate.....	28
4.3.2	Ermittlung der Proteinkonzentrationen und Anfertigung der Arbeitslösungen .....	29
4.3.3	Elektrophorese, Blotting, Blocking und Antikörperinkubationen .....	30
4.3.4	Entwicklung und Auswertung.....	32
4.4	Fluoreszenzfärbung, Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	32
4.4.1	Fixation und Fluoreszenzfärbung.....	32
4.4.2	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	33
4.5	Statistik.....	34
5	Ergebnisse .....	35
5.1	Einfluss der Zytokine und des Ubichinons auf Cisplatin-induzierte Ototoxizität .....	35
5.2	Einfluss der Inhibition der Zytokin-induzierten Signalkaskade auf die Protektion gegenüber Cisplatin-induzierter Ototoxizität.....	43
5.3	Einfluss des STAT3-Inhibitor III auf Ubichinon-induzierte Otoprotektion gegenüber Cisplatin .....	51
5.4	Effekt des IL-6 und OSM auf die Menge von STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung im OC.....	59
5.4.1	Effekt des IL-6 auf die Menge von STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung im zytoplasmatischen Kompartiment der OCs .....	59
5.4.2	Effekt des IL-6 auf die nukleäre Translokation des STAT3 und die STAT3 -Phosphorylierung.....	61
5.4.3	Effekt des OSM auf die Menge von STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung im zytoplasmatischen Kompartiment der OCs .....	63
5.4.4	Effekt des OSM auf die nukleäre Translokation des STAT3 und die STAT3 -Phosphorylierung.....	65
5.5	Effekt der Zytokine und des Ubichinons auf die Proteinexpression Apoptose-regulierender Faktoren .....	67
6	Diskussion .....	71

6.1	Einleitung.....	71
6.2	Limitationen der vorliegenden Arbeit .....	71
6.3	Interpretation der Ergebnisse und Literaturvergleich.....	72
6.3.1	Effekte der Zytokine und des Ubichinons auf die Strukturen des OCs im Rahmen Cisplatin-induzierter Ototoxizität.....	72
6.3.2	STAT3: Änderung der subzellulären Lokalisation und der Phosphorylierung als Antwort auf extrazelluläre Stimuli.....	89
6.3.3	Beziehung zu Spiegeländerungen Apoptose-regulierender Proteine .....	91
6.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	93
7	Schriftenverzeichnis .....	97
	Eidesstattliche Versicherung .....	104
	Lebenslauf .....	105
	Danksagung.....	109

# 1 Kurzzusammenfassung

Als Nebenwirkung des Zytostatikums Cisplatin wurde neben Neuro- und Nephrotoxizität auch Ototoxizität beschrieben. Die Schädigung ist irreversibel und führt zu Tinnitus sowie Hörverlust und damit zu kommunikativen Einbußen oder Entwicklungsdefiziten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, otoprotektive Substanzen zu identifizieren und zugrunde liegende Signalkaskaden zu charakterisieren. Für das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) konnte *in vitro* bereits limitiertes otoprotektives Potential beschrieben werden. Neben den Charakteristika der IL-6 vermittelten Protektion soll das protektive Potential des IL-6-Verwandten Oncostatin M (OSM) untersucht werden. Weiterhin soll der Einfluss von Signalmolekülen wie des Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), der durch beide Zytokine aktiviert wird, untersucht werden. Als Ursache Cisplatin-induzierter Schäden werden erhöhte Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert, deshalb wird das otoprotektive Potential des antioxidativen Ubichinon sowie die Rolle des STAT3, das auch mitochondriale Funktionen aufweist, untersucht. Darüber hinaus wird der Einfluss des IL-6, OSM und Ubichinon auf die Apoptoseregulation untersucht.

Explantate Corti'scher Organe neonataler Ratten wurden für 24h mit IL-6, OSM oder bzw. simultan mit Ubichinon prä- und für weitere 24h simultan mit Cisplatin inkubiert. Haarzellen und Neuronenfortsätze wurden fluoreszenz-markiert, morphologisch evaluiert und quantifiziert. Andere Explantate wurden parallel zu IL-6, OSM und Ubichinon mit dem STAT3 Inhibitor WP1066 kultiviert, im Anschluss gleichermaßen weiterbehandelt und ausgewertet. Zudem wurden durch die Behandlungen induzierte Protein-Spiegeländerungen mittels Western Blot untersucht: STAT3, seine Serin- und Tyrosin-phosphorylierte Form wurden im Nukleus und Zytoplasma analysiert. BCL-X, BCL-2, AIF, Survivin und Bax wurden im Zytoplasma untersucht. Gruppen wurden mittels Rangsummen-ANOVA auf Unterschiede geprüft, diese wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der *p*-Wert 0,05 unterschritt.

IL-6, OSM und Ubichinon schützen beide Haarzelltypen statistisch signifikant vor Cisplatin-induzierter Toxizität entlang der gesamten Cochlea. Ubichinon schützt die Neuronenfortsätze statistisch signifikant entlang des gesamten Corti'schen Organs, die Zytokine limitiert auf einzelne Abschnitte. Die IL-6- und OSM-induzierte Otoprotektion wurde durch WP1066 aufgehoben, die durch Ubichinon-induzierte nicht. Durch IL-6-Behandlung stieg Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 im Zytoplasma statistisch signifikant, durch OSM-Behandlung stiegen zytoplasmatisches und nukleäres, Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 sowie zytoplasmatisches, Serin-phosphoryliertes STAT3 statistisch signifikant. Die Apoptose-regulierenden Proteine zeigten durch die Behandlung keine signifikanten Spiegeländerungen.

Mitglieder der IL-6-Zytokin-Familie weisen neben ihren proinflammatorischen Funktionen otoprotektives Potential auf, das durch Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 vermittelt wird. Ubichinon wirkt ebenfalls otoprotektiv, eine Beteiligung des STAT3 abseits seiner klassischen Rolle als Transkriptionsfaktor kann nicht ausgeschlossen werden. Die Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind limitiert, dennoch stellt die vorliegende *in vitro* Studie einen Baustein auf dem Weg zum Design eines klinisch-protectiven Protokolls für betroffene Patienten dar und ermöglicht die Ableitung neuer wissenschaftlicher Fragenstellungen.

## 2 Abstract

Cisplatin, a chemotherapeutic drug, can cause neuro-, nephro- and ototoxic side effects. Cisplatin-induced ototoxicity is irreversible and leads to hearing loss and tinnitus, resulting in loss of communicative skills. The aim of this study was to identify otoprotective agents and to reveal protective signaling pathways. Cytokine interleukin-6 (IL-6) is known to exert limited otoprotective potential *in vitro*. Next to further characterizing this protection it was to be determined, if oncostatin M (OSM), a close relative of IL-6, also induces otoprotection. Both cytokines are known to activate Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-3 (STAT3), and the role of STAT3 in otoprotection was going to be investigated. Cisplatin-induced toxicity is said to be mediated via upregulation of reactive oxygen species (ROS), therefore otoprotective potential of antioxidant ubiquinone is going to be analyzed, as well as the role of STAT3 in this context, which is known to exert functions in mitochondria next to its classic role as a transcription factor. Furthermore, the influence of IL-6, OSM and ubiquinone on the regulation of apoptosis is going to be investigated.

Organ of Corti explants dissected from neonatal rats were preincubated for 24h with either IL-6, OSM or ubiquinone, followed by concurrent incubation with cisplatin for another 24h. Hair cells and spiral ganglion neurons were visualized with immunofluorescence, the morphology and amount were evaluated. In other experiments, the explants were simultaneously incubated with STAT3 inhibitor WP1066 and then evaluated as above. Changes in the target protein levels following the treatment were investigated *via* Western blot: Total levels of STAT3 and its serine- or tyrosine-phosphorylated forms were analyzed in cytoplasmic and nuclear fractions of explant tissues. Levels of BCL-x, BCL-2, AIF, survivin and Bax were investigated in the cytoplasm. Treatment groups were examined for significant differences via ANOVA on ranks, differences were considered as significant when  $p$  was below 0.05.

IL-6, OSM and ubiquinone significantly protect both hair cell types from the cisplatin-induced toxicity along the whole length of the cochlea. Ubiquinone significantly protects neurites along the whole cochlea whereas the cytokine-induced protection was limited to certain parts of the organ of Corti. Cytokine-mediated protection was abolished by WP1066, whereas ubiquinone-induced protection was not. Tyrosine-phosphorylated STAT3 increased significantly in the cytoplasm following IL-6 treatment or OSM treatment. OSM induced additional increase of nuclear translocation and of serine-phosphorylation. There were no significant changes in the level of apoptosis-regulating proteins in response to the cytokines or ubiquinone.

IL-6-cytokine-family members and Ubiquinone induce otoprotective mechanisms. The

mechanisms involve phosphorylation of STAT3 on one or two domains and in case of IL-6 and OSM can be blocked by STAT3 inhibitor WP1066. The mechanism induced by Ubiquinone seems to be insensitive to WP1066, suggesting involvement of other than JAK2 kinase.

This study is an attempt toward designing a novel clinical protocol for patients scheduled to chemotherapy involving cisplatin. In addition, it allows to pose new scientific questions.

## 3 Einleitung

### 3.1 Anatomie des Innenohres

Tief im Felsenbein liegt das Innenohr, das sich aus einem komplexen membranösen Schlauchsystem, dem häutigen Labyrinth, und einem seiner Morphologie angepassten, aber größerem, knöchernen Labyrinth zusammensetzt<sup>1</sup>. Das häutige Labyrinth ist mit einer hinsichtlich der Ionenkonzentration außergewöhnlichen Flüssigkeit, der Endolymphe, gefüllt, der Zwischenraum zwischen den beiden Labyrinth ist hingegen mit der sogenannten Perilymphe gefüllt<sup>1</sup>. Ein Bestandteil des häutigen Labyrinths stellt das vestibuläre Labyrinth dar, das mit dem Vestibularorgan das Sinnesepithel des Gleichgewichtsorgans enthält und über den *Ductus reuniens* mit dem zweiten Bestandteil, dem cochleären Labyrinth, verbunden ist<sup>1</sup>. Das cochleäre Labyrinth beherbergt das Sinnesepithel des Gehörorgans<sup>1</sup>.

#### 3.1.1 Cochlea

Die *Cochlea* windet sich zweieinhalb Mal um eine als *Modiolus* bezeichnete Achse und lässt sich in drei Flüssigkeits-gefüllte Räume untergliedern: Die beiden äußeren Kompartimente sind jeweils mit Perilymphe gefüllt und stehen über das *Helicotrema* an der Spitze der *Cochlea* miteinander in Verbindung<sup>1</sup>. Das obere Kompartiment bezeichnet man als *Scala vestibuli*, das untere als *Scala tympani*, zentral von beiden umschlossen befindet sich der mit Endolymphe gefüllte *Ductus cochlearis*<sup>1</sup>. Die *Scala vestibuli* endet am ovalen Fenster, das die membranöse Grenze zur Paukenhöhle bildet und mit der Fußplatte des *Stapes* beweglich verbunden ist, das runde Fenster bildet die häutige Barriere zwischen *Scala tympani* und Paukenhöhle<sup>2</sup>. Schneidet man die *Cochlea* senkrecht zum *Ductus cochlearis* durch, blickt man auf ein Dreieck, das mit seiner Spitze auf den *Modiolus* gerichtet ist und von den benachbarten Räumen und ihrer Perilymph-Füllung durch *Tight junctions* der Epithelauskleidung abgegrenzt wird<sup>1</sup>. Nach oben hin wird der *Ductus cochlearis* von der dünnen Reissner-Membran abgegrenzt, die untere Grenze bilden die Basilarmembran und die *Laminae spirales osseae*, bei denen es sich um zwei vom *Modiolus* entspringende und durch die ganze *Cochlea* schneckenartig gewundene Knochenlamellen handelt<sup>1,3</sup>. Zwischen den beiden Knochenplatten verlaufen Nervenfasern in Richtung *Corti-Organ*, zudem befindet sich dort der *Limbus spiralis*, dessen bindegewebiges Grundgerüst von Interdentalzellen umhüllt ist, die das Grundmaterial der Tektorialmembran produzieren<sup>1,3</sup>. Die Basilarmembran besteht aus verflochtenen Kollagenfibrillen in einem Bett aus Extrazellulärmatrix, sie bildet eine Brücke zwischen dem *Limbus* und der *Christa spiralis* und verbreitert sich

von apikal nach basal, was für Signaltransduktion von Bedeutung ist <sup>1</sup>. Die äußere seitliche Abgrenzung stellt das *Ligamentum spirale* dar, dessen Grundstock eine mit Fibrozyten ummantelte Bindegewebsschicht darstellt, die wiederum mit Epithel bedeckt ist und durch Erhebungen namens *Christa* und *Prominentia spiralis* ausgeworfen wird: Zwischen der *Prominentia spiralis* und dem Beginn der Reissner Membran erstreckt sich ein funktionell auf die Produktion der Endolymphe spezialisiertes Epithel namens *Stria vascularis* <sup>1</sup>. Es handelt sich um eine kapillarreiche Schichtung dreier verschiedener Zelltypen namens Marginal-, Intermediär- und Basalzellen: Die Marginalzellen sind durch *Tight junctions* fest gegenüber der Endolymphe abgegrenzt und enthalten in basolateralen Fältelungen zahlreiche Mitochondrien, die Basalzellen bilden durch ähnliche Haftkontakte eine geschlossene Grenze nach basal, zwischen beiden Zelltypen verteilen sich die lose angeordneten Ausläufer der Melanozyten-artigen Intermediärzellen <sup>1</sup>. Die Marginalzellen sezernieren das Kalium in die Endolymphe und werden selbst durch einen komplexen Rezirkulationsweg mit dem funktionell bedeutsamen Kation ausgestattet: Sowohl „alle Stütz- und Epithelzellen des Corti-Organs“ als auch die „Fibrozyten des *Ligamentum spirale*, Basal- und Intermediärzellen der *Stria*“ sind über *Gap junctions* aus Connexin 26 jeweils als Kette zur Kalium-Rezirkulation miteinander verbunden und werden dank des Mitochondrien-Reichtums der Marginalzellen und Fibrozyten und ihrer sehr guten Ausstattung mit Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasen und Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Co-Transportern aktiv mit Kalium durchpumpt <sup>1</sup>.

### 3.1.2 Cortisches Organ

Mittig auf der Basilarmembran befindet sich eine Erhebung, die aus einer komplizierten Anordnung von Stütz- und Sinneszellen besteht: das Cortische Organ (OC) <sup>1</sup>. Das Dach über diesem Zellsystem bildet die Tektorialmembran, die sich vom *Limbus spiralis* entspringend über das OC erstreckt und aus „dünnen Filamenten und amorphem Material, biochemisch aus mehreren Typen von Kollagen [...], verschiedenen anderen Proteinen und Glykoproteinen“ besteht <sup>1</sup>. Das OC weist viele verschiedene Subtypen an Stützzellen, denen ein festes Zytoskelett aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli gemein ist, auf: Die Grenz-, Claudius- und Hensen-Zellen bilden, gemeinsam mit den Boettcher-Zellen der basalen Windung, die Grundstruktur des OCs und die Pfeilerzellen formieren den inneren Tunnel <sup>1</sup>. Die Phalangenzellen, deren äußere Vertreter auch Deiters-Zellen genannt werden, bilden lange Ausläufer die sich nach apikal hin zu horizontalen Platten umformen und eine netzartige Schicht, die *Membrana reticularis*, formieren, in der die äußeren Haarzellen eingebettet liegen <sup>1</sup>. Aus diesem Netz von Kopfplatten schauen lediglich die Haarschöpfe der Haarzellen heraus, diese sind mit den Stützzellen durch Zell-Zell-Haftkontakte

so fest miteinander verbunden, dass das System nicht nur mechanische Stabilität aufweist, sondern darüber hinaus eine undurchdringliche Barriere der Corti-Lymphe gegenüber der Endolymphe bildet und die funktionell bedeutsamen Ionen-Gradienten zwischen den Kompartimenten aufrecht erhält<sup>1</sup>. Das OC wird von Hohlräumen wie dem äußeren Tunnel, dem Nuel-Raum und dem inneren Tunnel durchzogen, die untereinander in Verbindung stehen<sup>1</sup>. Die eigentlichen Sinneszellen des OC bezeichnet man aufgrund ihres apikalen Sterozilienbesatzes als Haarzellen, man unterscheidet eine Reihe innerer Haarzellen (IHC), bei denen es sich um die eigentlichen Sinneszellen handelt, die die Erregung nach zentral fortleiten, von drei Reihen äußerer Haarzellen (OHC), die für den „cochleären Verstärkermechanismus“ und die „Frequenzdiskriminierung“ zuständig sind<sup>1</sup>. Der Schopf der Haarzellen wird von jeweils 50-100 Stereozilien gebildet, die beim Menschen aus 8µm langen und 200-500nm durchmessenden, steifen und aus vernetzten Aktinfilamenten aufgebauten *Mikrovilli* bestehen, sie werden nach basal schmaler und wurzeln in einer durch das Geflecht verschiedener Filamente verdickten Schicht am *Apex* der Haarzelle, der sogenannten Kutikularplatte<sup>1</sup>. Die Stereozilien sind unterschiedlich lang, gleichlange Stereozilien sind in einer V-förmigen Reihe formiert und die einzelnen Reihen sind nach abnehmender Länge zu einem großen „V“ angeordnet<sup>1</sup>. Die längsten Stereozilien der äußeren Haarzellen stehen in Kontakt zur Tektorialmembran und sind durch sogenannte *Tip links* mit dem nächst kürzeren Stereozilium verbunden, die *Tip links* sind wiederum an Ionenkanälen befestigt, was - wie unten beschrieben - von großer funktioneller Bedeutung ist<sup>1</sup>.

### **3.1.3 Neuroanatomie des Innenohres**

Die von den inneren Haarzellen erzeugten Potentiale werden mittels Glutamat-Freisetzung auf „die afferenten Endigungen des *Nervus cochlearis*“ nach zentral übertragen, die Nervenfasern erreichen das OC über die *Lamina spiralis ossea*, legen vor der Passage der Basilmembran ihre Myelinscheide ab und „laufen frei durch den inneren Tunnel“<sup>1, 3</sup>. Die bipolaren *Ganglia spiralia* befinden sich im Spiralkanal des *Modiolus (Canalis spiralis modioli)*, den man auch als Rosenthal-Kanal bezeichnet<sup>1, 3</sup>. Diesen Perikaryen entstammt die afferente Innervation: Die Dendriten ziehen in Richtung des OCs und nehmen zum weit überwiegenden Anteil Kontakt zu den inneren Haarzellen auf, die vor allem afferent innerviert werden, die Axone ziehen im *Nervus cochlearis* in Richtung des Hirnstamms<sup>1, 3</sup>. 90% der beschriebenen Dendriten sind myelinisiert, sie entstammen den sogenannten Typ I Spiralganglien-Neuronen und nehmen ohne Verzweigung Kontakt mit jeweils nur einer inneren Haarzelle auf, eine einzelne innere Haarzelle steht allerdings mit zahlreichen afferenten Fasern in Verbindung<sup>2</sup>. Die äußeren Haarzellen wer-

den von den nicht oder nur dünn myelinisierten, weit verzweigten, 10% der afferenten Fasern, die aus den Typ II Spiralganglien-Neuronen entspringen, „trophisch versorgt“<sup>1-3</sup>. Die Typ-I- und Typ-II-Spiralganglien-Neurone unterscheiden sich neben der Myelinisierung vor allem in der Polarität, der Fülle an Zellorganellen und der Zellkern-Morphologie: Die Typ-I-Neurone sind im Gegensatz zu den pseudunipolaren Typ-II-Neuronen bipolar, enthalten eine Fülle an Zellorganellen und weisen einen hellen, zentral lokalisierten Nukleus auf<sup>3</sup>. Die äußeren Haarzellen werden vor allem durch efferente Fasern innerviert, die aus der oberen Olive entstammen und „inhibitorisch auf die [äußeren Haarzellen beziehungsweise] auf die afferenten Endigungen an den [inneren Haarzellen]“ wirken<sup>1,2</sup>.

### **3.2 Physiologie des Innenohres**

Das menschliche Gehör kann Töne im Frequenzbereich von 20 Hz und 16 kHz wahrnehmen, im Frequenzbereich von 2-5 kHz benötigt man die geringsten Schalldruckpegel, um eine Hörempfindung auszulösen<sup>2</sup>. Bis wir Schall als auditorische Sensation wahrnehmen können, muss eine komplizierte Kettenreaktion fehlerfrei abgelaufen sein: Nachdem der Schall über die Ohrmuschel und den Gehörgang zum Trommelfell weitergeleitet worden ist, wird dieses in Schwingung versetzt<sup>2</sup>. Die gelenkig verbundene Gehörknöchelchenkette aus *Malleus*, *Incus* und *Stapes* leitet die Schwingungen über die Fußplatte des Steigbügels an das ovale Fenster und damit in die mit Perilymphe gefüllte *Scala vestibuli* weiter, diesen Prozess bezeichnet man als Luftleitung<sup>2</sup>. Die kleinen Knöchelchen reduzieren beim Übertritt des Schalls vom Medium Luft in das Medium der Innenohrflüssigkeiten den Anteil der Schallenergie, der wegen der unterschiedlichen Impedanzen beider Medien durch Reflexion verloren gehen würde, indem sie den Druck auf das ovale Fenster erhöhen - zum einen durch ihre unterschiedlichen Hebelarme zueinander und zum anderen durch die gegenüber der *Stapes*-Fußplatte größere Fläche des Trommelfells<sup>2</sup>. Um die weiteren Schritte auf dem Weg zum Höreindruck verstehen zu können, muss man sich die Ionenzusammensetzungen der verschiedenen Innenohrflüssigkeiten vor Augen führen. Da die Perilymphe mit ihrem hohen Natrium- und geringen Kaliumanteil in ihrer Zusammensetzung der Extrazellulär-Flüssigkeit entspricht, sich die Endolymphe hingegen durch Kaliumreichtum und Natriumarmut auszeichnet, herrscht zwischen den beiden Flüssigkeiten ein deutlicher Ionengradient, der sich als endocochleäres Potential von 80 mV im Endolymphraum gegenüber dem Perilymphraum auch hinsichtlich der Ladungsverhältnisse bemerkbar macht<sup>2</sup>. Durch die Übertragung auf das ovale Fenster wird die Basilarmembran in Schwingung versetzt, es entsteht eine an sich relativ kleinamplitudige Wanderwelle<sup>2</sup>. Nur durch die speziellen Eigenschaften der Ba-

silarmembran ist es dennoch möglich, für jede Frequenz an einer spezifischen Stelle auf der Basilarmembran stärkere Auslenkungen zu erreichen: Die Steifigkeit der Basilarmembran reduziert sich vom ovalen Fenster bis zum *Apex* auf ein Hundertstel, während die Breite zunimmt, dadurch existiert für jede Frequenz ein Ort der maximalen Schwingungsamplitude auf der Basilarmembran, für hohe Frequenzen basal, für niedrige Frequenzen eher apikal, dieses Prinzip bezeichnet man als Ortstheorie<sup>2</sup>. Neben diesem passiven Prozess der Frequenz-Ortsabbildung, wird zusätzlich durch die äußeren Haarzellen ein aktiver Beitrag zur Ortsspezifität geleistet: Neben der Basilarmembran wird durch die Schwingungen auch die Tektorialmembran ausgelenkt, im Bereich der maximalen Schwingungsamplitude kommt es zur gegenläufigen Auslenkung und dadurch zur Einwirkung von Scherkräften auf die mit der Tektorialmembran verbundenen Stereozilien der äußeren Haarzellen<sup>2</sup>. Durch die Verankerung an die *Tip links* werden Transduktionskanäle der äußeren Haarzellen, die ein Membranpotential von -70 mV aufweisen, geöffnet und durch die Differenz von 150 mV gegenüber dem 80 mV betragenden endocochleären Potential kommt es trotz der annähernd gleichen Kalium-Konzentrationen beider Kompartimente zu einem Kalium-Einstrom in die äußere Haarzelle, die in Folge dessen depolarisiert wird<sup>2</sup>. Das entstandene Rezeptorpotential wird durch die anschließende Repolarisierung wieder abgebaut, indem Kalium über „an der seitlichen [Zellmembran] gelegene spannungsabhängige [beziehungsweise] calciumgesteuerte Kaliumkanäle“ und über den  $K^+$ - $Cl^-$ -Cotransporter aus den äußeren Haarzellen [...] in die *Stria vascularis* zurück transportiert wird<sup>2</sup>. Das in der Zellmembran befindliche Protein Prestin verkürzt sich im Bereich des ortsspezifischen Schwingungsmaximums bei Depolarisation und verlängert sich bei Repolarisation und führt somit zu einer aktiven Längenoszillation der äußeren Haarzellen<sup>2</sup>. Durch diesen die Frequenzselektivität und Schwingungsenergie steigenden, aktiven Kontraktionsprozess wird die Endolymphe deutlich in Bewegung versetzt, sodass die freien Stereozilien der inneren Haarzellen ausgelenkt werden und wiederum durch die *Tip-link*-Verankerung Transduktionskanäle geöffnet werden<sup>2</sup>. Die für die äußeren Haarzellen beschriebenen Prozesse wiederholen sich in den inneren Haarzellen bis darauf, dass statt der Längenänderung des *Prestins* durch die Depolarisation der inneren Haarzellen ein Calciumeinstrom und dadurch die basale Freisetzung des Transmitters Glutamat aus den sogenannten Bandsynapsen induziert wird, die wiederum zu einer Erregung der afferenten Nervenfasern und der Erzeugung von Aktionspotentialen führt<sup>2</sup>. Die Afferenzen ziehen in cochleotoper Anordnung über den *Nucleus cochlearis*, die *Oliva superior*, den *Nucleus lemniscus laterialis*, den *Colliculus inferior* und das *Corpus geniculatum mediale* sowohl gekreuzt als auch ungekreuzt nach Passage von „fünf bis sechs Neuronen“ zur primären Hörrinde im Bereich der *Heschel*-Windung im Temporallappen, wo es zur Umsetzung der neuronalen Aktivität in den Sinneseindruck und

zur Projektion in sekundäre auditorische Areale, Assoziationskortex und kortikale Areale der Sprachanalyse und -produktion kommt<sup>2</sup>.

### ***3.3 Pathophysiologie der Cochlea und des Hörens – Ein Ausschnitt***

Störungen auf dem Weg der Umwandlung der Schallwelle in den eigentlichen Höreindruck können zu den Symptomen Hörverlust und Tinnitus führen<sup>4</sup>. Unter Hörverlust versteht man die Reduktion der Fähigkeit, auditorische Sinneseindrücke wahrzunehmen<sup>4</sup>. Hörverlust kann man in Schallleitungsschwerhörigkeit und Schallempfindungsschwerhörigkeit unterscheiden<sup>4</sup>. Schallleitungsschwerhörigkeit entsteht durch Verlegungen des Gehörganges und durch Erkrankungen des Mittelohrs<sup>4</sup>. Erkrankungen der *Cochlea* und den sich anschließenden weiterleitenden und verarbeitenden Strukturen der Hörbahn äußern sich als Schallempfindungsschwerhörigkeit<sup>4</sup>. Liegen Leitungs- und Empfindungsdefekte nebeneinander vor, spricht man von einer kombinierten Schwerhörigkeit, die bei gemeinsamer Erkrankung des Mittel- und Innenohres beispielsweise im Rahmen einer Otosklerose oder einer Mittelohrentzündung mit Labyrinthbeteiligung auftritt<sup>4</sup>. Schallempfindungsschwerhörigkeit wird wiederum in drei Untergruppen unterteilt: Ist die Schwerhörigkeit durch defekte Sinneszellen, zum Beispiel im Rahmen von isolierten Labyrinth-erkrankungen bedingt, spricht man von einer sensorischen Schwerhörigkeit, neuraler Hörverlust ist hingegen durch Schädigungen des Hörnervs oder der zentralen Verarbeitung bedingt, liegen beide Formen der Schallempfindungsschwerhörigkeit nebeneinander vor, bezeichnet man das als sensorineuralen Hörverlust<sup>4</sup>. Sind die Haarzellen von der Schädigung betroffen, handelt es sich um irreversible Schäden, da diese Zellen über kein Regenerationspotential verfügen<sup>4</sup>. Hörverlust ist das auf der Welt am häufigsten auftretende sensorische Defizit, weltweit und populationsübergreifend sind 250 Millionen Menschen von Hörverlusten und den damit einhergehenden Folgen wie einer reduzierten Teilnahmefähigkeit an Kommunikation, einer verzögerten Sprachentwicklung, einer Stigmatisierung und reduzierten Bildungschancen betroffen<sup>5</sup>.

Unter Tinnitus „versteht man abnorme auditorische Informationen aufgrund einer Störung im oder in der Nähe des Hörsystems“<sup>4</sup>. Tinnitus wird in eine objektive und subjektive Form unterschieden: Dem objektiven Tinnitus liegt die Wahrnehmung einer Innenohr-nah gelegenen, durch vaskuläre, muskuläre oder atemabhängige Prozesse entstandenen Geräuschquelle zu Grunde, subjektiver Tinnitus tritt ohne eine derartige objektivierbare Schallquelle auf und kann isoliert, selten im Rahmen von Mittelohrerkrankungen und am häufigsten im Verbund mit Schallempfindungsschwerhörigkeit auftreten<sup>4</sup>. Erworbene Schädigungen des Innenohres, die zu Funktionsstörungen und Verlust der Haarzellen und somit zu den oben beschriebenen Sympto-

men führen, werden durch Alterungsprozesse, Infektionen, Lärm, Durchblutungsstörungen, maligne Prozesse, Verletzungen und Intoxikationen hervorgerufen <sup>4</sup>.

Als Ototoxizität bezeichnet man die Fähigkeit von chemischen Substanzen Dysfunktion und Degeneration der Gewebe des Innenohrs zu erzeugen <sup>6</sup>. Gegenüber den toxischen Einflüssen besteht eine individuell unterschiedliche Empfindlichkeit, neben Zwischenprodukten verschiedener Stoffwechsel- und Infektionserkrankungen sowie Industrieerzeugnissen können auch Medikamente ototoxisch wirken: Schleifendiuretika wie Furosemid, Therapeutika der Malaria wie Chinin, Nicht-steroidale Anti-Rheumatika wie Salicylate, Aminoglykosidantibiotika wie Neomycin und Zytostatika wie Cisplatin führen als unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung zu Hörverlust und Tinnitus <sup>6</sup>.

### **3.4 Cisplatin**

Cisplatin gehört wie Oxaliplatin und Carboplatin zur Gruppe der Platin-freisetzenden Zytostatika und wird im Rahmen der Behandlung von Hoden-, Hals-, Ovarial-, Lungen- und Blasen-tumoren sowie von Neoplasien im Kopfbereich zum Beispiel pädiatrischen Neuroblastomen, eingesetzt und intravenös appliziert <sup>7-9</sup>. Platin geht, nachdem die Chloridgruppen des Cisplatins vor allem intrazellulär durch Wassermoleküle ausgetauscht wurden, Bindungen mit Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoff-haltigen Gruppen ein, wie sie in Seitenketten von Aminosäuren oder vorrangig in den Purinbasen der Nukleinsäuren vorkommen <sup>8, 10</sup>. Durch diese Verknüpfung entstehen Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges, zwischen verschiedenen DNA-Strängen oder zwischen Nukleinsäuren und Proteinen, die die Replikation, die Transkription und den gesamten DNA-Stoffwechsel der Zelle beeinträchtigen und zur Apoptoseeinleitung führen <sup>8, 10</sup>.

#### **3.4.1 Cisplatin-induzierte Ototoxizität**

Zu den Dosis-limitierenden Nebenwirkungen des Cisplatin zählen schwere zentrale Übelkeit, die mittels Ondansetron therapiert werden kann, Nephrotoxizität, die mit Hilfe von forcierter Diurese, Salz- und Flüssigkeitszufuhr gemildert werden kann sowie Neuro- und Ototoxizität, für die noch kein etabliertes Therapie- oder Präventionsprotokoll erstellt werden konnte <sup>8, 11</sup>. Die Cisplatin-induzierte Ototoxizität tritt bilateral, symmetrisch und irreversibel auf, beginnt im Hochfrequenzbereich und kann sich bis auf die für den Sprachbereich essenziellen Frequenzen ausbreiten, neben Hörverlust können Tinnitus, Schwindel und Ohrenscherzen auftreten <sup>9, 12, 13</sup>. Der Einsatz des Cisplatins erfolgt nicht nur im Rahmen der Tumorbehandlung bei Erwachsenen, sondern auch in der pädiatrischen Onkologie. Auch Kinder leiden unter der durch Cisplatin-

induzierten Ototoxizität: 60% der mit Cisplatin behandelten pädiatrischen Patienten erleiden einen irreversiblen, beidseitigen Hörverlust<sup>14</sup>. Im Kindesalter kann der Hörverlust die Sprachentwicklung soweit einschränken, dass die Kinder unter einem permanenten Kommunikationsdefizit zu leiden haben<sup>14</sup>. Cisplatin vermittelter Hörverlust tritt innerhalb von Wochen bis Monaten auf, Risikofaktoren für das Auftreten der Ototoxizität stellen vorhergehende Lärmexposition, Behandlung mit anderen ototoxischen Medikamenten, reduzierte Nierenfunktion, Bestrahlung des Kopfbereichs, Unterernährung, geringes Alter bei erster Exposition, hohe Zyklusanzahl und eine gesteigerte Kumulativdosis dar<sup>7, 9</sup>. Die Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin-induzierter Ototoxizität variiert stark interindividuell<sup>14, 15</sup>. Diese variabel ausgeprägte Empfindlichkeit ergibt sich möglicherweise auch aus genetischen Faktoren: Mögliche Kandidaten für diesen genetischen Erklärungsansatz, die bisher untersucht worden sind, stellen verschiedene Allele oder Polymorphismen des Megalin-Gens, verschiedener Glutathion-S-Transferasen (GST), der Katechol-O-Methyltransferase (COMT), der Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT), der Excision-Repair-Cross-Complementing-Polypeptide (ERCC1, ERCC2) und verschiedener mitochondrialer Gene dar<sup>14, 15</sup>. Für COMT und TPMT konnte nachgewiesen werden, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens Cisplatin-induzierter Ototoxizität mit steigender Anzahl bestimmter Risiko-Allele zunimmt<sup>14</sup>. Der typische durch Cisplatin vermittelte Frequenzverlust erklärt sich durch die erhöhte Empfindlichkeit des basalen Abschnitts der *Cochlea* gegenüber Cisplatin, bei den zellulären Zielstrukturen des Cisplatins handelt es sich vor allem um die äußeren Haarzellen, aber auch um die Zellen der *Stria vascularis*, innere Haarzellen und Spiralganglionneurone<sup>16</sup>.

Die genauen Signalwege, durch die die Ototoxizität im Anschluss an die Platinierung der Nukleinsäuren vermittelt wird, sind noch unklar. Diskutiert werden unter anderem die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies bei gleichzeitig geringem antioxidativen Potential, mitochondriale Freisetzung proapoptotischer Mediatoren, Zellstress durch frustrane DNA-Reparaturversuche, proinflammatorische Zytokine oder Synergismen mehrerer toxischer Prozesse<sup>9, 13, 16</sup>.

### **3.5 Zytokine der Interleukin-6-Familie**

Zytokine sind mit einer durchschnittlichen Größe von 25kDa kleine Proteine, die von vielen verschiedenen Zellen und Geweben des Körpers als Antwort auf spezifische Stimuli produziert werden und in derselben Zelle *autokrin* sowie in anderen Zellen *parakrin* oder bei besonders hohen Spiegel und Übertritt in die Blutbahn auch systemisch *endokrin* über definierte Rezeptoren komplexe Antworten induzieren können<sup>17, 18</sup>.

Als Interleukine bezeichnet man einige Zytokine, die von Leukozyten produziert werden, besonders T-Helfer-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen sind wichtige Interleukin-Produzenten, hinsichtlich der Benennung der Zytokine besteht allerdings kein einheitliches System<sup>17,18</sup>. Zytokine werden anhand ihrer Rezeptoren und Struktur in Gruppen und untergeordnete Familien unterschieden: Neben den Hämatopoietinen, zu denen auch Interleukin-6 (IL-6) und Oncostatin M (OSM) gehören, unterscheidet man Chemokine und die TNF-Gruppe voneinander<sup>17</sup>. Interleukine und ihre Rolle als Kommunikationsmittel der Gewebe und Zellen sind vor allem im Zusammenhang mit dem Immunsystem erforscht, sie spielen aber auch für viele grundlegende biologische Prozesse wie Überleben, Regeneration, Proliferation und Differenzierung eine Rolle<sup>19</sup>.

IL-6 und OSM gehören wie Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-27 (IL-27), Cardiotrophin 1 (CTF1), Cardiotrophin-ähnlicher Zytokin-Faktor 1 (CLCF1), ziliärer neurotropher Faktor (CNTF) und Leukämie inhibierender Faktor (LIF) zur Familie der IL-6-Interleukine, deren Mitglieder sich die gemeinsame Rezeptoruntereinheit gp130 teilen und sich durch funktionelle Redundanz und Pluripotenz auszeichnen<sup>20, 21</sup>.

### **3.5.1 Interleukin-6**

IL-6 gehört zur gleichnamigen Zytokin-Familie, wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen produziert und wirkt auf verschiedene Zielgewebe und Zelltypen, es ist vor allem als proinflammatorisches Zytokin bekannt: Lokal induziert es die Reifung der B-Lymphozyten, bewirkt die Aktivierung von T-Zellen, systemisch ist es an der Induktion von Fieber und der Akut-Phase-Reaktion beteiligt<sup>17, 21</sup>.

Die Wirkung dieses Zytokins hängt neben der Frage, ob es systemisch zirkuliert oder lokal appliziert wird, auch vom jeweiligen Zielgewebe bzw. von der Zielzelle ab und lässt sich nicht auf inflammatorische Prozesse reduzieren: So konnte durch IL-6-Behandlung beispielsweise das Ausmaß der Leberschädigung im Anschluss an Ischämie reduziert werden, der Anteil der überlebenden Zellen erhöht werden und für IL-6 eine bedeutende Rolle in der Homöostase der Leber nachgewiesen werden, auch renale Zellschädigung durch Cisplatin konnte durch IL-6 reduziert werden<sup>22, 23</sup>. Protektives und regeneratives Potential konnte auch bereits im Nervensystem gezeigt werden, so schützte die Behandlung mit IL-6 Granularzellen des Kleinhirns vor NMDA-induzierter Neurotoxizität und führte zu erhöhtem Überleben von PC12-Zellen, die mit Cisplatin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel und Serum-Deprivation behandelt worden waren<sup>19, 24</sup>.

Bezüglich des Innenohrs ist IL-6 in verschiedenen Modellen als Vermittler der Cisplatin-induzierten Oto- und Vestibulotoxizität beschrieben worden<sup>25, 26</sup>.

Nachdem IL-6 an den Membran-gebundenen (IL-6-R $\alpha$ ) oder löslich zirkulierenden IL-6-Rezeptor *alpha* (sIL-6-R- $\alpha$ ) gebunden hat, gehen je zwei der Ligand-Rezeptorkomplexe Heterodimere mit dem in vielen Geweben exprimierten, Signal-weiterleitenden und Membranständigen Rezeptor Glycoprotein 130 (gp130) ein <sup>27</sup>. Dieser Rezeptor verfügt über keine eigene Kinase-Aktivität, ist aber stets mit den Tyrosin-Kinasen Janus-Kinase 1 (JAK-1) und 2 (JAK-2) assoziiert, die sich auf die Dimerisierung hin dem Rezeptor annähern, sich selbst und den gp130-Rezeptor an seinen Tyrosin-Domänen phosphorylieren, wodurch eine Anlagerungsposition für den *Singal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) freigegeben wird, über den der Signalweg wie unten beschrieben weiter vermittelt wird <sup>28</sup>. Neben dem JAK/STAT induzierten Weg, kann IL-6 seine Wirkung ebenfalls über die Signalwege der Phosphoinositid-3- und der Protein-Kinase B (PI3K/Akt), der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen: MEK/Erk 1,2) und des Nuclear-Factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) vermitteln <sup>29</sup>.

### 3.5.2 *Oncostatin M*

OSM ist ein Mitglied der IL-6-Zytokin-Familie und ist wegen der Induktion verschiedener immunregulatorischer Substanzen als Mediator verschiedener Erkrankungen wie disseminierter Enzephalitis, HIV-assoziiierter Demenz, epileptischen Anfällen und Gliomen beschrieben worden, aber auch als Regulator der Hämatopoese <sup>20, 30</sup>. Welche der komplexen und variablen Funktionen durch das Zytokin vermittelt wird, hängt stets vom zellulären Umfeld ab <sup>20, 30</sup>. Für OSM sind sowohl fördernde, beispielsweise Akut-Phase-Reaktion-induzierende, als auch hemmende Wirkungen auf das Immunsystem gezeigt worden, es ist wie IL-6 an Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt und ist ursprünglich als aus Tumorzelllinien isolierter Faktor, der das Wachstum von Tumorzellen hemmt, beschrieben worden <sup>20, 31</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass OSM das Zellwachstum des Kaposi-Sarkoms fördert, das des Melanoms hingegen hemmt <sup>17</sup>. Die Sekretion von OSM ist für T-Lymphozyten, Monozyten, Neurone, Astrozyten und Microglia beschrieben <sup>31</sup>.

Im zentralen Nervensystem sind für OSM wie für IL-6 und andere Vertreter der IL-6-Zytokin-Familie, die man deshalb auch als Neurokine bezeichnet, neuroprotektive Wirkungen beschrieben <sup>32</sup>. Ein Anstieg der unter Ruhebedingungen niedrigen OSM-Spiegel durch eine erhöhte Sekretion durch Microglia, Astrozyten und Leukozyten unter Bedingungen der Neuroinflammation konnte nachgewiesen werden sowie eine Induktion proinflammatorischer Substanzen in Astrozyten und zerebralen Endothelien <sup>30</sup>. Die genaue Wirkung des OSM im Nervensystem ist noch unklar, es konnte allerdings gezeigt werden, dass OSM im Mausmodell der disseminierten Enzephalitis vor deren Fortschreiten und der Infiltration von Entzündungszellen

geschützte und NMDA-induzierte Exzitotoxizität *in vivo* und *in vitro* milderte<sup>20, 30</sup>. Durch OSM-induziertes protektives Potential konnte für Photorezeptoren der Retina im Rahmen der Retinitis pigmentosa gezeigt werden.

Auch OSM vermittelt seine Wirkung unter anderem über STAT3, JAKs, gp130 und alternativ über den MAP-Kinase-Weg, benötigt aber andere Rezeptoren und hat die Möglichkeit über zwei Rezeptoren auf Zellen zu wirken: OSM bindet den LIF-Rezeptor (LIF-R) oder den spezifischen OSM-Rezeptor  $\beta$  (OSM-R $\beta$ ), die jeweils mit gp130 dimerisieren, daraus ergibt sich die Tatsache, dass LIF und OSM sich in ihren Wirkungen sehr ähneln, OSM aber dennoch über spezifische Funktionen verfügt<sup>20, 30</sup>.

Bezüglich des Innenohrs geht aus den Daten des „National Center of Biotechnology Information“ hervor, dass OSM-R $\beta$  auf mRNA-Ebene im Innenohr sehr stark exprimiert wird, funktionell liegen kaum Daten vor.

### **3.6 Ubichinon**

Das hydrophobe Ubichinon (Q) ist vor allem aufgrund seiner Funktion als Elektronencarrier im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette bekannt: Es wechselt zwischen seiner Chinon- und Hydrochinon-Form und kann dadurch zwei Elektronen transportieren<sup>33</sup>. Über Komplex I werden die aus dem NADH stammenden Elektronen auf Ubichinon übertragen, mit Hilfe dessen sie zu Komplex III gelangen, wo sie über Cytochrom C zum Komplex IV gelangen, um unter Wasserbildung Sauerstoff zu reduzieren<sup>33</sup>. Diese Prozesse sind an der Erzeugung eines Elektronengradientens zwischen dem Matrix- und Intermembranraum des Mitochondriums beteiligt, der die Voraussetzung für die Umwandlung von ADP in ATP durch die F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATP-Synthase darstellt und damit der Energiegewinnung der Zelle dient<sup>33</sup>. Es handelt sich um ein intrazellulär synthetisiertes Polyisoprenlipid, das neben seiner Funktion im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette als Antioxidans in Membranen wirkt, als Cofaktor für das „Uncoupling Protein“, das die ATP-Synthase von der Atmungskette entkoppelt und als Substanz, die die Expression vieler verschiedener Gene beeinflusst<sup>33, 34</sup>.

In Monozyten-Zelllinien konnten Zellen durch Präinkubation mit der mit zehn Isopreneinheiten verketteten Ubichinon-Unterform „Q10“ vor Lipopolysaccharid-induziertem Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-Anstieg geschützt werden, bei Migränepatienten konnte durch Verabreichung von Q10 die Attackenfrequenz reduziert werden<sup>34, 35</sup>. Im Mausmodell konnte für Q10 ein protektiver Effekt gegenüber Cisplatin-induziertem Nierenversagen beschrieben werden<sup>36</sup>. Das kardioprotektive Potential des Ubichinon konnte in vielen Modellen und Studien belegt

werden, beispielsweise erholte sich das myokardiale Gewebe von Patienten, die vor einem kardiochirurgischen Eingriff ein Q10-Präparat oral einnahmen, schneller von den Folgen *in vitro* induzierter Hypoxie als das der Vergleichsgruppe<sup>37</sup>.

Bezüglich des Innenohres, konnten bei Presbyakusis-Patienten nach 30-tägiger Ubichinon-Supplementation eine Verbesserung des Ton-Audiogramms erreicht werden, im Mausmodell konnte das Ausmaß Lärm-induzierten Hörverlusts durch die Administration eines Ubichinon-Derivats reduziert werden<sup>38,39</sup>.

### ***3.7 Signal Transducer and Activator of Transcription 3***

Zytokine wie IL-6 und OSM vermitteln ihre Wirkung im weiteren Verlauf durch den Signaltransducer and Activator of Transcription 3 (STAT3): Die Janus-Kinasen phosphorylieren nach ihrer Aktivierung die Tyrosin-Domäne 705 von zytoplasmatischen STAT3-Monomeren<sup>27</sup>. Daraufhin erfolgt die Dimerisierung zweier phosphorylierter Monomere und die Translokation dieses Dimers in den Nukleus, wo sie an die Promotor-Sequenzen verschiedener Ziel-Gene binden und deren Transkription modulieren<sup>27</sup>. STAT3 kann auch durch Phosphorylierung als Folge der Signaltransduktion anderer Rezeptoren über Rezeptor-intrinsische oder assoziierte Kinasen aktiviert werden, so vermitteln neben Zytokinen auch einige Wachstumsfaktoren und Hormone ihre Wirkung mit Hilfe von STAT3<sup>40</sup>. Neben STAT3 sind noch sechs weitere STATs in Säugtieren identifiziert worden: STAT1, STAT2, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6<sup>40</sup>. Für STAT1 und STAT3 ist neben der Tyrosin-Phosphorylierung eine Serin-Phosphorylierung beschrieben worden, die im Nukleus die Effektivität der STAT3-Bindung an die DNA erhöhen und die Aktivierung der Transkription fördern soll<sup>40</sup>. Serin-phosphoryliertes STAT3 wurde zudem in Mitochondrien nachgewiesen, darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass STAT3 eine fördernde Wirkung auf die oxidative Phosphorylierung ausübt und dieser Einfluss von der Serin-Phosphorylierung abhängig stattfindet<sup>41</sup>. Zytokin-induzierte Signalwege werden durch die Familie der „Suppressors of Cytokine Signaling“ (SOCS) negativ reguliert, es gibt acht verschiedene Vertreter dieser Familie: SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 und CIS<sup>42</sup>. Zielgene, deren Transkription durch STAT3 induziert wird, sind an der Regulation von Prozessen wie Überleben, Proliferation und Entzündung beteiligt<sup>43</sup>. Signalwege, die durch STAT3 und den zugehörigen spezifischen Regulator SOCS3 vermittelt werden, sind darüber hinaus an Zellmigration, Wundheilung und Regeneration in Haut, Leber und Retina beteiligt<sup>44</sup>. Es wurde beschrieben, dass STAT3 in verschiedenen Tumortypen konstitutiv aktiv ist und an der Vermittlung des Tumorüberlebens und der Apoptosehemmung beteiligt ist, außerdem konnte gezeigt

werden, dass STAT3 an der Aktivierung des *mdr1*-Gens beteiligt ist, das Resistenzen gegenüber verschiedenen Medikamenten vermittelt <sup>45</sup>. Bezüglich des Innenohrs konnte gezeigt werden, dass STAT3/SOCS3-induzierte Signalwege an der Regeneration von Haarzellen im Modell des Zebrafisch beteiligt sind <sup>44</sup>.

### ***3.8 Apoptoseregulation – Ein Ausschnitt***

Der Prozess des programmierten Zelltodes spielt im Rahmen der Entstehung von Hörverlust eine große Rolle, besonders im Rahmen der durch Medikamente vermittelten Ototoxizität, auch Cisplatin-induzierte Schäden werden durch apoptotischen Zelluntergang erzeugt <sup>10</sup>. Bei der Apoptose handelt es sich um einen gezielt eingeleiteten Tod ausgewählter Zellen, der im Unterschied zur Nekrose mit der Kondensation des Chromatins ohne das Auftreten großflächiger Entzündung und unter Schonung des umliegenden Gewebes abläuft <sup>33</sup>.

Den Weg des apoptotischen Untergangs schlägt eine Zelle auf Grund verschiedener Signale ein: Man unterscheidet den Weg der extrinsischen Aktivierung von dem der intrinsischen <sup>33</sup>. Im Rahmen des extrinsischen Weges docken Liganden wie Fas-Ligand oder TNF an sogenannte Todesrezeptoren wie den Fas-Rezeptor oder den TNF-Rezeptor-1 und initiieren die Aktivierung einer intrazellulären Caspase-Kaskade, die für die Einleitung des organisierten Zelltodes essentiell ist <sup>33</sup>.

Verschiedene intrazelluläre Stressoren wie der Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), DNA-Schädigung oder virale Infektionen führen auf dem intrinsischen Weg der Apoptose-Induktion zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch normalerweise nur mitochondrial lokalisierte Substanzen wie Cytochrom C freigesetzt werden, zytosmatisch als Signalmolekül wirken und zur Initiierung eines Netzwerks aus Apoptose-vermittelnden Caspasen führen <sup>33</sup>.

Die Steigerung der Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran und damit auch die Freisetzung von Cytochrom C unterliegen strengen Regulationsprinzipien, die vor allem durch die Familie der B-Zell-Lymphom-2-Proteine (Bcl-2-Familie) gewährleistet wird. Zu dieser Familie gehören sowohl proapoptische als auch antiapoptische Vertreter: Proapoptische Familienmitglieder wie das Bcl-2-assoziierte X-Protein (Bax) und der Bcl-2-homologe Antagonist-Killer (Bak) vermitteln ihre Wirkung dadurch, dass sie aktiviert als Heterodimere direkte Bausteine der Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden, durch die proapoptische Mediatoren ihren Weg ins Zytoplasma finden oder dadurch, dass sie die antiapoptischen Vertreter abbauen <sup>33</sup>. Zu den antiapoptischen Familienmitgliedern gehören Mediatoren wie Bcl-XL, Mcl-

1, Bfl-1 und Bcl-2 selbst, sie binden die proapoptotischen Vertreter und verhindern so die Einleitung der Apoptose<sup>33</sup>.

Aber auch mitochondriale Moleküle, die nicht zur Bcl-2-Familie gehören, sind an der Induktion apoptotischer Prozesse beteiligt: Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) beispielsweise, bei dem es sich um ein im mitochondrialen Zwischenmembranraum befindliches Enzym handelt, kann auf Zellstress hin umgebaut werden, in den Nukleus gelangen und apoptotische Chromatinkondensation induzieren, gleichzeitig scheint AIF regulierend an der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung, dem Redox-Gleichgewicht der Zelle und der Funktion der Mitochondrien im Allgemeinen beteiligt zu sein<sup>46</sup>.

Mediatoren, die die Apoptoseeinleitung verhindern, sind von entscheidender Bedeutung im Rahmen der Erhaltung der Teilungsfähigkeit von Stammzellen und der Entstehung von gegenüber physiologischen Regulationsprozessen resistenter Teilungsfähigkeit in Tumorzellen<sup>33</sup>. Eine Gruppe von Proteinen namens „*Inhibitor of Apoptosis*“ (IAP) ist nach ihrer Fähigkeit, Apoptose zu verhindern, benannt worden und setzt sich aus einer Vielzahl von Vertretern zusammen, die über unterschiedliche Mechanismen antiapoptotisch wirken, aber über ein für diese Familie charakteristisches enzymatisches Zentrum verfügen<sup>47</sup>. Survivin stellt einen Vertreter dieser Familie dar, der in embryonalem, sich entwickelndem Gewebe und verschiedenen Tumoren, nicht aber in ausdifferenzierten Geweben, nachgewiesen werden konnte und dessen genaue - unter bestimmten Umständen sogar proapoptotische - Funktion von verschiedenen Regulationsmechanismen und der subzellulären Lokalisation abhängig ist<sup>33, 47, 48</sup>.

### **3.9 Herleitung der Aufgabenstellung**

In früheren Arbeiten unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Zytokin IL-6, entgegen den Erwartungen, im verwendeten Modell nicht an der Vermittlung Cisplatin-induzierter Ototoxizität beteiligt ist, sondern in begrenztem Umfang sogar vor dieser Toxizität schützt<sup>49</sup>. Im Rahmen der Quantifizierung der verschiedenen Haarzelltypen der drei Abschnitte der *Cochlea* nach definierten morphologischen Parametern wurde beschrieben, dass die einstündige Behandlung der OC-Explantate im Vorfeld der 48-stündigen Behandlung mit Cisplatin die inneren Haarzellen des apikalen und medialen Fragments statistisch signifikant vor den morphologischen Folgen Cisplatin-induzierter Ototoxizität schützt<sup>49</sup>.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit ist es, die durch IL-6-induzierte Protektion zu reproduzieren und näher zu charakterisieren. Es soll ermittelt werden, welchen Einfluss die Inkubationsdauer und eine vorhergehende Präinkubation mit dem Zytokin auf die beobachtete Pro-

tektion haben und ob auch andere strukturelle Bestandteile der Hörbahn wie die Neuriten des Hörnervs von der IL-6-induzierten Protektion gegenüber Cisplatin profitieren können. Untersucht wird weiterhin, ob sich die Auswirkungen der Zytokin-Behandlung hinsichtlich der beiden Haarzelltypen oder der verschiedenen tonotopischen Areale der *Cochlea* unterscheiden. Außerdem soll ermittelt werden, ob es sich um ein für IL-6 typisches Phänomen handelt oder ob sich der beobachtete Effekt auch für andere Vertreter der IL-6-Zytokin-Familie, namentlich im Rahmen dieser Arbeit für OSM, beschreiben lässt. Weiterhin wird untersucht, über welchen Signalweg die Effekte der Zytokine vermittelt werden: Analysiert wird die Rolle des STAT3, der Spiegel seiner Phosphorylierungsprodukte und ihre Lokalisation in verschiedenen subzellulären Kompartimenten als Folge der Zytokin-Behandlung. Weiterhin soll ermittelt werden, ob die Inkubation mit Zytokinen in die Apoptoseregulation eingreift und die Spiegel verschiedener, den programmierten Zelltod regulierender Proteine durch die Behandlung beeinflusst werden.

Bei der durch Cisplatin vermittelten Ototoxizität handelt es sich um ein seit Langem beschriebenes Phänomen, auch der durch die Anlagerung an die DNA induzierte Wirkmechanismus ist bekannt. Die sich anschließenden Schritte im OC, die den Zelluntergang der Haarzellen vermitteln, bedürfen weiterer Analyse. Von der genauen Charakterisierung möglicher protektiver Agentien erhofft man sich indirekte Rückschlüsse darauf, mit welchen Mitteln sich die Zelle gegen Cisplatin-induzierte Schädigung schützen kann und damit auch darauf, mit Hilfe welcher Mechanismen diese toxische Kaskade im Anschluss an die DNA-Anlagerung in post-mitotischen Zellen wie den Haarzellen oder Neuronen fortgesetzt wird. Die medizinisch-klinische Berechtigung dieser Fragestellung gründet sich darin, dass die gewonnenen Erkenntnisse auf dem Bereich der Grundlagenforschung einen kleinen Schritt in Richtung des Designs eines protektiven Protokolls darstellen können.

Im Zusammenhang mit Cisplatin-induzierter Toxizität werden ebenfalls ein ROS-Anstieg und die konsekutive Apoptose-Induktion diskutiert<sup>7</sup>. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, inwiefern das als klassisches Antioxidans beschriebene Ubichinon die Cisplatin-vermittelten Schäden beeinflusst. Auch hier wird weiterhin die Frage untersucht, ob sich das Verhalten der verschiedenen Haarzellen oder cochleären Abschnitte voneinander unterscheidet und inwiefern die neuronalen Strukturen des OCs von dieser Behandlung beeinflusst werden. Außerdem wird untersucht, inwiefern die Behandlung mit Ubichinon die Spiegel der Apoptoseregulierenden Proteine beeinflusst.

Dass STAT3 das Schicksal einer Zelle auf weit mehr Wegen beeinflusst als auf der Aktivierung der Transkription, ist einleitend bereits angeführt worden: Serin-phosphoryliertes STAT3 ist wie Ubichinon an der Regulation der mitochondrialen Energiegewinnung beteiligt.

Aus dieser Tatsache ergibt sich die Fragestellung, ob und inwiefern das Signalmolekül STAT3 die Ubichinon-induzierten Effekte modulieren kann. Daraus ergibt sich weiterhin die Frage, inwiefern sich die simultane Behandlung mit Zytokinen und Ubichinon von der alleinigen Behandlung mit diesen Agentien unterscheidet.

Zusammenfassend beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, ob STAT3 einen Knotenpunkt in den Signalkaskaden des OCs darstellt, durch welche Substanzen und auf welche Weise STAT3 moduliert und transloziert wird und welchen Einfluss es auf apoptotische Vorgänge auf morphologischer Ebene und auf der Ebene der Proteinexpression im OC hat.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Explantation und Kultur der OCs

Die OCs wurden aus drei bis fünf Tage alten neonatalen Wistar-Ratten explantiert. Alle Präparationen erfolgten gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (Tötungsanzeige T 0234/00 „Anlegen einer organotypischen Kultur (Cochlea)“). Die OCs wurden nach dem Vorbild der durch Sobkowicz beschriebenen Methode explantiert<sup>50</sup>. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen (Heraeus Instruments LaminAir, #HBB 2442, Hanau, Deutschland). Anschließend an die Dekapitation wurden die Köpfe mit der ventralen Fläche nach unten auf sterile Mullkompressen (Fuhrmann Mullkompressen 10x10cm, #31073, Much, Deutschland) gelegt. Nachdem Oberhaut und Kopfschwarte entfernt worden waren, wurde der Schädel entlang der medianen Sagiattalebene aufgetrennt. Das Gehirn wurde entnommen, um einen freien Zugang in die *Fossa posterior* des Schädels zu gewährleisten. Der Komplex aus *Meatus acusticus internus*, *Recessus parafloccularis* und *Canalis facialis* wurde freigelegt. Die *Ossa temporalia* wurden aus den halbierten Schädeln explantiert und in Petrischalen (BD Falcon Easy Grip Tissue Culture Dish, sterilie, #353001, Franklin Lakes, USA) mit sterilem, kaltem PBS (PAA Dulbecco's PBS, #H15-002, Pasching, Österreich) überführt. Mittels eines Stereomikroskops (Zeiss Discovery V8 Stereo, Zeiss Stemi SV6, Oberkochen, Deutschland) und mit Hilfe der geeigneten, zuvor in Ethanol sterilisierten, feinchirurgischen Instrumente wurden die *Membrana tympani*, der *Anulus fibrosus*, das umgebene Knorpelgerüst und überflüssige membranöse Strukturen entfernt. Die eigentliche cochleäre Kapsel wurde freigelegt. Die umkapselten *Cochleae* wurden anschließend in weitere Petrischalen, gefüllt mit DMEM (Invitrogen DMEM/f-12 (1:1), (Ham)1x, L-Glutamine, #21331-020, Carlsbad, USA), überführt. Die *Cochlea* wurde unter mikroskopischer Sicht zunächst von ihrer knorpeligen Kapsel sowie im Anschluss ebenfalls von *Stria vascularis* und *Modiolus* befreit. Alle Explantate wurden in sterilen Vier-Well-Petrischalen (Nunc Nuclon surface 4 well plate, sterile, #176740, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert. Alle Explantate wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Sanyo CO<sub>2</sub> Inkubator, MCO-16AIC, Moriguchi, Japan). Das Grundmedium der Inkubationslösung stellte Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (Invitrogen DMEM/f-12 (1:1), (Ham)1x, L-Glutamine, #21331-020, Carlsbad, USA) dar. Es wurde im Vorfeld zu 10% mit fetalem Rinderserum (Biochrom fetal bovine serum, #S0415, Berlin, Deutschland) versetzt. Das Serum war zuvor über 30 Minuten bei 56°C Hitze-inaktiviert worden. Darüber hinaus wurden dem Medium 1,3% Glucose (Sigma Aldrich D-(+)-Glucose Solution,

#S0113, St. Louis, USA), 0,2% Penicillin G (Biochrom Penicillin G, 5000 U/ml, #A 321-42, Berlin, Deutschland), 0,2% einer Lösung aus Insulin, Transferrin und Natriumselenit (Roche Insulin-Transferrin-Natrium-Selenit-Supplement, #1074547, Rotkreuz, Schweiz) sowie 0,025% Insulin-like-Growth-Factor (R&D rhIGF-I, #291-g1, Minneapolis, USA) zugesetzt. Alle Bestandteile wurden ebenso wie das angefertigte Medium steril filtriert (Whatman Filter CA-S, 0,2µm, 7 bar max, #FP3010, Maidstone, Großbritannien).

Die explantierten OCs wurden entsprechend ihres weiteren Verwendungszwecks unterschiedlich weiterbehandelt: Explantate, die für die Immunfluoreszenz vorgesehen waren, wurden zunächst entsprechend der Windungen der *Cochlea* in ein apikales, mediales und basales Fragment zerlegt. Die Fragmente wurden anschließend in jeweils ein Well der oben beschriebenen Platten überführt und auf dem Boden des zunächst nur zur Hälfte mit Medium gefüllten Wells positioniert. Nach kurzer Adhäsionszeit hafteten die Abschnitte des Explantats flach am Boden des Wells, sodass das Well dem Zielvolumen entsprechend mit Medium aufgefüllt werden konnte. Explantate für die Western-Blot-Versuche wurden nicht in einzelne Fragmente zerteilt, sondern als intaktes, frei schwebendes Gewebe in jeweils einem Well kultiviert.

## **4.2 *Behandlung der Explantate***

Alle Behandlungen der Explantate erfolgten im oben beschriebenen Kulturmedium. Die Zugabe der Behandlungszusätze erfolgte stets unter sterilen Bedingungen und im unmittelbaren Anschluss an die Explantation. Die Explantate einer Behandlungsgruppe stammten jeweils von unterschiedlichen Tieren. Jedem Versuchsdesign wurde eine Kontrollgruppe zugeordnet, die für den gesamten Inkubationszeitraum mit purem Medium inkubiert wurde und die die gleiche Anzahl an Ohren oder Fragmenten umfasste. Die verschiedenen Versuchs-Designs wurden zwischen vier und sieben Mal wiederholt. Die Inkubation erfolgte stets bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> und endete mit dem Beginn der Proteinextraktion oder mit der Einleitung der Formalin-Fixierung.

### **4.2.1 *Cisplatin***

Cisplatin (Merck Millipore Calbiochem Cis-Diammineplatinum (II) Dichlorid, #232120, Billerica, USA) wurde zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Serva Dimethyl sulfoxide (DMSO), #20385, Heidelberg, Deutschland) zu einer Konzentration von 100mg/ml gelöst. Anschließend wurde es in RPMI-Medium (Biochrom RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin, #FG1215, Berlin, Deutschland) um den Faktor 1:100 verdünnt und aliquotiert. Die Stock-Lösung lag in der Konzentration 3,3mM beziehungsweise 1mg/ml vor. Die Explantate wurden mit Cis-

platin in einer Konzentration von 15 $\mu$ M behandelt. Den Explantatgruppen, die im zweiten Teil der Inkubation simultan mit Cisplatin behandelt werden sollten, wurde pro Versuch eine Negativ-Kontrollgruppe gegenübergestellt, die unter gleichen Bedingungen zunächst für 24 Stunden allein mit purem Medium inkubiert wurde und im Anschluss für 24 Stunden mit Cisplatin behandelt wurde.

#### **4.2.2 IL-6**

IL-6 (Promega recombinant rat Interleukin 6, #E610630, Fitchburg, USA) wurde in eine Acetoacetat-Lösung (Merck Essigsäure 100%, #100063, Schwalbach, Deutschland) gegeben. Es entstand eine Stammlösung mit einer IL-6-Konzentration von 10 $\mu$ g/ml. Im Vorfeld wurde aus Acetoacetat eine 100mM Lösung in Ampuwa-Wasser (Fresenius Kabi Ampuwa Wasser, #2159615, Bad Homburg, Deutschland) hergestellt. Die Konzentration des Acetoacetats im Well betrug nach Verdünnung des IL-6 0,33mM. Die Behandlung mit IL-6 erfolgte stets in einer Konzentration von 30ng/ml. Die alleinige Inkubation mit IL-6 erfolgte für 15 und 30 Minuten sowie für sechs und 14 Stunden. Eine weitere Gruppe wurde für 48 Stunden mit IL-6 inkubiert, wobei die Explantate zunächst für 24 Stunden mit IL-6 präinkubiert wurden und für die letzten 24 Stunden simultan mit Cisplatin in einer Konzentration von 15 $\mu$ M behandelt wurden.

#### **4.2.3 OSM**

OSM (Promega recombinant rat Oncostatin M, #E65020, Fitchburg, USA) wurde in Ampuwa-Wasser gelöst. Es entstanden Aliquots mit einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml. Die OSM-Behandlung der Explantate erfolgte in einer Konzentration von 30ng/ml. Die Explantate wurden für 15 und 30 Minuten sowie für sechs und 14 Stunden allein mit OSM inkubiert. Darüber hinaus erfolgte eine Behandlung für 48 Stunden in derselben Konzentration, wobei die Explantate für die letzten 24 Stunden simultan mit Cisplatin in einer Konzentration von 15 $\mu$ M inkubiert wurden.

#### **4.2.4 Ubichinon**

Die Ubichinon-Stammlösung (MSE Pharma 30ml Q10 Sanomit, PZN-09 78 007, Bad Homburg, Deutschland) wurde unverdünnt, das heißt in einer Konzentration von 50mg/ml, aliquotiert. Die Explantate wurden für sechs oder 14 Stunden gegenüber Ubichinon der Konzentration von 50 $\mu$ g/ml exponiert. Es erfolgten allerdings ebenfalls eine 24-stündige, alleinige Inkubation mit Ubichinon derselben Konzentration sowie eine simultane, 24-stündige Präinkubation mit

IL-6 und OSM, jeweils in einer Konzentration von 30ng/ml. An beide 24-stündigen Inkubationen schloss sich eine 24-stündige simultane Inkubation mit Cisplatin in einer Konzentration von 15 $\mu$ M an, sodass der Inkubationszeitraum der Explantate insgesamt 48 Stunden betrug.

#### **4.2.5 *STAT3 Inhibitor III WP 1066***

Der STAT3-Inhibitor III WP 1066 (Merck Millipore Calbiochem STAT3-Inhibitor III WP 1066, #573097, Billerica, USA) wurde in Ethanol (Merck Ethanol absolut, #100983, Schwalbach, Deutschland) gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 5mg/ml beziehungsweise 14mM. Die Explantate wurden für 48 Stunden mit WP 1066 in einer Konzentration von 5,6 $\mu$ M inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl allein, als auch simultan mit IL-6 und OSM in den Konzentrationen von 30ng/ml oder mit Ubichinon der Konzentration 50 $\mu$ g/ml. Den simultan inkubierten Behandlungsgruppen wurde in den letzten 24 Stunden darüber hinaus Cisplatin in einer Konzentration von 15 $\mu$ M zugesetzt.

### **4.3 *Western Blotting***

#### **4.3.1 *Proteinextraktion der Explantate***

Explantierte OCs, die zur Bestimmung der Spiegeländerungen von STAT3 und seinen Phosphorylierungsprodukten vorgesehen waren, wurden nach Ablauf der Inkubationszeiten in Zelllysispuffer des Kern- und Zytoplasma-Protein-Extraktionskits (Fermentas ProteoJET Cytoplasmatic and Nuclear Protein Extraction Kit, #K0311, Burlington, Kanada) überführt. Alle Reaktionspuffer des Kits wurden im Vorfeld mit zehnfachen Protease- (Roche Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, #04693159001, Rotkreuz, Schweiz) und Phosphataseinhibitoren (Roche PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Coctail Tablets, #04906845001, Rotkreuz, Schweiz) versetzt. Außerdem wurde den Puffern unmittelbar vor der Versuchsdurchführung der den Herstellerangaben entsprechende Anteil 0,1M Dithiothreitol zugesetzt. Die Explantate wurden zunächst mittels eines Mikropistills im Zelllysispuffer grob zerkleinert, gevortext, im Anschluss mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, Deutschland) für fünf Sekunden bei 40% Power und kontinuierlichen Schall fein homogenisiert. Die Homogenisate wurden anschließend bei 4°C und 500g für sieben Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland). Das Pellet wurde bei 4°C zwischengelagert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 20.000g für 15 Minuten zentrifugiert. Der neu gewonnene Überstand wurde als Zytoplasmaproteinfraktion bei -80°C gelagert.

Währenddessen wurde das zwischengelagerte Pellet im Kernwaschpuffer resuspendiert, gevortext, zwei Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension bei 4°C und 500g für sieben Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Vorgehen einmal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde in Kernlagerungspuffer resuspendiert und zu 1/10 mit Kernlysispuffer versetzt. Bei 4°C und unter regelmäßigem Vortexen wurde die Suspension 15 Minuten inkubiert und im Anschluss bei 4°C und 20.000g für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -80°C als Kernproteinfraktion gelagert.

Nach abgeschlossener Inkubation wurden Explantate, die zur Spiegelbestimmung der Apoptose-regulierenden Proteine vorgesehen waren, in Triple-Lysis-Puffer (RIPA) (50mM Tris-HCl, 150mM Natriumchlorid, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 0,1%, Natriumdodecylsulfat, 1% NP 40) (pH 7,5) gegeben. Der Puffer war im Vorfeld mit Proteaseinhibitor versetzt worden. Die Explantate wurden im Puffer mittels eines Mikropistills zunächst grob und mittels Ultraschalls, wie oben beschrieben, anschließend fein homogenisiert. Die Zell-Lysate wurden im Anschluss für 15 Minuten auf Eis gelagert und daraufhin für 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

#### ***4.3.2 Ermittlung der Proteinkonzentrationen und Anfertigung der Arbeitslösungen***

Die zur Bestimmung der Apoptose-regulierenden Proteine vorgesehenen Explantatproben wurden mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific Micro BCA Protein Assay Kit, #23235, Waltham, USA) auf ihre Proteinkonzentration hin untersucht. Alle Proben und die Albumin-Standardreihe wurden auf eine Multiwellplatte pipettiert. Die Lysate der jeweiligen Behandlungsgruppe wurden den Herstellerangaben entsprechend mit den Arbeitslösungen versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, wobei die Platte für die ersten 30 Sekunden bei 300rpm geschwenkt wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion mit Hilfe des Spectra Max M2 Photometers bei 562nm bestimmt (Molecular Devices Spectra Max M2 Multi-Mode Microplate Reader, Sunnyvale, USA). Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der Standardreihe im Programm SoftMax Pro (Molecular Devices SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software, Sunnyvale, USA) berechnet. Die Proteinkonzentrationen der Explantateproben, die zur Analyse des Levels von STAT3 und seiner Phosphorylierungsprodukte bestimmt waren, wurden mittels eines anderen Kits bestimmt (Thermo Fisher Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, #23227, Waltham, USA). Die Vorgehensweise gleicht der im Rahmen des anderen Kits bis darauf, dass die Platte für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde.

Aus den Explantat-Lysaten, die für die Analyse der pro- und antiapoptotischen Proteine erstellt wurden, wurden für die anschließende Gelelektrophorese Arbeitslösungen mit einer Proteinmasse von jeweils 20µg hergestellt. Die Lösungen wurden darüber hinaus zu 25% mit einem Bromphenolblau- und Glycerin-haltigen Protein-Gelladepuffer (Carl Roth 4x Roti Load-1, #K929.1, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die erstellten Mixe wurden über fünf Minuten bei 95°C denaturiert, im Anschluss für zehn Minuten auf Eis heruntergekühlt und bei -80°C gelagert. Aus den Explantat-Lysaten, die für die Analyse der STAT3-Spiegeländerungen vorgesehen waren, wurden Arbeitslösungen mit einer Proteinmasse von jeweils 18µg hergestellt. Die Arbeitslösungen wurden zu 20% mit dem genannten Gelladepuffer versetzt und wie oben beschrieben gelagert.

### **4.3.3 Elektrophorese, Blotting, Blocking und Antikörperinkubationen**

Der unfraktionierte und der zytoplasmatische Anteil der Explantat-Lysate wurden durch Elektrophorese auf Tris-HEPES-SDS-Polyacrylamid-Gelen (Thermo Fisher Scientific 4-20% Pierce Protein Gel, #25204, Waltham, USA; Thermo Scientific 8-16% Precise Protein Gel, #25243, Waltham, USA) in gekühltem Tris-HEPES-SDS-Puffer (Thermo Fisher Scientific 20x Tris-HEPES-SDS-Buffer, #28368, Waltham, USA) bei 100V in 90 Minuten nach Molekulargewicht aufgetrennt. Die Kernproteinproben der Explantate wurden bei 130V im Trenngel (12,5%) und bei 150V im Sammelgel-Bereich (5%) eines selbst angefertigtem Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gels über 90 Minuten hinweg in gekühltem Tris-Glycin-SDS-Puffer (BioRad Tris-Glycin-SDS-Buffer, #161-0772, Hercules, USA) elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Molekular-Gewichtsmarker (Fermentas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, #SM1811, Burlington, Kanada) wurde jeweils parallel elektrophoretisch aufgetrennt. Alle Proteinfractionen wurden bei 300mA in 30 Minuten elektrisch (Invitrogen XCell II Blot Module, #EI9051, Carlsbad, USA) in Tris-Glycin-SDS-Puffer auf Nitrocellulose-Membranen (BioRad Nitrocellulose Membrane, 0,2µm, #162-0112, Hercules, USA) überführt. Im Anschluss wurden die Membranen für zwei Minuten in einer *Ponceau*-Lösung inkubiert. Anhand der Färbung der Proteinbanden wurde ihre ordnungsgemäße Auftrennung überprüft. Nach einer Waschung mit destilliertem Wasser wurden die Blots zum Blocken für 60 Minuten bei Raumtemperatur in PBS mit 5% fettfreier Milch (Roth Milchpulver Blotting Grade, fettarm, #T145.2, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1% Tween® 20 (Promega Tween® 20, #5151, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Alle primären und sekundären Antikörper wurden in PBS mit 5% fettfreier Milch und 0,1% Tween 20 verdünnt. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte entweder für zwei Stunden bei Raum-

temperatur oder über Nacht bei 4°C, in beiden Fällen unter kontinuierlichem Schwenken.

Die Blots der zytoplasmatischen und nukleären Explantat-Proteinfraktion, die zur Spiegelbestimmung von STAT3 und seinen Phosphorylierungsprodukten vorgesehen waren, wurden mit Lösungen behandelt, die Kaninchen-Anti-STAT3-Antikörper (Cell Signaling Technology Stat3 rabbit Antibody, #9132, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in einer 1:500 Verdünnung oder monoklonalen Kaninchen-Anti-Phospho-Tyrosin-STAT3-Antikörper (Cell Signaling Technology Phospho-Stat3 (Y705) (D3A7) XP Rabbit mAb, #9145S, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in derselben Verdünnung enthielten. Die Blots der Zytoplasmafraktion wurden darüber hinaus mit Kaninchen-Anti-Phospho-Serin-STAT3-Antikörper (Cell Signaling Technology Phospho-Stat3 (Ser727) rabbit Antibody, #9134, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in einer 1:500 Verdünnung inkubiert. Explantat-Lysate, die zur Untersuchung Apoptose-regulierender Proteine vorgesehen waren, wurden mit folgenden Antikörpern inkubiert: Mit monoklonalem Kaninchen-Anti-AIF-Antikörper (Cell Signaling Technology AIF (D39D2) XP Rabbit mAb, #5318, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in der Verdünnung 1:1.000, mit Kaninchen-Anti-Bax-Antikörper (Cell Signaling Technology Bax Antibody Rabbit, #2772, Cambridge, Vereinigtes Königreich) ebenfalls in einer 1:1.000 Verdünnung, mit 1:1.000 verdünntem, monoklonalem Kaninchen-Anti-BCL-2-Antikörper (Cell Signaling Technology BCL-2 (50E39) Rabbit mAb, #2870, Cambridge, Vereinigtes Königreich), mit monoklonalem Kaninchen-Anti-Survivin-Antikörper (Cell Signaling Technology Survivin (71G4B7) Rabbit mAb, #2808, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in einer 1:1.000 Verdünnung und mit Maus-Anti-BCL-X-Antikörper (Becton Dickinson Transduction Laboratories Purified mouse anti-BCL-X, #610210, Franklin Lakes, USA), der im Vorfeld um den Faktor 500 verdünnt worden war. Die Blots der zytoplasmatischen und nukleären Explantat-Proteinfraktion wurden zudem mit monoklonalem Maus-Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (Sigma Aldrich Mouse Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin antibody, #A5441, St. Louis, USA) in einer Verdünnung von 1:20.000 behandelt. Die Blots der Kernproteinfraktionen wurden hingegen mit Kaninchen-Anti-Histon-H3-Antikörper (Merck Millipore Rabbit Anti-Histone H3 Antibody, #06-755, Billerica, USA) (Verdünnung 1:5.000) inkubiert. Die Blots wurden im Anschluss an die Inkubation für drei Mal 30 Minuten in PBS mit 0,1% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur für eine Stunde und unter leichtem Schwenken mit einem gegen die Herkunfts-Spezies des Primärantikörpers gerichteten, Meerrettichperoxidase-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert: mit Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörpern (Cayman Chemical Goat anti-Rabbit IgG HRP, #10004301, Ann Arbor, USA) (Verdünnung 1:5.000), (Cell Signaling Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074, Cambridge, Vereinigtes Königreich) (Verdünnung 1:5.000) oder mit Ziege-Anti-Maus-

Antikörpern (Promega Anti-Mouse IgG (H+L), HRP conjugate, #W4021, Fitchburg, USA) (Verdünnung 1:10.000), (BD Pharmingen Goat anti-Mouse Ig -HRP, #554002, Franklin Lakes, USA) (Verdünnung 10.000). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Blots erneut für drei Mal 30 Minuten in PBS mit 0,1% Tween 20 gewaschen.

#### ***4.3.4 Entwicklung und Auswertung***

Das Fluoreszenzsignal der entstandenen Immunkomplexe belichtete vermittelt durch ein Chemilumineszenz-Detektionssystem (GE Healthcare ECL Plus Western Blotting Detection System, #RPN2132, Fairfield, USA) einen Chemilumineszenzfilm (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescence Film, #28906837, Fairfield, USA). Die belichteten Areale wurden durch Entwicklung (AGFA Healthcare Entwickler, #G138i, Mortsel, Belgien) und Fixierung (AGFA Healthcare Fixierer, #334i, Mortsel, Belgien) sichtbar gemacht. Die Exposition gegenüber dem Film, die Entwicklung und die Fixierung erfolgten in einer Dunkelkammer. Die Expositionszeiten wurden der jeweiligen Signalstärke der Banden angepasst. Die entwickelten Filme wurden mit Hilfe eines Scanners digitalisiert und dokumentiert. Die Bandenintensität auf den digitalen Bildern wurde mittels der densitometrischen Software Gelscan Pro V (BioTec Gelscan Pro V 5.0, Frankfurt, Deutschland) ermittelt. Die verschiedenen Bandenintensitäten wurden für die unfraktionierten und zytoplasmatischen Lysate durch die Bandenintensitäten von  $\beta$ -Aktin dividiert. Die gemessenen Intensitäten der Banden der Kernfraktion wurden durch die Bandenintensitäten von Histon H3 dividiert. Die Quotienten der verschiedenen Behandlungsgruppen wurden wiederum durch die der Kontrollgruppe dividiert.

### ***4.4 Fluoreszenzfärbung, Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung***

#### ***4.4.1 Fixation und Fluoreszenzfärbung***

Die Fragmente der OCs wurden für 40 Minuten bei Raumtemperatur mit 10%-iger Formalinlösung (Sigma Aldrich Formalin solution 10% neutral buffered, #HT 5011, St. Louis, USA) fixiert und anschließend zweifach mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Fragmente in einer PBS-Spülpufferlösung mit 0,5% Triton X-100 (Ferak Triton X-100, #505002, Berlin, Deutschland) bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss an einen Wasch-Schritt mit PBS wurden die Fragmente für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Präinkubationslösung, die neben PBS zu 4% Ziegen Serum (Jackson Dianova Normal Goat Serum, #005-000-121, Hamburg, Deutschland) enthielt, behandelt. Nachdem sie in PBS gewaschen

worden waren, wurden die Fragmente bei 4°C über Nacht in einer Reaktionspuffer-Lösung aus PBS, 0,1% Triton X-100, 2% Natriumchlorid, 1% Ziegen Serum und 0,1% Maus-Anti-alpha-Neurofilament 200-Antikörper (Sigma Aldrich anti-alpha neurofilament 200 IgG (mouse), #N0142, St. Louis, USA) inkubiert. Die Fragmente wurden anschließend für drei Mal 30 Minuten in PBS-Bädern gewaschen. Eine Lösung aus dem beschriebenen Reaktionspuffer und 0,1% Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor 633 Antikörper (Invitrogen Alexa Fluor 633 goat anti mouse IgG, #21050, Carlsbad, USA) wurde für zehn Minuten bei 14.000U zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland). Die Fragmente wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem gewonnenen Überstand inkubiert, mit PBS gereinigt und für drei Mal 30 Minuten in PBS-Bädern gewaschen. Anschließend wurden die Fragmente für 45 Minuten mit einer 2,5%igen Lösung von Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen Alexa Fluor 488-Phalloidin, #12379, Carlsbad, USA) in PBS behandelt, zweifach mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur in einer 1:5.600 Verdünnung von Hoechst 33342 (Anaspec Hoechst 33342, #83218, Fremont, USA) in PBS für 15 Minuten inkubiert. Nach zwei Waschschritten in PBS wurden die Fragmente vorsichtig vom Boden der Wells gelöst und unter lichtmikroskopischer Kontrolle einzeln auf Glas-Objektträger (VWR Adhäsionsobjektträger, Superfrost® Plus, #631-0108, Darmstadt, Deutschland) überführt. Im Anschluss wurden die Fragmente in eine Antifading-Reagenz namens Prolong Gold (Invitrogen Prolong Gold, #36930, Carlsbad, USA) eingebettet und mit einem Deckgläschen (Gerhard Menzel Deckgläser, #BB022050A1, Braunschweig, Deutschland) abgedeckt.

#### **4.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung**

Die Fragmente der OCs wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIL, Wetzlar, Deutschland) 400-fach vergrößert dargestellt, betrachtet und analysiert. Das Mikroskop verfügte über Filter, die der Darstellung von Alexa Fluor 488 entsprechen (Exzitation: 495nm, Emission: 518nm). Die Haarzellen wurden pro Fragment dreifach - jeweils auf einer Strecke von 100µm - ausgezählt. Innere und äußere Haarzellen wurden getrennt betrachtet, wobei die Scores der ersten, zweiten und dritten Reihe der äußeren Haarzellen zu einem Gesamtscore der äußeren Haarzellen addiert wurden. Haarzellen wurden als intakt evaluiert, wenn unversehrte und regulär angeordnete Stereozilien vorlagen. Als fehlend wurden Haarzellen eingeschätzt, die eine Lücke in der regelrechten Traktorspur-artigen Anordnung der Haarzellreihen hinterließen und für die sich keinerlei Stereozilien erkennen ließen. Als defekt wurden Haarzellen eingeordnet, die zwar keine Lücke in der Formation darstellten, aber deren Stereozilien auch nicht die reguläre Mor-

phologie zeigten und sich beispielsweise als abgeknickt, verkürzt, ausgefranst oder miteinander verklebt darstellten. In die Auswertung wurden lediglich Fragmente mit einbezogen, deren morphologische Veränderungen sich nicht aus äußeren, beispielweise mechanischen Einwirkungen, während der Präparation oder Kultivierung erklären ließen. Repräsentative Fragmente einer Behandlungsgruppe wurden zudem mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (Leica TCS SPE, Wetzlar, Deutschland) und dessen 40er oder 63er Objektivs über die ganze Höhe des Präparats abgescannt. Aus den stärksten Signalen der Alexa Fluor 488-Färbung über alle Z-Ebenen hinweg wurde ein Bild berechnet, dargestellt und dokumentiert.

Neben der Dokumentation des Haarzellzustands repräsentativer Fragmente erfolgte auf diese Art ebenfalls die Darstellung der Alexa Fluor 633-konjugierten alpha Neurofilament 200-Färbung (Exzitation: 632nm, Emission: 647nm). Anhand der aufgenommenen Bilder wurden für alle Fragmente, auf jeweils drei 100µm langen Abschnitten, die dargestellten neuronalen Fortsätze ausgezählt. Repräsentative Fragmente wurden ebenfalls dokumentiert.

#### **4.5 Statistik**

Die Ermittlung von Kenngrößen der deskriptiven Statistik erfolgte mittels des Programms Microsoft Excel 2010. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe derselben Software durch sogenannte „Box-Whisker-Plots“. Diese auch als „Kastengrafik“ bezeichnete Darstellungsform beinhaltet als Kennwerte das Maximum, das 3. Quartil, den Median, das 1. Quartil sowie das Minimum und damit automatisch auch die Spannweite und den Interquartilsabstand.

Alle Datensätze wurden mit Hilfe der Analysefunktion von Sigma Plot (Systat Software Inc Sigma Plot Version 12.5) ausgewertet. Alle Daten wurden zunächst durch den Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht sowie auf die Gleichheit der Varianzen analysiert. Umfasste der Datensatz mehr als zwei zu vergleichende Gruppen und lagen die Daten sowohl normalverteilt als auch mit Gleichheit der Varianzen vor, wurden sie mit einer einfachen ANOVA (Equal Variance Test) auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Zeigten die Daten keine Normalverteilung oder lediglich eine Normalverteilung ohne Gleichheit der Varianzen, testeten wir sie mit Hilfe einer einfachen ANOVA für Rangsummen (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) auf statistisch signifikante Unterschiede.

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der  $p$ -Wert 0,05 unterschritt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss der Zytokine und des Ubichinons auf Cisplatin-induzierte Ototoxizität

Um den Einfluss von IL-6, OSM und Ubichinon auf die Haarzellen und Neuronenfortsätze gegenüber Cisplatin-induzierter Ototoxizität zu untersuchen, wurden Explantate für 48 Stunden mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] oder bzw. gleichzeitig mit Ubichinon [50µg/ml] inkubiert. In den letzten 24 Stunden erfolgte die Inkubation jeweils simultan mit Cisplatin [15µM]. Dem gegenübergestellt wurden Explantate, die für 24 Stunden mit Kulturmedium und im Anschluss für 24 Stunden simultan mit Cisplatin behandelt wurden. Explantate, die für 48 Stunden mit Medium behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe.

Zunächst konnte die Cisplatin-induzierte Ototoxizität experimentell bestätigt werden. Abb.1 zeigt die Haarzell-Morphologie als Folge der beschriebenen Behandlungszusätze. Abb.2 stellt die Mediane der Zählungen der inneren Haarzellen dar, Abb.3 zeigt die Mediane der Zählungen der äußeren Haarzellen. Die inneren und äußeren Haarzellen des apikalen (IHC: Median=3, IQR=3 vs. Median=12, IQR=1; OHC: Median=9, IQR=6,75 vs. Median=48, IQR=2) (Abb.2A, 3A), medialen (IHC: Median=2, IQR=2 vs. Median=12, IQR=1,25; OHC: Median=11, IQR=7 vs. Median=47,5, IQR=2) (Abb.2B, 3B) und basalen (IHC: Median=2, IQR=3 vs. Median=11, IQR=2; OHC: Median=8, IQR=12 vs. Median=47, IQR=6) (Abb.2C, 3C) Abschnitts wurden durch die Inkubation mit Cisplatin gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant geschädigt (Abb.1) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die Schädigung zeigte sich im medialen und basalen Abschnitt der OCs deutlicher als im apikalen Fragment (Abb.1, 2). Die äußeren Haarzellen des medialen Fragments wurden weniger stark geschädigt als die des apikalen und basalen Fragments (Abb.3). Im apikalen und basalen Fragment waren die äußeren Haarzellen stärker von der Schädigung betroffen als die inneren, im medialen Fragment verhielt es sich umgekehrt (Abb.2, 3).

Im Anschluss wurde der Einfluss von IL-6, OSM und Ubichinon auf die Cisplatin-induzierte Ototoxizität untersucht. Die inneren Haarzellen wurden im apikalen (Ubichinon: Median=7, IQR=2; IL-6: Median=7, IQR=1,5; OSM: Median=9, IQR=3 jeweils vs. Median=3, IQR=3) (Abb.2A), medialen (Ubichinon: Median=6, IQR=1; IL-6: Median=5, IQR=3,5; OSM: Median=6,5, IQR=2,25 jeweils vs. Median=2, IQR=2) (Abb.2B) und basalen (Ubichinon: Median=6, IQR=4,5; IL-6: Median=6, IQR=2; OSM: Median=6, IQR=1,25 jeweils vs. Median=2, IQR=3) (Abb.2C) Abschnitt der OCs durch die Präinkubation mit IL-6, OSM und Ubichinon

statistisch signifikant vor dem ototoxischen Einfluss Cisplatins geschützt (Abb.1) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Auch die äußeren Haarzellen wurden im apikalen (Ubichinon: Median=33, IQR=8,5; IL-6: Median=30, IQR=13; OSM: Median=35, IQR=6 jeweils vs. Median=9, IQR=6,75) (Abb.3A), medialen (Ubichinon: Median=26, IQR=13,75; IL-6: Median=29,5, IQR=11,5; OSM: Median=26, IQR=11 jeweils vs. Median=11, IQR=7) (Abb.3B) und basalen (Ubichinon: Median=23,5, IQR=17,5; IL-6: Median=22, IQR=25; OSM: Median=25, IQR=13 jeweils vs. Median=8, IQR=12) (Abb.3C) Abschnitt statistisch signifikant vor Cisplatin geschützt (Abb.1) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die inneren Haarzellen der medialen und basalen Fragmente profitierten insgesamt stärker von der Protektion als die des apikalen Fragments (Abb.1, 2). Die äußeren Haarzellen des apikalen Fragments wurden durch die Behandlung mit IL-6, OSM und Ubichinon stärker vor Cisplatin-Ototoxizität geschützt als die des medialen und basalen Fragments (Abb.1, 3). Innere und äußere Haarzellen wurden durch die Zusätze gleichermaßen vor Cisplatin-induzierten Schäden geschützt.

Innere Haarzellen, die simultan mit IL-6 und Ubichinon oder OSM und Ubichinon inkubiert wurden, wurden im apikalen (IL-6+Ubichinon: Median=8, IQR=2,833; OSM+Ubichinon: Median=10, IQR=1,75 jeweils vs. Median=3, IQR=3) (Abb.2A), medialen (IL-6+Ubichinon: Median=7, IQR=2,5; OSM+Ubichinon: Median=8, IQR=4,5 jeweils vs. Median=2, IQR=2) (Abb.2B) und basalen (IL-6+Ubichinon: Median=6, IQR=1,25; OSM+Ubichinon: Median=6, IQR=2,75 jeweils vs. Median=2, IQR=3) (Abb.2C) Fragment statistisch signifikant vor Cisplatin geschützt ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Auch äußere Haarzellen wurden in der apikalen (IL-6+Ubichinon: Median=31, IQR=19; OSM+Ubichinon: Median=39,5, IQR=17,25 jeweils vs. Median=9, IQR=6,75) (Abb.3A), medialen (IL-6+Ubichinon: Median=30, IQR=1; OSM+Ubichinon: Median=33, IQR=8 jeweils vs. Median=11, IQR=7) (Abb.3B) und basalen (IL-6+Ubichinon: Median=24,5, IQR=4,5; OSM+Ubichinon: Median=26,5, IQR=15,75 jeweils vs. Median=8, IQR=12) (Abb.3C) Windung statistisch signifikant geschützt ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die inneren Haarzellen wurden im apikalen Fragment durch die simultane Inkubation mit OSM und Ubichinon statistisch signifikant besser vor Cisplatin-induzierten Schäden geschützt als durch die alleinige Präinkubation mit Ubichinon (Median=9, IQR=3 vs. Median=7, IQR=2) (Abb.2A) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn).

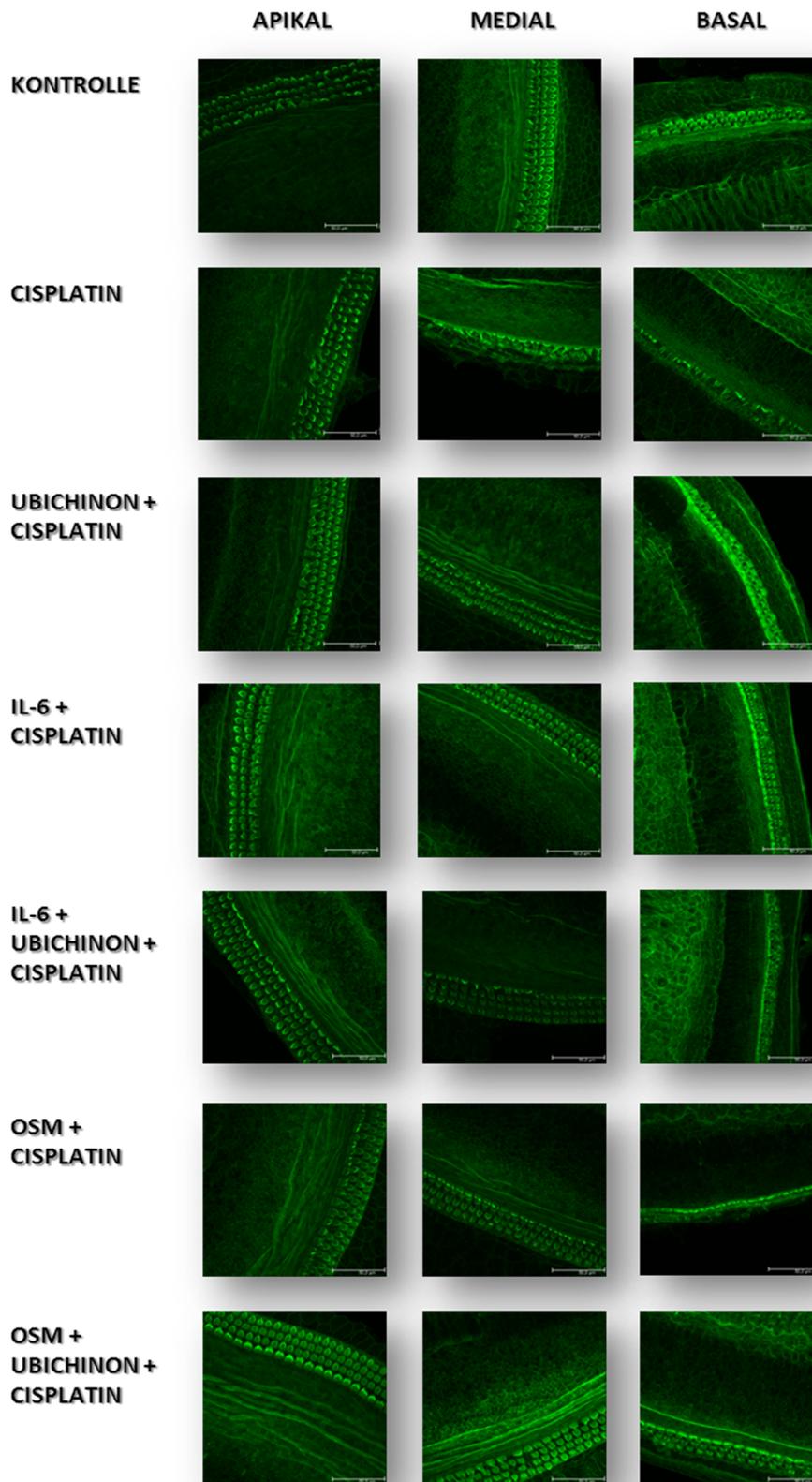
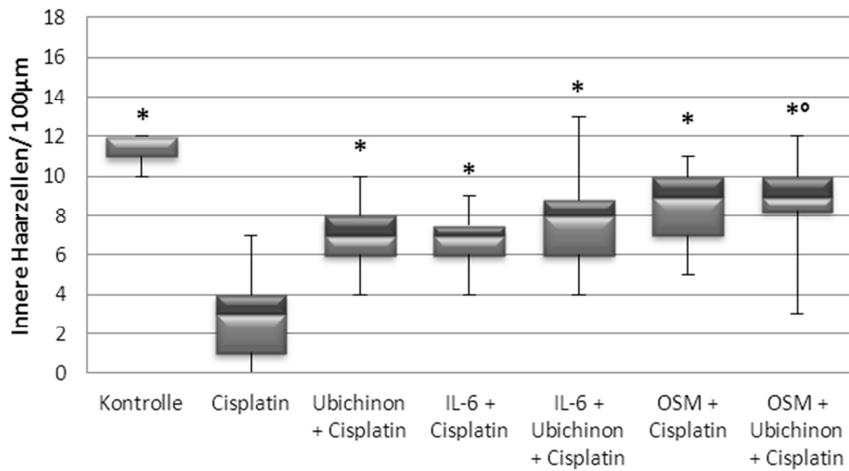
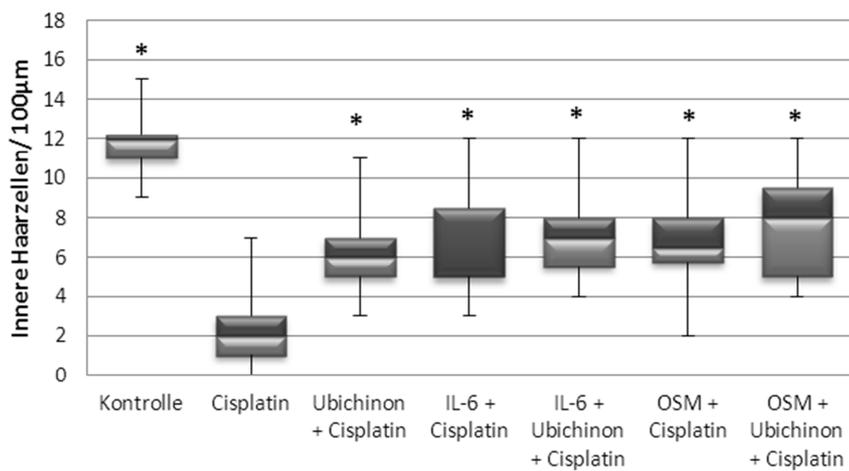


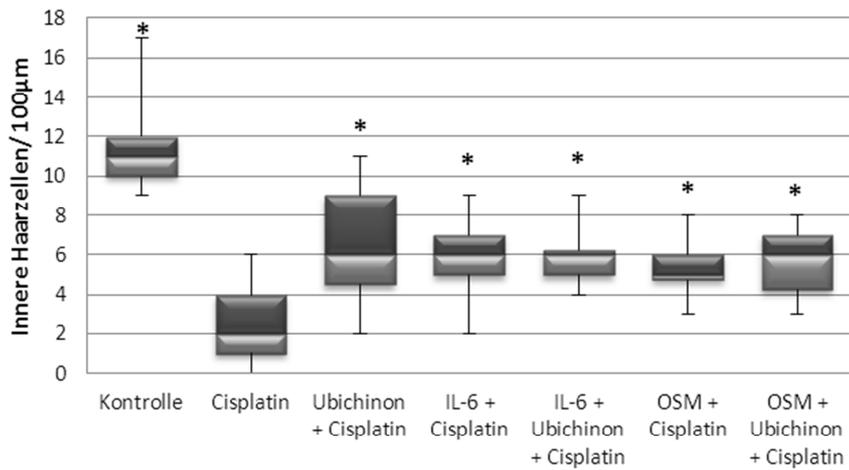
Abb. 1 Repräsentative Konfokal-Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Alexa Fluor 488-konjugierten Phalloidin-markierten Haarzellen der apikalen, medialen und basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 7-12.



(A)



(B)



(C)

Abb. 2 Anzahl der inneren Haarzellen pro 100µm des (A) apikalen, (B) medialen und (C) OC-Fragments, die für 24h Stunden mit IL-6[30ng/ml], OSM[30ng/ml] und bzw. oder Ubichinon[50µg/ml] präinkubiert und für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar, die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. ° $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Ubichinon + Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 7-12.

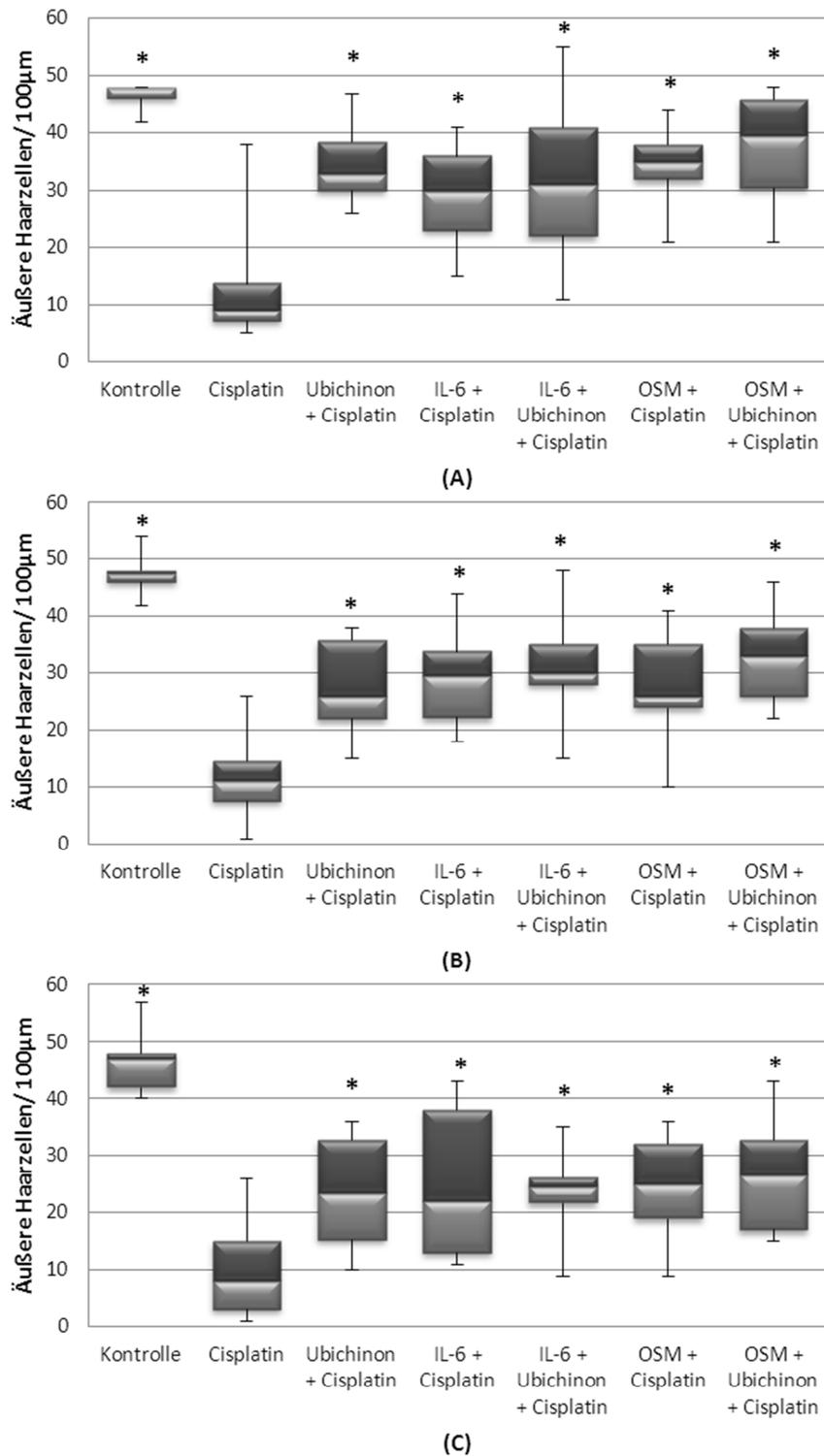


Abb. 3 Anzahl der äußeren Haarzellen pro 100µm des (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen OC-Fragments, die für 24h Stunden mit IL-6[30ng/ml], OSM[30ng/ml] und bzw. oder Ubichinon[50µg/ml] präinkubiert und für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 7-12.

Abb.4 stellt die Morphologie der neuronalen Fortsätze, Abb.5 die Mediane der Anzahl der neuronalen Fortsätze der einzelnen Behandlungsgruppen dar. Die Anzahl der neuronalen Fortsätze wurde durch Cisplatin gegenüber der Kontrollgruppe in allen Fragmenten (Apikal: Median=8, IQR=3 vs. Median=14, IQR=2,5; Medial: Median=9, IQR=2 vs. Median=14, IQR=2,25; Basal: Median=8, IQR=2,25 vs. Median=14, IQR=3,25) (Abb.5) statistisch signifikant reduziert ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die Schädigung zeigte sich im medialen Fragment weniger deutlich als im apikalen und basalen Fragment (Abb.4, 5).

OSM und Ubichinon schützten die neuronalen Fortsätze des apikalen Fragments, im Gegensatz zu IL-6, statistisch signifikant vor Cisplatin (Ubichinon: Median=16, IQR=3; OSM: Median=12, IQR=3 jeweils vs. Median=8, IQR=3) (Abb.5A), im medialen Fragment erzielte die Inkubation mit IL-6 und Ubichinon, anders als die mit OSM, statistisch signifikante Protektion gegenüber Cisplatin (Ubichinon: Median=14,5, IQR=3; IL-6: Median=12, IQR=2 jeweils vs. Median=9, IQR=2) (Abb.5B) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Durch Ubichinon- und OSM-Behandlung konnte im basalen Fragment, gegensätzlich zur Behandlung mit IL-6, eine statistisch signifikante Reduktion der Schädigung erreicht werden (Ubichinon: Median=12, IQR=2,5; OSM: Median=10, IQR=2 jeweils vs. Median=8, IQR=2,25) (Abb.5C) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn).

Fragmente, die simultan mit einem der Zytokine und Ubichinon inkubiert wurden, wiesen für das apikale (Ubichinon+IL-6: Median=13, IQR=3; Ubichinon+OSM: Median=13, IQR=2 jeweils vs. Median=8, IQR=3) (Abb.5A), mediale (Ubichinon+IL-6: Median=13, IQR=4; Ubichinon+OSM: Median=13, IQR=3 jeweils vs. Median=9, IQR=2) (Abb.5B) und basale (Ubichinon+IL-6: Median=12, IQR=3; Ubichinon+OSM: Median=11, IQR=4 jeweils vs. Median=8, IQR=2,25) (Abb.5C) Fragment eine statistisch signifikante Protektion auf ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Im apikalen Fragment schützte die simultane Inkubation mit Ubichinon und IL-6 die Neuronenfortsätze statistisch signifikant besser als die alleinige Inkubation mit IL-6 (Median=13, IQR=2 vs. Median=11, IQR=2,5) (Abb.5A), im medialen Fragment verhielt es sich gleich mit der gleichzeitigen Inkubation mit Ubichinon und OSM gegenüber der puren Behandlung mit OSM (Median=13, IQR=3 vs. Median=11, IQR=2) (Abb.5B) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die Protektion zeigte sich im apikalen Fragment am deutlichsten.

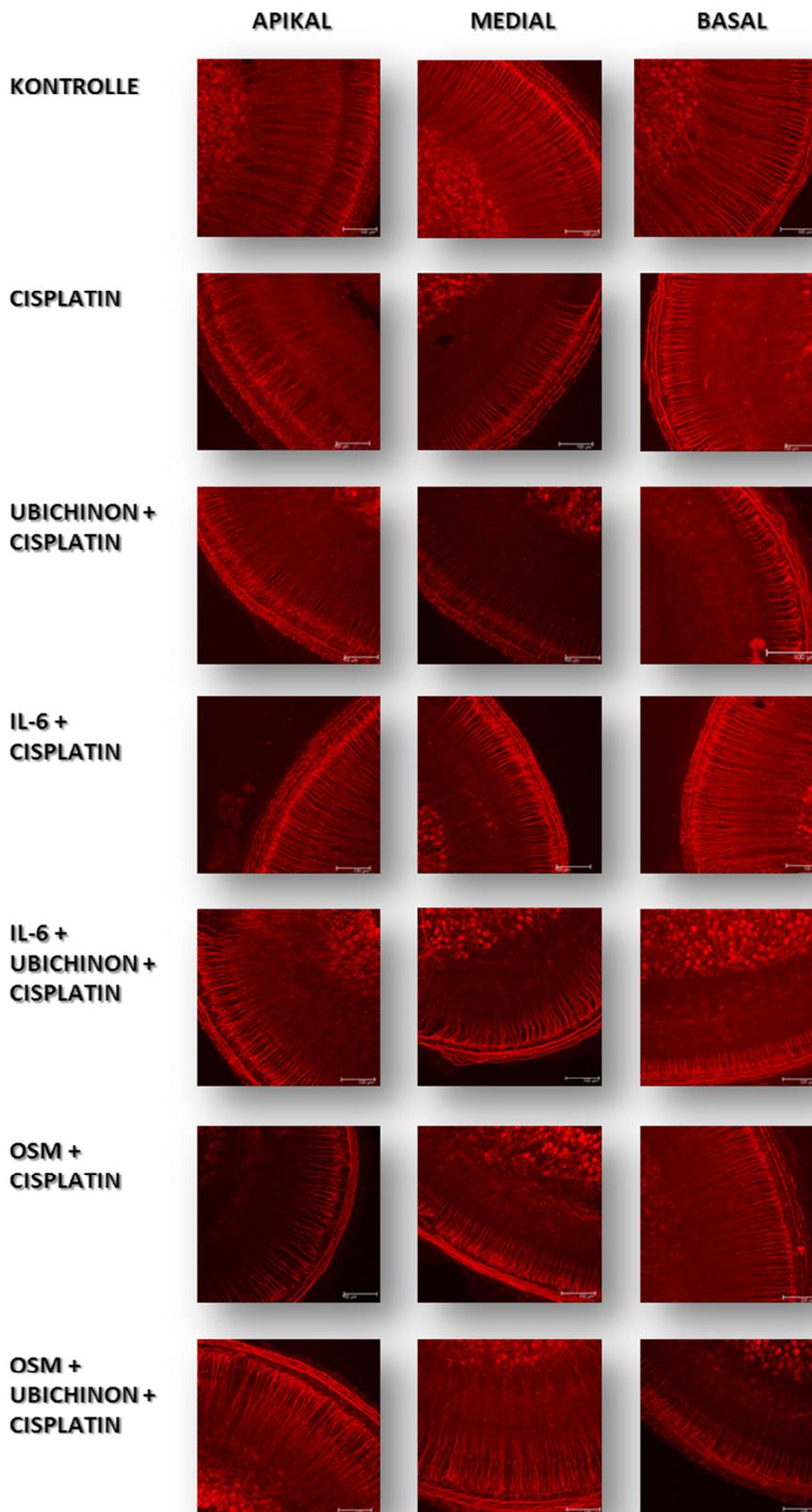


Abb. 4 Repräsentative Konfokal-Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Alexa Fluor 633-markierten Neuronenfortsätzen der apikalen, medialen und basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 8-12.

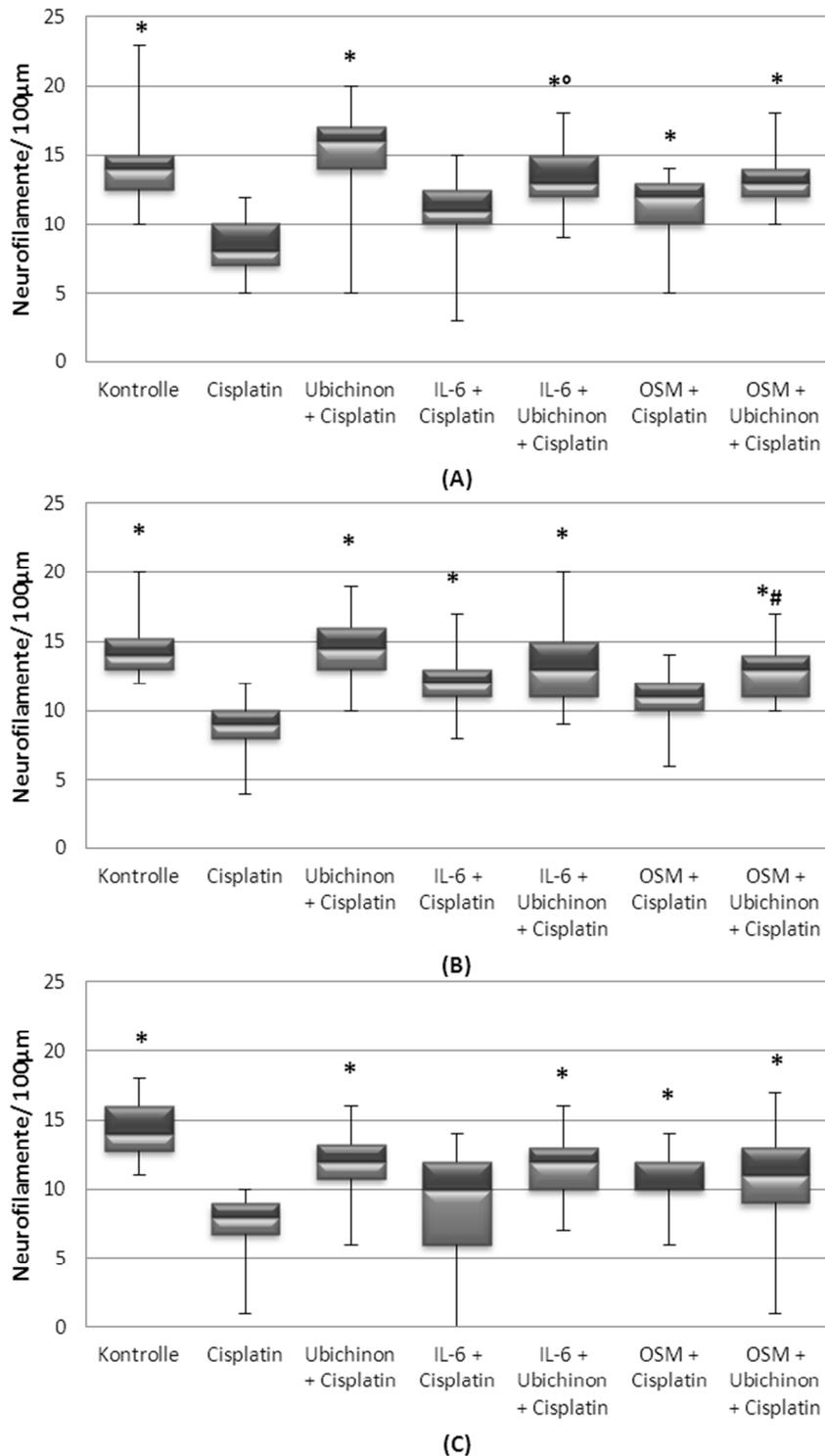


Abb. 5 Anzahl der Neuronenfortsätze pro 100µm der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen OC-Fragmente, die für 24h Stunden mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] und bzw. oder Ubichinon [50µg/ml] präinkubiert und für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. ° $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „IL-6 + Cisplatin“. # $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „OSM + Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 8-12.

## 5.2 Einfluss der Inhibition der Zytokin-induzierten Signalkaskade auf die Protektion gegenüber Cisplatin-induzierter Ototoxizität

Explantate wurden für 48 Stunden mit IL-6 [30ng/ml] oder OSM [30ng/ml] behandelt. Zwei zusätzliche Gruppen wurden über den gesamten Zeitraum simultan mit dem STAT3-Inhibitor WP 1066 [5,6 $\mu$ M] und einem der Zytokine inkubiert. Allen genannten Behandlungsgruppen wurde in den letzten 24 Stunden darüber hinaus Cisplatin in einer Konzentration von 15 $\mu$ M zugesetzt. Eine weitere Explantat-Gruppe wurde für 48 Stunden allein mit dem STAT 3-Inhibitor III inkubiert. Die Auswertung erfolgte gegenüber einer für 48 Stunden mit Medium inkubierten Kontrollgruppe und einer Negativ-Kontrollgruppe, die zunächst für 24 Stunden mit Medium und im Anschluss für 24 Stunden mit Cisplatin [15 $\mu$ M] inkubiert wurde.

Abb. 6 stellt die Haarzell-Morphologie im Anschluss an die genannten Inkubationen dar. Abb. 7 zeigt die Mediane der Auszählungen der inneren Haarzellen, Abb. 8 die der äußeren Haarzellen. Die Inkubation mit WP 1066 erbrachte in allen Fragmenten und für beide Haarzelltypen keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 6, 7, 8). Die inneren und äußeren Haarzellen des apikalen (IHC: Median=3, IQR=1 vs. Kontrolle: Median=12, IQR=2 und vs. WP 1066: Median=10, IQR=2; OHC: Median=10, IQR=6,5 vs. Kontrolle: Median=48, IQR=0 und vs. WP 1066: Median=48, IQR=3,5) (Abb.7A, 8A), medialen (IHC: Median=3, IQR=1,5 vs. Kontrolle: Median=10, IQR=2 und vs. WP 1066: Median=9, IQR=1; OHC: Median=14, IQR=7 vs. Kontrolle: Median=48, IQR=0 und vs. WP 1066: Median=43, IQR=7) (7B, 8B) und basalen (IHC: Median=1,5, IQR=2 vs. Kontrolle: Median=10, IQR=1 und vs. WP 1066: Median=9, IQR=2; OHC: Median=7, IQR=9,75 vs. Kontrolle: Median=46, IQR=5 und vs. WP 1066: Median=45, IQR=9) (Abb.7C, 8C) Fragments wurden durch Cisplatin gegenüber den Kontrollgruppen und den mit WP 1066 behandelten Explantaten statistisch signifikant geschädigt ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die inneren und äußeren Haarzellen des basalen Fragments wurden stärker geschädigt als die des apikalen und medialen Fragments. Der Anteil der geschädigten Haarzellen war im medialen Fragment am niedrigsten, beide Haarzelltypen wurden gleichermaßen geschädigt.

Die unter 3.1.1 beschriebene, statistisch signifikante Protektion der inneren Haarzellen durch IL-6 und OSM gegenüber Cisplatin konnte im apikalen (IL-6: Median=7,5, IQR=4; OSM: Median=9, IQR=2,75 jeweils vs. Median=3, IQR=1) (Abb.7A), medialen (IL-6: Median=6, IQR=1,75; OSM: Median=6, IQR=4 jeweils vs. Median=3, IQR=1,5) (Abb.7B) und basalen (IL-6: Median=6, IQR=3; OSM: Median=5,5, IQR=2 jeweils vs. Median=1,5, IQR=2) (Abb.7C) Fragment reproduziert werden ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Auch

die Protektion der äußeren Haarzellen ließ sich im apikalen (IL-6: Median=39, IQR=10,5; OSM: Median=41, IQR=12,25 jeweils vs. Median=10, IQR=6,5 (Abb.8A), medialen (IL-6: Median=41, IQR=2; OSM: Median=39, IQR=12 jeweils vs. Median=14, IQR=7) (Abb.8B) und basalen (IL-6: Median=31, IQR=8; OSM: Median=29, IQR=13,5 jeweils vs. Median=7, IQR=9,75) (Abb.8C) Fragment erneut statistisch signifikant darstellen ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die inneren Haarzellen profitierten in allen Fragmenten stärker von der IL-6-Inkubation als die äußeren Haarzellen, für OSM verhielt es sich umgekehrt. Das mediale Fragment profitierte für beide Haarzelltypen und von beiden Behandlungszusätzen am wenigsten von der Protektion (Abb. 6, 7, 8).

Explantate, die vor der Cisplatin-Inkubation mit IL-6 und simultan mit WP 1066 präinkubiert worden sind, zeigten im apikalen (IHC: Median=3, IQR=4 vs. Median=7,5, IQR=4; OHC: Median=13, IQR=10,5 vs. Median=39, IQR=10,5) (Abb.7A, 8A), medialen (IHC: Median=2, IQR=2 vs. Median=7,5, IQR=4; OHC: Median=11, IQR=6,5 vs. Median=41, IQR=2) (Abb.7B, 8B) und basalen (IHC: Median=2, IQR=2,25 vs. Median=6, IQR=3; OHC: Median=8, IQR=8,25 vs. Median=31, IQR=8) (Abb.7C, 8C) Fragment eine statistisch signifikante Schädigung der inneren und äußeren Haarzellen gegenüber der vor und während der Behandlung mit Cisplatin allein mit IL-6 inkubierten Fragmente ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Auch die gleichzeitige Inkubation mit OSM und WP 1066, vor und während der Cisplatin-Behandlung, führte zu einer statistisch signifikanten Schädigung der inneren und äußeren Haarzellen im apikalen (IHC: Median=4, IQR=2 vs. Median=9, IQR=2,75; OHC: Median=12, IQR=11 vs. Median=41, IQR=12,25) (Abb.7A, 8A), medialen (IHC: Median=2, IQR=3 vs. Median=6, IQR=4; OHC: Median=13, IQR=9,5 vs. Median=39, IQR=12) (Abb.7B, 8B) und basalen (IHC: Median=1, IQR=2 vs. Median=5,5, IQR=2; OHC: Median=9, IQR=6 vs. Median=9, IQR=13,5) (Abb.7C, 8C) OC-Abschnitt im Vergleich zur mit OSM und Cisplatin inkubierten Gruppe ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Das basale Fragment wurde bezüglich beider Haarzelltypen und Behandlungszusätze am stärksten geschädigt. Beide Haarzelltypen waren von den Folgen der WP 1066-Inkubation gleichermaßen betroffen.

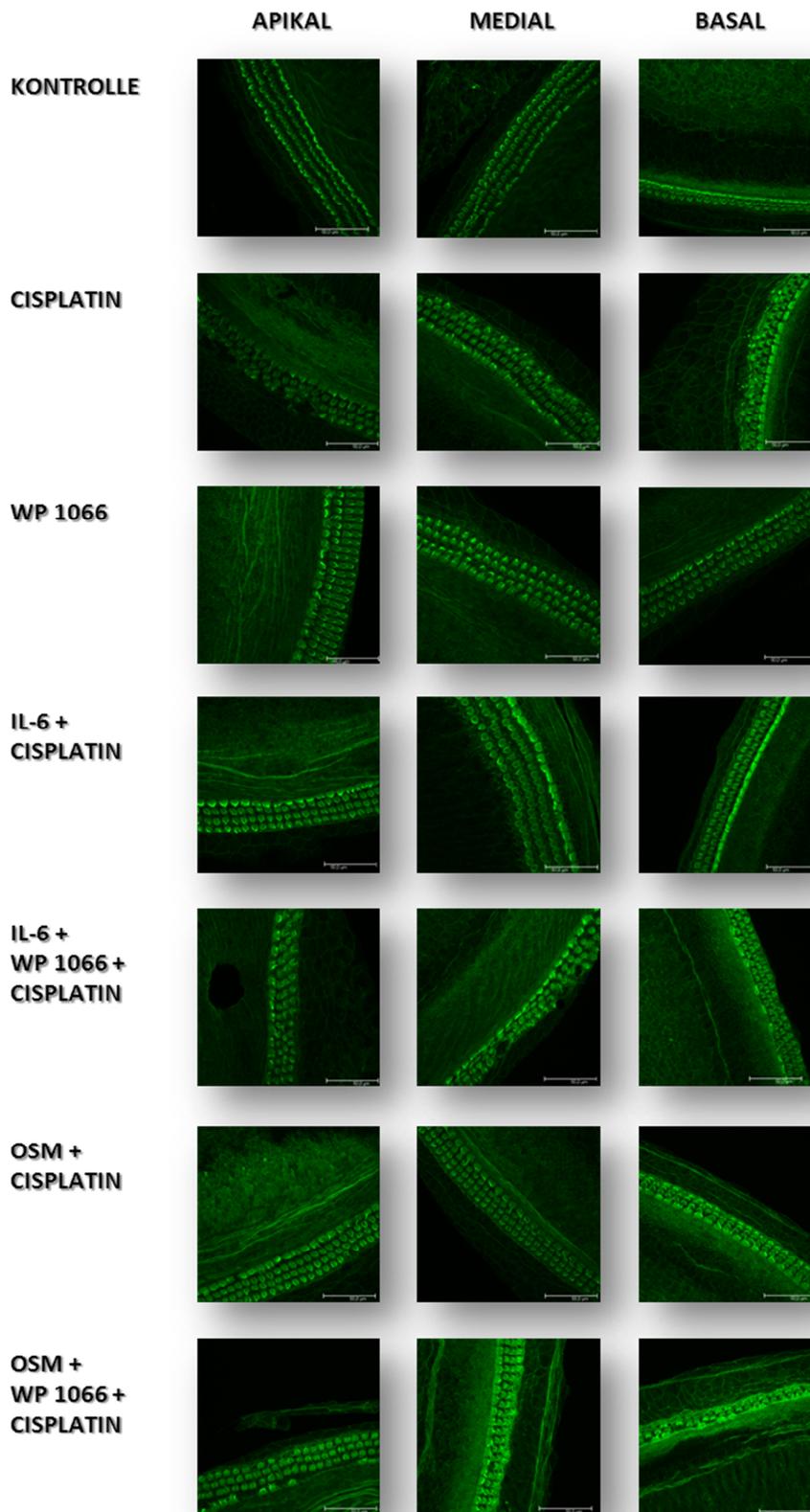


Abb. 6 Repräsentative Konfokal-Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Alexa Fluor 488-konjugierten Phalloidin-markierten Haarzellen der apikalen, medialen und basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6 $\mu$ M], IL-6 [30ng/ml] und OSM [30ng/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15 $\mu$ M] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6 $\mu$ M], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15 $\mu$ M]). Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 8-12.

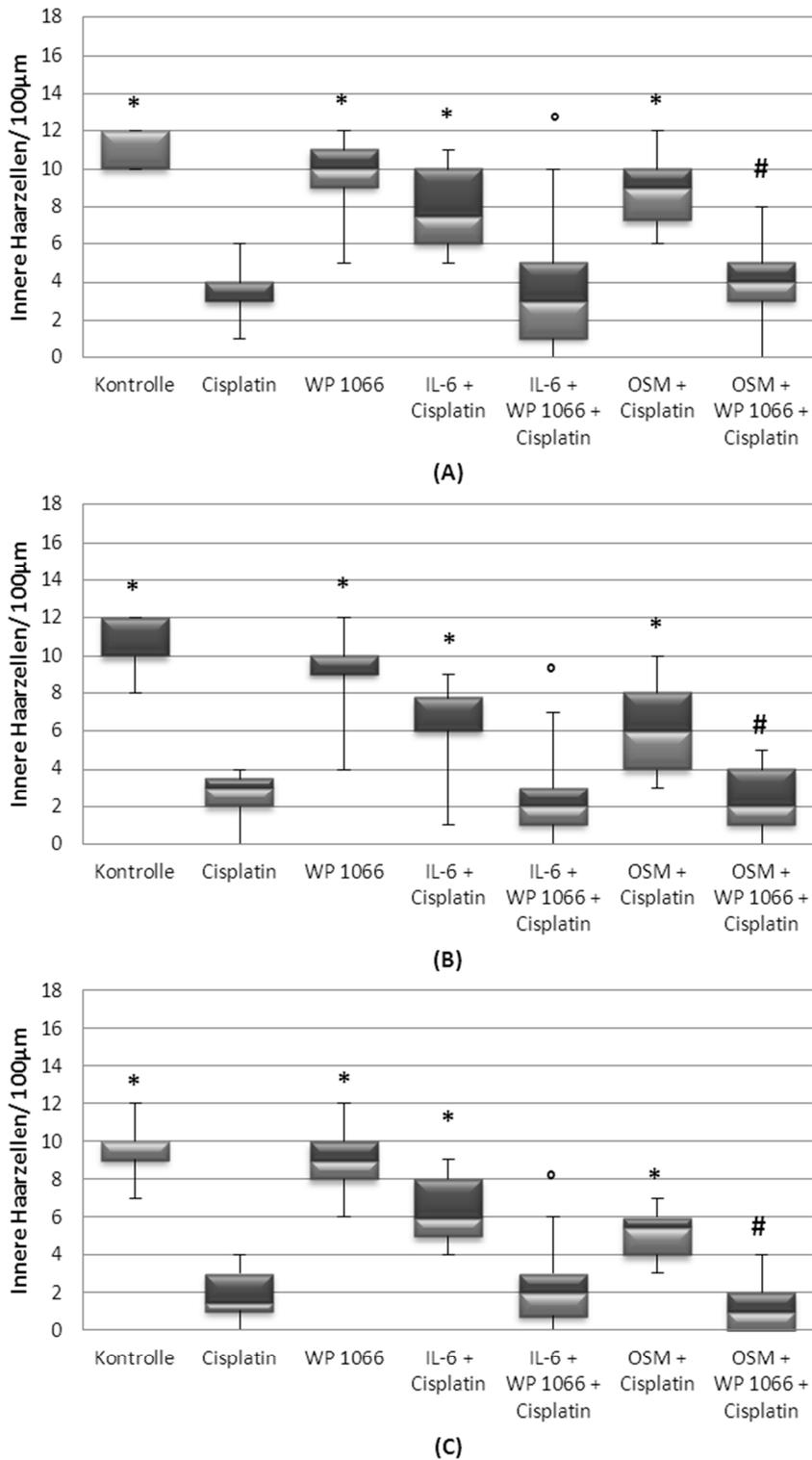


Abb. 7 Anzahl der inneren Haarzellen pro 100µm der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen OC-Fragmente, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM], IL-6 [30ng/ml] und OSM [30ng/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. ° $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „IL-6 + Cisplatin“. # $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „OSM + Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 8-12.

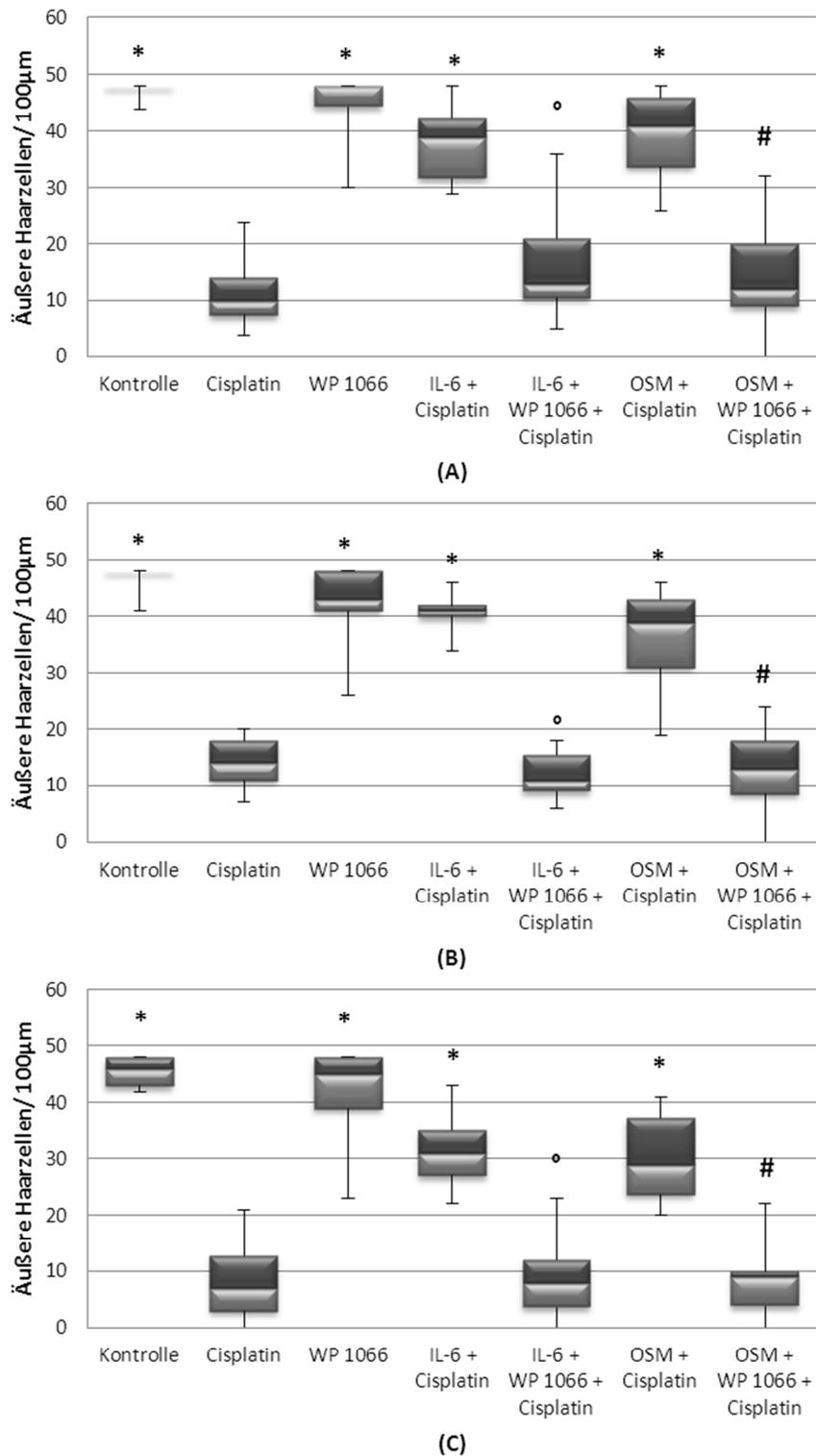


Abb. 8 Anzahl der äußeren Haarzellen auf 100µm- Abschnitten der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM], IL-6 [30ng/ml] und OSM [30ng/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Whisker-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie) und damit den sog. Interquartilsabstand dar, die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“.  $^{\circ}p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „IL-6 + Cisplatin“. # $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „OSM + Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe:  $n = 8-12$ .

Abb. 9 stellt die Neuronenfortsatz-Morphologie als Folge der genannten Inkubationen dar, Abb. 10 zeigt die Mediane der Zählungen der neuronalen Fortsätze. Explantate, die allein mit WP 1066 inkubiert wurden, zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb.9, 10). Durch Cisplatin wurde die Dichte der neuronalen Fortsätze aller Fragmente (Apikal: Median=9, IQR=4 vs. Kontrolle: Median=14, IQR=3 und vs. WP 1066: Median=14, IQR=4; Medial: Median=9, IQR=2 vs. Kontrolle: Median=17, IQR=5 und vs. WP 1066: Median=14, IQR=2; Basal: Median=8, IQR=4 vs. Kontrolle: Median=15, IQR=4 und vs. WP 1066: Median=14, IQR=2) gegenüber der Kontrollgruppe und der allein mit WP 1066 behandelten Gruppe statistisch signifikant reduziert (Abb.10) ( $p < 0,05$ , apikal: einfache ANOVA nach Bonferroni; medial, basal: einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die neuronalen Fortsätze des apikalen Fragments wurden am geringsten geschädigt.

Die unter 3.1.2 beschriebene, statistisch signifikante Protektion der inneren Haarzellen durch IL-6 und OSM gegenüber Cisplatin konnte reproduziert und für beide Behandlungsgruppen im apikalen (IL-6: Median=14,5, IQR=1; OSM: Median=13, IQR=4 jeweils vs. Median=9, IQR=4) (Abb.10A), medialen (IL-6: Median=15, IQR=4; OSM: Median=13, IQR=2 jeweils vs. Median=9, IQR=2) (Abb.10B) und basalen (IL-6: Median=12, IQR=5; OSM: Median=12, IQR=3 jeweils vs. Median=8, IQR=4) (Abb.10C) Fragment gleichermaßen mit statistischer Signifikanz gezeigt werden ( $p < 0,05$ , apikal: einfache ANOVA nach Bonferroni; medial, basal: einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn).

Explantate, die parallel zu den Zytokinen mit WP 1066 inkubiert worden sind, zeigten im apikalen (IL-6: Median=11,5, IQR=3 vs. Median=14,5, IQR=1; OSM: Median=10, IQR=5 vs. Median=13, IQR=4) (Abb.10A), medialen (IL-6: Median=11, IQR=4 vs. Median=15, IQR=4; OSM: Median=10, IQR=3 vs. Median=13, IQR=2) (Abb.10B) und basalen (IL-6: Median=9, IQR=3 vs. Median=12, IQR=5; OSM: Median=9, IQR=2 vs. Median=12, IQR=3) (Abb.10C) Fragment gleichermaßen eine statistisch signifikante Reduktion der Dichte der Neuronenfortsätze gegenüber den mit Zytokinen inkubierten Fragmenten ( $p < 0,05$ , apikal: einfache ANOVA nach Bonferroni; medial, basal: einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn).

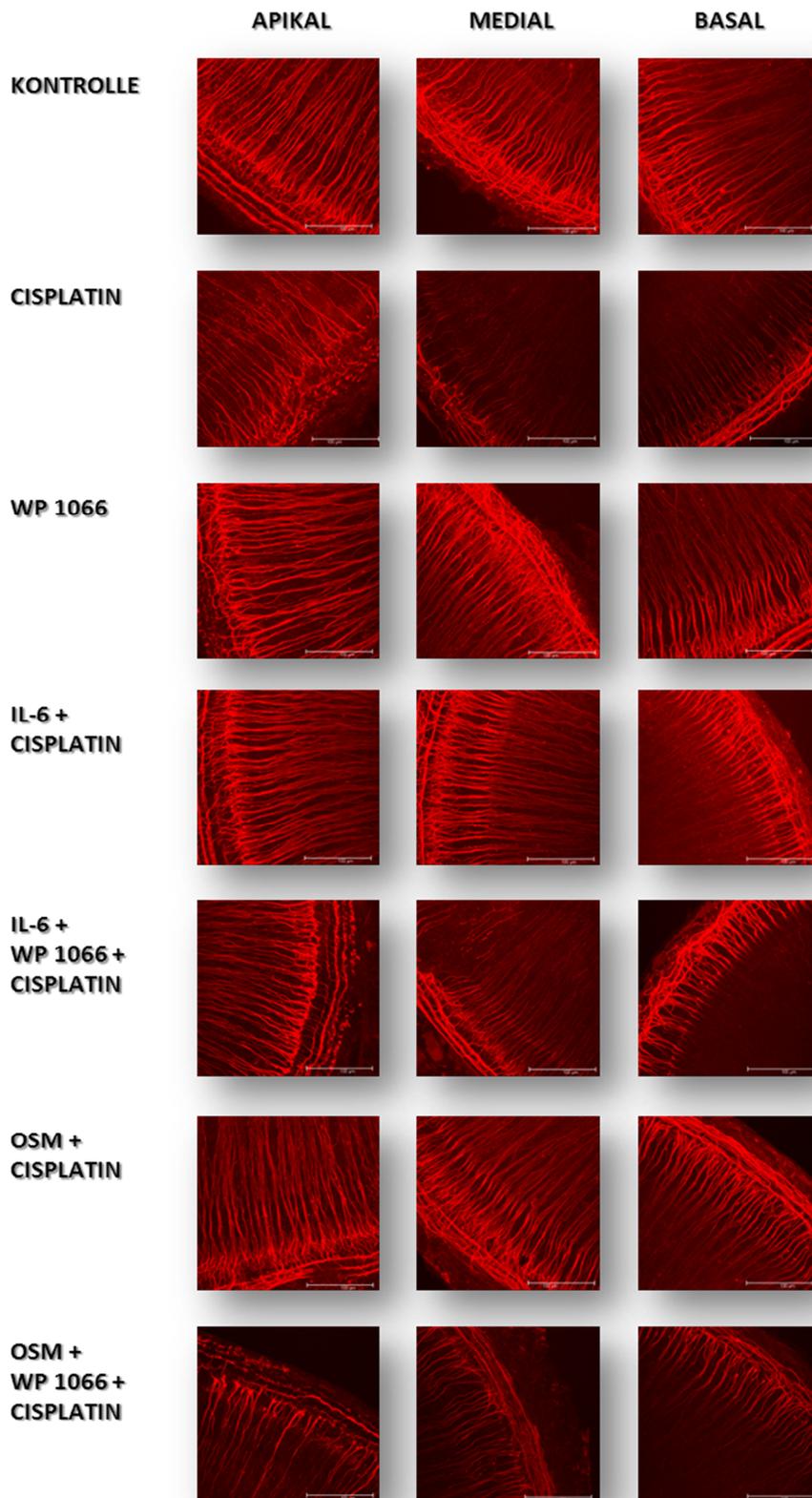


Abb. 9 Repräsentative Konfokal-Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Alexa Fluor 633-markierten Neuronenfortsätze der apikalen, medialen und basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6 $\mu$ M], IL-6 [30ng/ml] und OSM [30ng/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15 $\mu$ M] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6 $\mu$ M], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15 $\mu$ M]). Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 5-12.

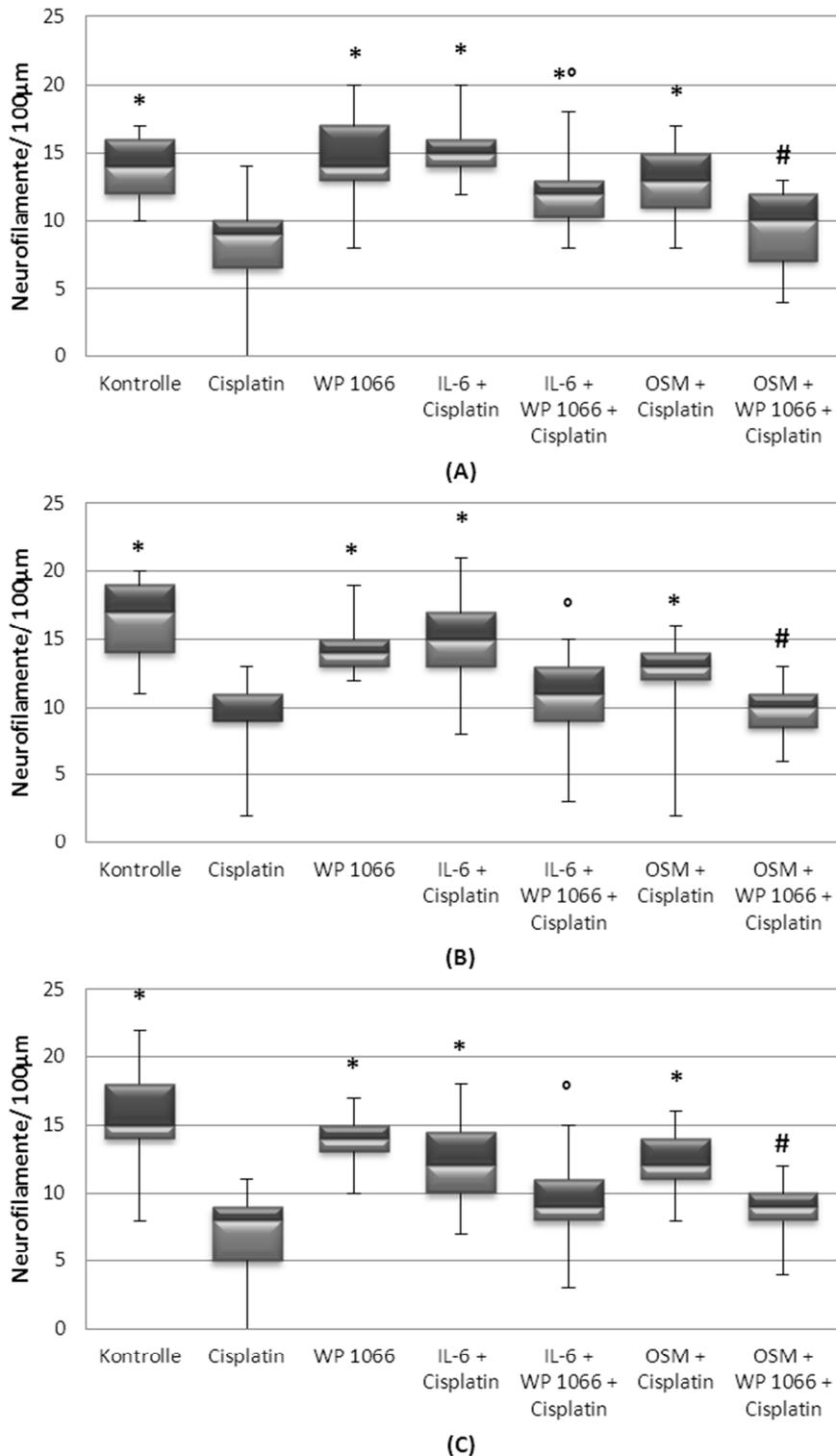


Abb. 10 Anzahl der Neuronenfortsätze auf 100µm- Abschnitten der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM], IL-6 [30ng/ml] und OSM [30ng/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Whisker-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie) und damit den sog. Interquartilsabstand dar, die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. ° $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „IL-6 + Cisplatin“. # $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „OSM + Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 5-12.

### ***5.3 Einfluss des STAT3-Inhibitor III auf Ubichinon-induzierte Otoprotektion gegenüber Cisplatin***

Die Explantate wurden für 48 Stunden mit Ubichinon [50µg/ml] behandelt, in den zweiten 24 Stunden erfolgte die Inkubation simultan mit Cisplatin [15µM]. Eine weitere Gruppe, die für 48 Stunden mit WP 1066 [5,6µM] und Ubichinon inkubiert wurde, wurde in den letzten 24h ebenfalls gleichzeitig mit Cisplatin behandelt. Eine dritte Gruppe wurde für 48 Stunden allein mit WP 1066 inkubiert, eine andere zunächst für 24 Stunden mit Medium und für weitere 24 Stunden mit Cisplatin. Die Kontrollgruppe wurde für 48 Stunden mit Medium inkubiert.

Abb. 11 zeigt die Morphologie der Haarzellen als Folge der beschriebenen Inkubationen. Abb. 12 stellt die Mediane der Zählungen der inneren, Abb. 13 die der äußeren Haarzellen dar. Im Anschluss an die Inkubation mit WP 1066 ergaben sich für alle Fragmente und beide Haarzelltypen keine Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 11, 12, 13). Die Inkubation mit Cisplatin führte hinsichtlich der inneren Haarzellen im apikalen ( Median=5, IQR=2,75 vs. Kontrolle: Median=11, IQR=1 und vs. WP 1066: Median=11, IQR=2) (Abb. 12A), medialen (Median=2, IQR=3,5 vs. Kontrolle: Median=10, IQR=2 und vs. WP 1066: Median=11, IQR=2,5) (Abb. 12B) und basalen (Median=3, IQR=4 vs. Kontrolle: Median=11, IQR=2 und vs. WP 1066: Median=10, IQR=3) (Abb. 12C) Fragment zu statistisch signifikanten Schäden gegenüber der Kontrollgruppe und den mit WP 1066 behandelten Explantaten ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Auch die äußeren Haarzellen wurden im Vergleich zu den genannten Gruppen im apikalen ( Median=23,5, IQR=9,5 vs. Kontrolle: Median=42, IQR=2 und vs. WP 1066: Median=42, IQR=1,5) (Abb. 13A), medialen (Median=22, IQR=12,25 vs. Kontrolle: Median=41, IQR=4 und vs. WP 1066: Median=40, IQR=3,5) (Abb. 13B) und basalen (Median=21,5, IQR=6,25 vs. Kontrolle: Median=40, IQR=3,5 und vs. WP 1066: Median=41, IQR=6) (Abb. 13C) Fragment statistisch signifikant geschädigt ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die inneren und äußeren Haarzellen des apikalen Fragments wurden prozentual am geringsten geschädigt. Die inneren Haarzellen wurden stärker geschädigt als die äußeren Haarzellen.

Die statistisch signifikante Protektion durch Ubichinon gegenüber Cisplatin konnte wie unter 3.1.1 beschrieben für alle drei Fragmente für die inneren (Apikal: Median=11, IQR=2,75 vs. Median=5, IQR=2,75; Medial: Median=10, IQR=2 vs. Median=2, IQR=3,5; Basal: Median=11, IQR=3 vs. Median=3, IQR=4) und äußeren Haarzellen (Apikal: Median=42, IQR=3 vs. Median=23,5, IQR=9,5; Medial: Median=39, IQR=8 vs. Median=22, IQR=12,25; Basal: Median=40, IQR=8 vs. Median=21,5, IQR=6,25) reproduziert werden (Abb. 12, 13) ( $p < 0,05$ , einfache

ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die inneren Haarzellen profitierten in allen Fragmenten stärker von der Ubichinon-Inkubation als die äußeren Haarzellen und wurden im medialen Fragment verhältnismäßig am stärksten geschützt, die äußeren Haarzellen wurden in allen drei Fragmenten zu einem ähnlichen Anteil geschützt (Abb. 11, 12, 13).

Die simultane Inkubation mit Ubichinon und WP 1066 ergab für beide Haarzelltypen in allen drei Fragmenten keine statistisch signifikante Schädigung der Haarzellen gegenüber der Gruppe, die lediglich mit Ubichinon inkubiert wurde. Die inneren und äußeren Haarzellen des apikalen (IHC: Median=10, IQR=1 vs. Median=5, IQR=2,75; OHC: Median=42, IQR=4,25 vs. Median=23,5, IQR=9,5) (Abb. 12A, 13A), medialen (IHC: Median=10, IQR=1,25 vs. Median=2, IQR=3,5; OHC: Median=37,5, IQR=5,75 vs. Median=22, IQR=12,25) (Abb. 12B, 13B) und basalen (IHC: Median=10, IQR=2 vs. Median=3, IQR=4; OHC: Median=40, IQR=6,5 vs. Median=21,5, IQR=6,25) (Abb. 12C, 13C) Fragments wurden durch die simultane Inkubation mit WP 1066 und Ubichinon statistisch signifikant vor Cisplatin-vermittelter Ototoxizität geschützt ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn).

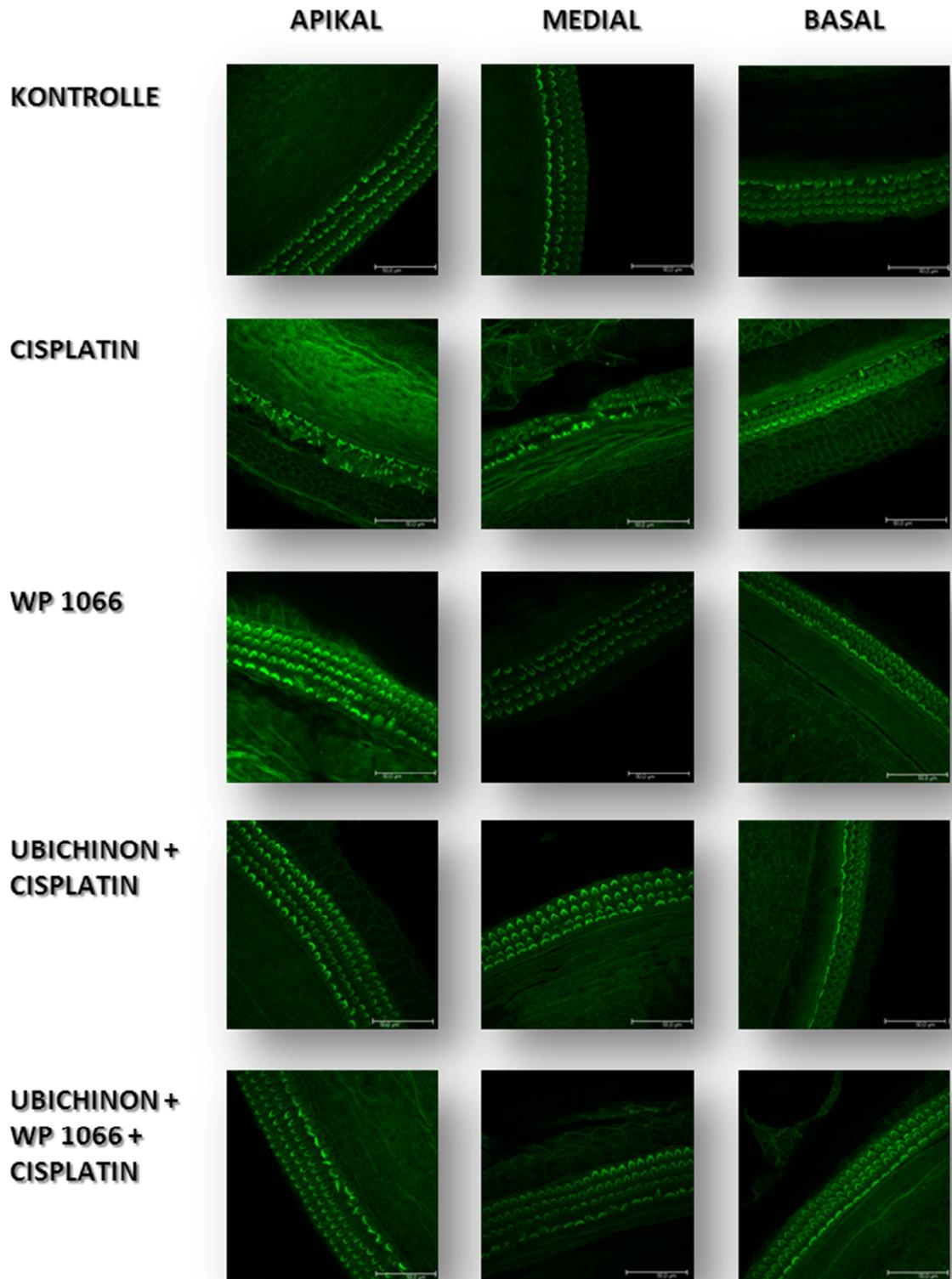


Abb. 11 Repräsentative Konfokal-Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Alexa Fluor 633-markierten Neuronenfortsätze der apikalen, medialen und basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 9-12.

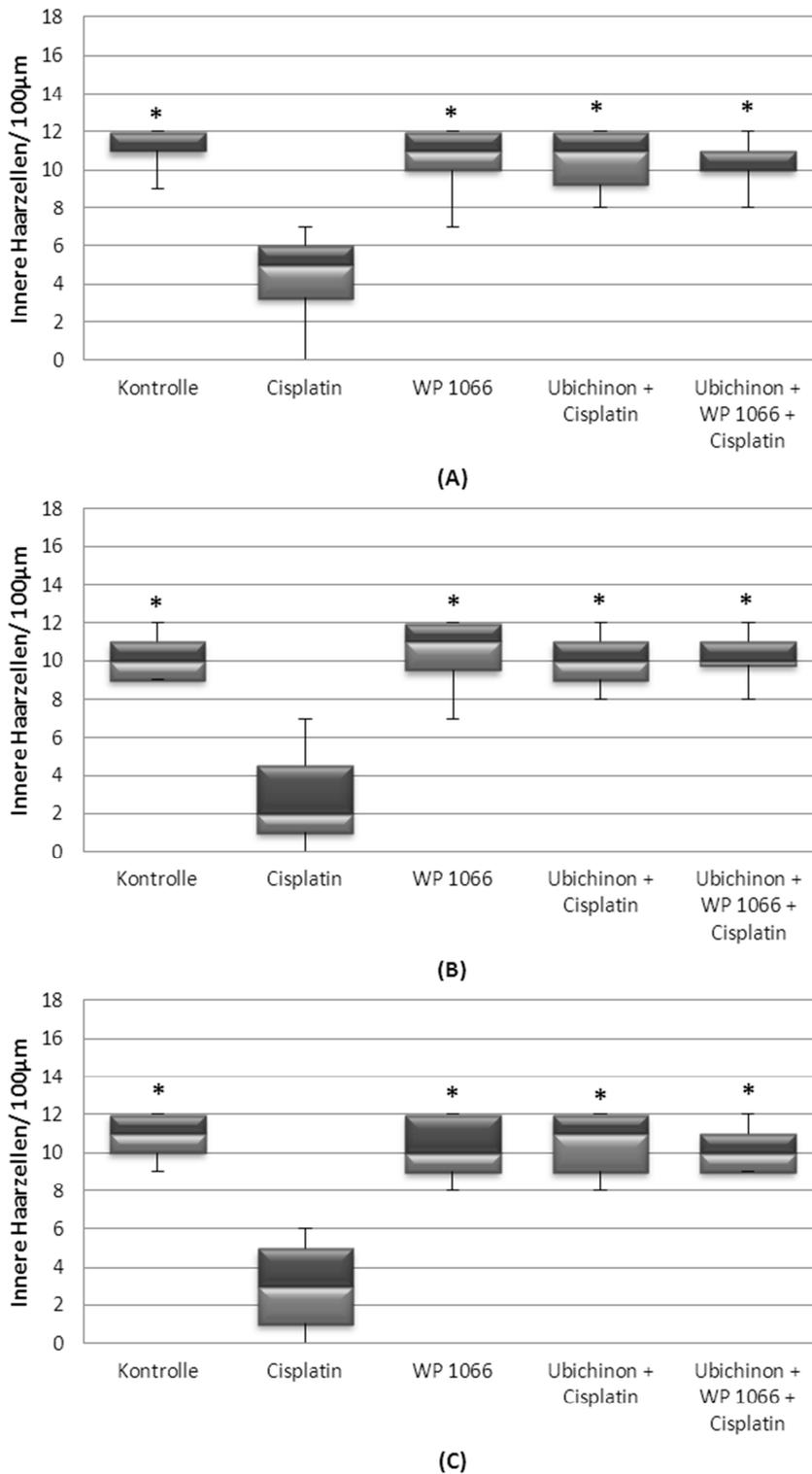


Abb. 12 Anzahl der inneren Haarzellen auf 100µm-Abschnitten der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativkontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Whisker-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie) und damit den sog. Interquartilsabstand dar, die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe:  $n = 9-12$ .

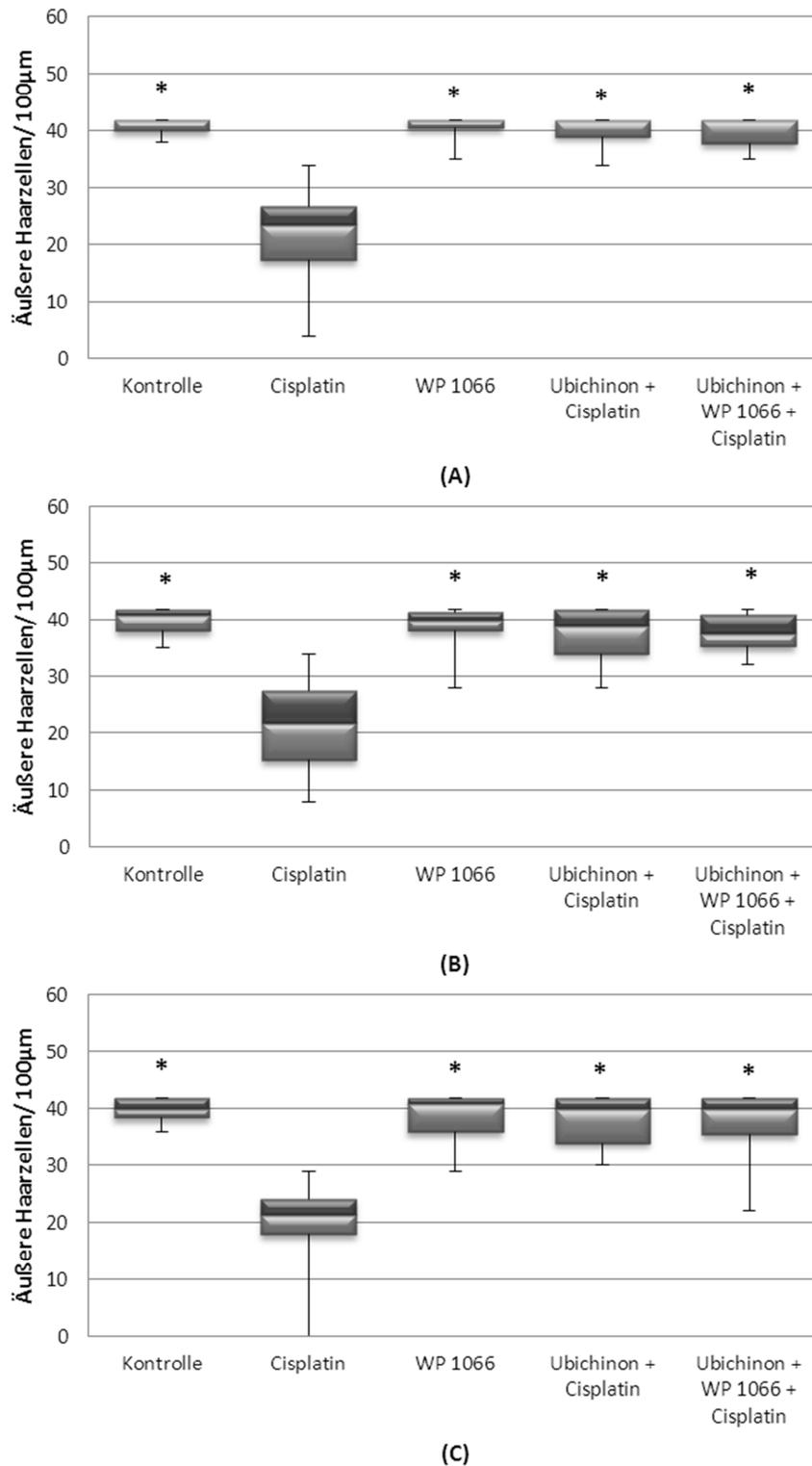


Abb. 13 Anzahl der äußeren Haarzellen auf 100µm-Abschnitten der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Whisker-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie) und damit den sog. Interquartilsabstand dar, die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe:  $n = 9-12$ .

Abb. 14 zeigt die Morphologie der Neuronenfortsätze im Anschluss an die beschriebenen Inkubationen, Abb. 15 die Mediane der Neuronenfortsatz-Zählungen. Die Inkubation mit WP 1066 führte in keinem der Fragmente zu Schäden gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 11, 12, 13). Cisplatin induzierte im apikalen (Median=8, IQR=2 vs. Kontrolle: Median=15, IQR=4 und vs. WP 1066: Median=14, IQR=4) (Abb. 15A), medialen (Median=9,5, IQR=2 vs. Kontrolle: Median=15,5, IQR=3 und vs. WP 1066: Median=15, IQR=5) (Abb. 15B) und basalen (Median=9, IQR=2 vs. Kontrolle: Median=13, IQR=5 und vs. WP 1066: Median=13, IQR=4) (Abb. 15C) Fragment eine statistisch signifikante Reduktion der Neuronenfortsatz-Dichte gegenüber der Kontrollgruppe und den mit WP 1066 behandelten Explantaten ( $p < 0,05$ , apikal: einfache ANOVA nach Bonferroni; medial, basal: einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Die Schwere der Schädigung nahm von apikal nach basal ab.

Durch die Inkubation mit Ubichinon konnte die unter 3.1.2 beschriebene Protektion gegenüber Cisplatin im apikalen (Median=15, IQR=4,75 vs. Median=8, IQR=2) (Abb. 15A), medialen (Median=16, IQR=2,5 vs. Median=9,5, IQR=2) (Abb. 15B) und basalen (Median=12,5, IQR=5 vs. Median=9, IQR=2) (Abb. 15C) Fragment statistisch signifikant reproduziert werden ( $p < 0,05$ , apikal: einfache ANOVA nach Bonferroni; medial, basal: einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn). Der Effekt dieser Protektion nahm von apikal nach basal ab (Abb. 14, 15).

Zwischen den Explantaten, die simultan mit Ubichinon und WP 1066 behandelt wurden, und den mit Ubichinon-inkubierten Fragmenten ergaben sich in keinem der drei Fragmente statistisch signifikante Unterschiede. Es zeigte sich in allen drei Fragmenten eine statistisch signifikante Protektion gegenüber Cisplatin durch die simultane Inkubation mit WP 1066 und Ubichinon (Apikal: Median=13, IQR=3 vs. Median=8, IQR=2; Medial: Median=15, IQR=3 vs. Median=9,5, IQR=2; Basal: Median=12, IQR=2,75 vs. Median=9, IQR=2) (Abb. 14, 15) ( $p < 0,05$ , apikal: einfache ANOVA nach Bonferroni; medial, basal: einfache ANOVA für Rangsummen nach Dunn).

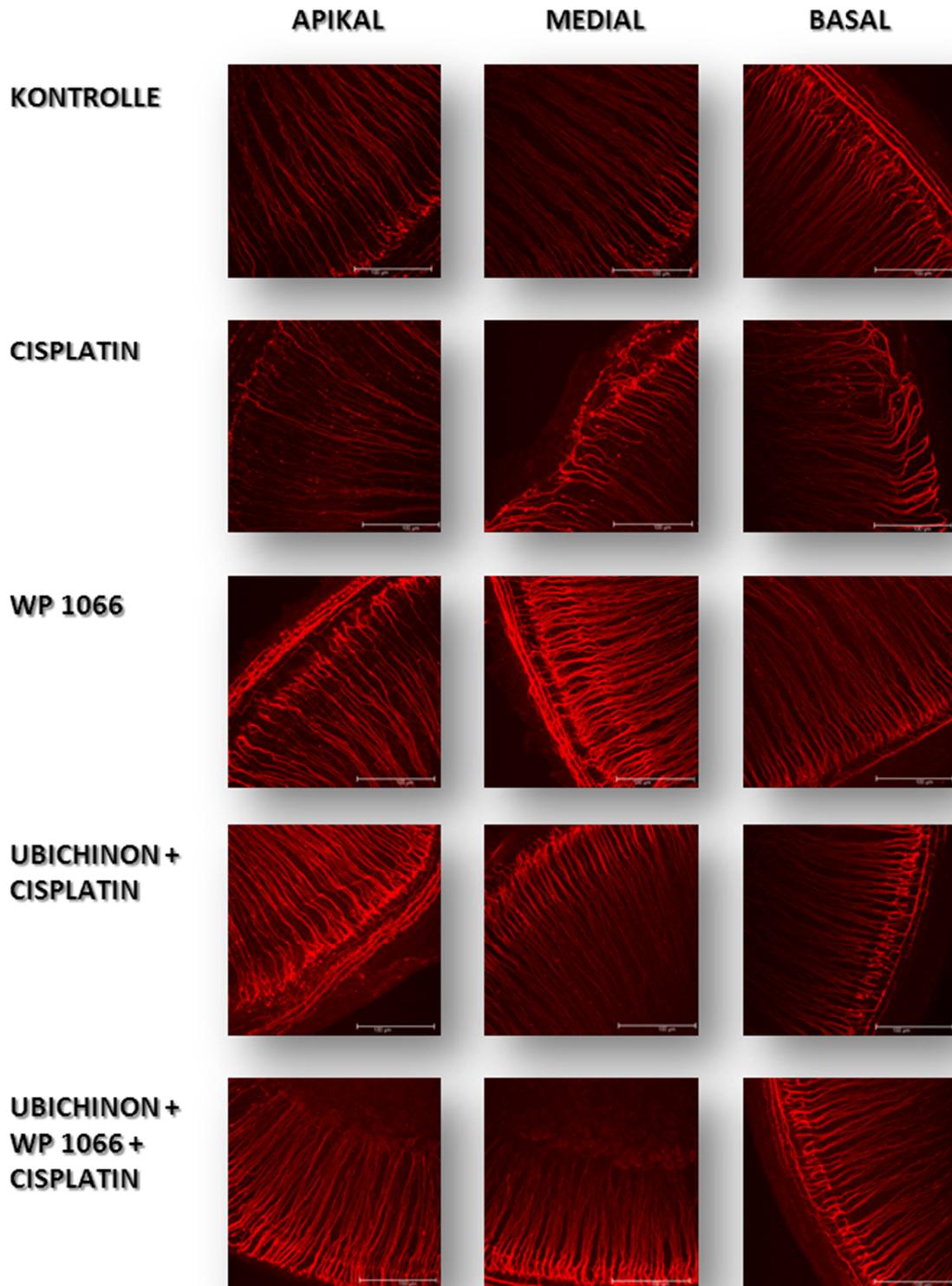


Abb. 14 Repräsentative Konfokal-Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von Alexa Fluor 488-konjugierten Phalloidin-markierten Haarzellen der apikalen, medialen und basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe: n = 7-12.

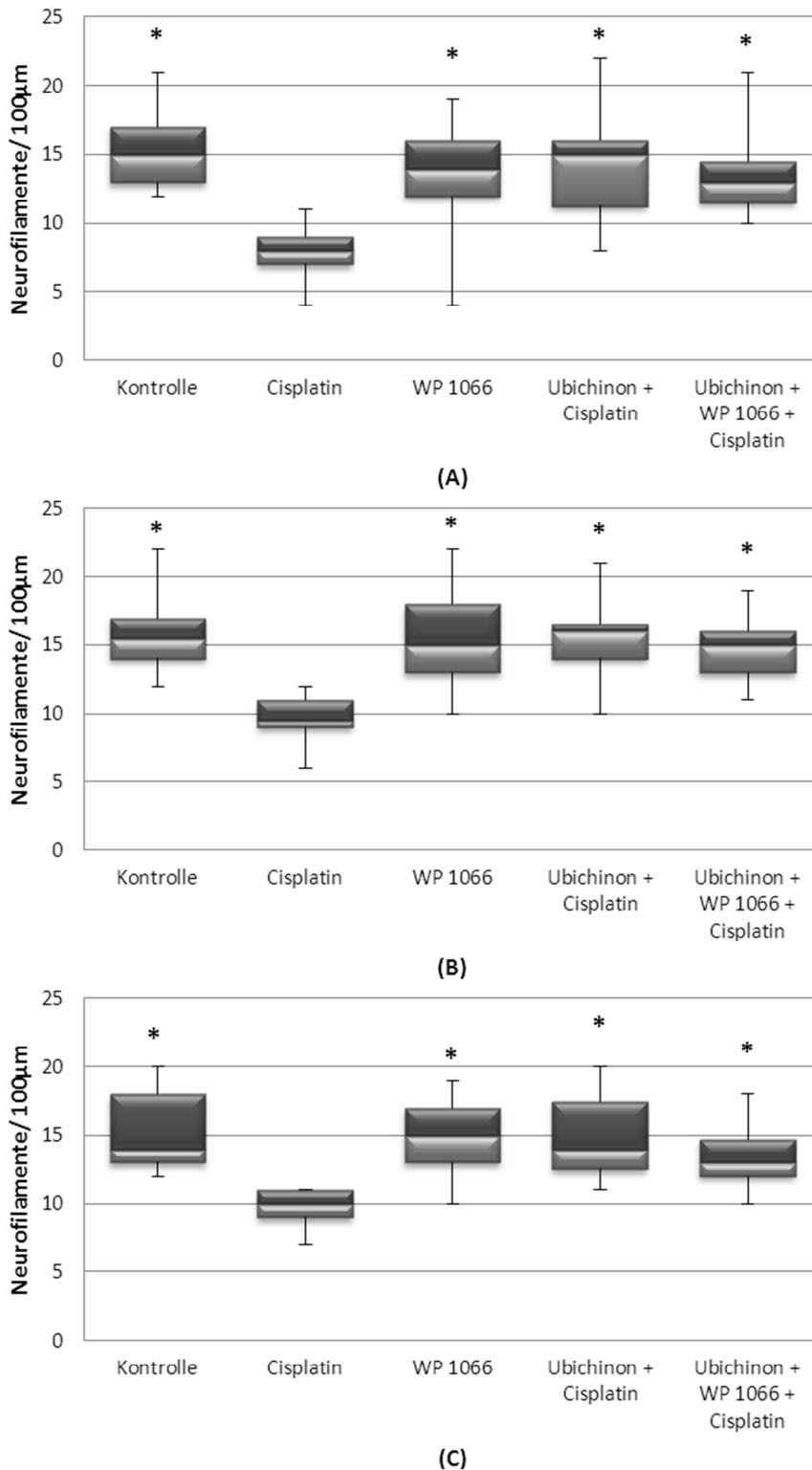


Abb. 15 Anzahl der Neuronenfortsätze auf 100µm- Abschnitten der (A) apikalen, (B) medialen und (C) basalen Abschnitte der OCs, die für 24h Stunden mit WP 1066 [5,6µM] und Ubichinon [50µg/ml] in den angegebenen Kombinationen präinkubiert wurden und im Anschluss für weitere 24h simultan mit Cisplatin [15µM] inkubiert wurden, jeweils im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation allein mit WP 1066 [5,6µM], zur Kontrollgruppe (48h pures Medium) und zur Negativ-Kontrolle (24h pures Medium, 24h Cisplatin [15µM]). Die Darstellung erfolgt mittels sog. Box-Whisker-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie) und damit den sog. Interquartilsabstand dar, die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung. \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber „Cisplatin“. Anzahl der Explantate pro Behandlungsgruppe:  $n = 7-12$ .

## ***5.4 Effekt des IL-6 und OSM auf die Menge von STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung im OC***

Die Level-Änderungen von STAT3, P-Y-STAT3 und P-S-STAT3 im Zytoplasma und im Nukleus wurden mittels Western Blottings analysiert. Dazu wurden die Explantate für 15 und 30 Minuten mit IL-6 [30ng/ml] und OSM [30ng/ml] inkubiert. Die Banden von STAT3 waren wie die von P-Y-STAT3 bei 79/86kDa sichtbar und die des P-S-STAT3 bei 86kDa. Im Zytoplasma wurden die optischen Dichten dieser Banden gegenüber der von  $\beta$ -Aktin, die bei 42kDa sichtbar wurde, normalisiert. Im Kern erfolgte die Normalisierung der STAT3 und P-Y-STAT3 gegenüber der optischen Dichte der Histon-H3-Banden bei 17kDa. Die erhaltenen Quotienten der Behandlungsgruppen wurden gegenüber der der Kontrollgruppe, die lediglich mit Medium behandelt worden war, ins Verhältnis gesetzt.

### ***5.4.1 Effekt des IL-6 auf die Menge von STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung im zytoplasmatischen Kompartiment der OCs***

Zwischen den ermittelten Quotienten bezüglich der STAT3-Menge im Zytoplasma ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Mit steigender Dauer der IL-Inkubation (15min IL-6: Median=0,90, IQR=0,34; 30min IL-6: Median=0,84, IQR=0,70) ließ sich ein Abwärtstrend der STAT-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Median=1, IQR=0) feststellen (Abb.16).

Die Phosphorylierung von STAT3 an der Tyrosin-Domäne im Zytoplasma stieg nach der Inkubation mit IL-6 für beide Inkubationszeiträume (15min IL-6: Median=1,87, IQR=1,03; 30min IL-6: Median=1,64, IQR=1,21) im Vergleich zur Kontrolle (Median=1, IQR=0) statistisch signifikant an (Abb.17) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA nach Bonferroni). Die höchste Expression wurde als Trend nach 15 Minuten erreicht, wobei sich die Quotienten der beiden Behandlungszeiträume nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb.17)

Für die Quotienten der P-S-STAT3-Menge im Zytoplasma lässt sich gegenüber der Kontrolle kein statistisch signifikanter Unterschied ermitteln (Abb.18). Als Trend lässt sich feststellen, dass die Phosphorylierung des STAT3 an der Serin-Domäne mit zunehmender Behandlungsdauer (15min IL-6: Median=1,45, IQR=1,81; 30min IL-6: Median=1,57, IQR=2,40) gegenüber der Kontrolle (Median=1, IQR=0) anstieg (Abb.18).

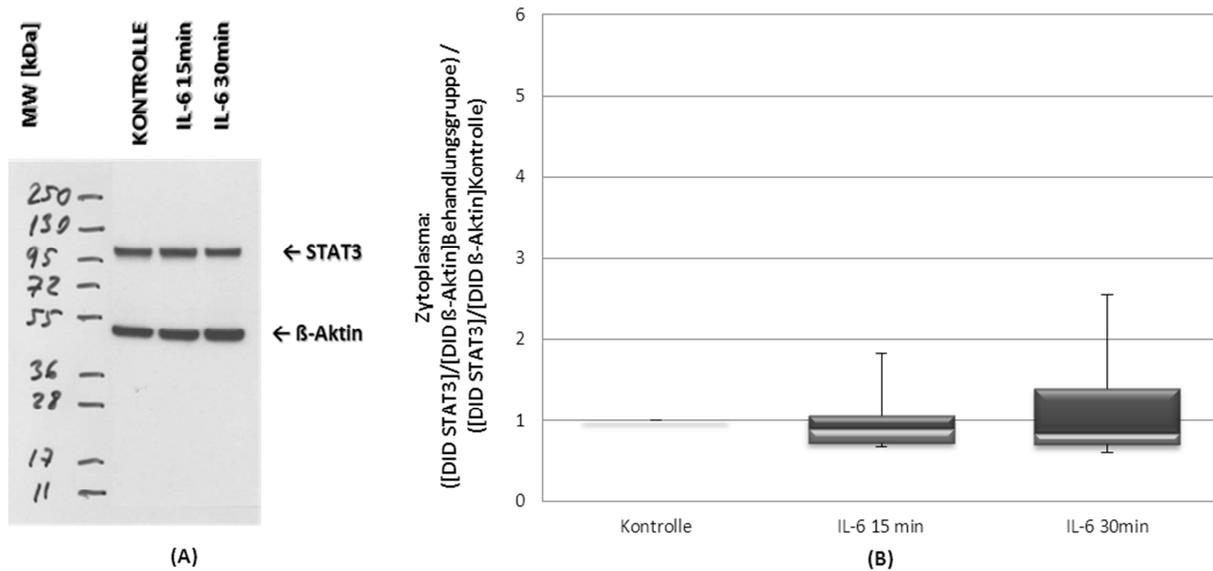


Abb. 16 Zytoplasmatisches STAT3 nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Protein-Menge erfolgte mittels gegen STAT3 und β-Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der STAT3-Bande wurde gegenüber β-Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=7).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

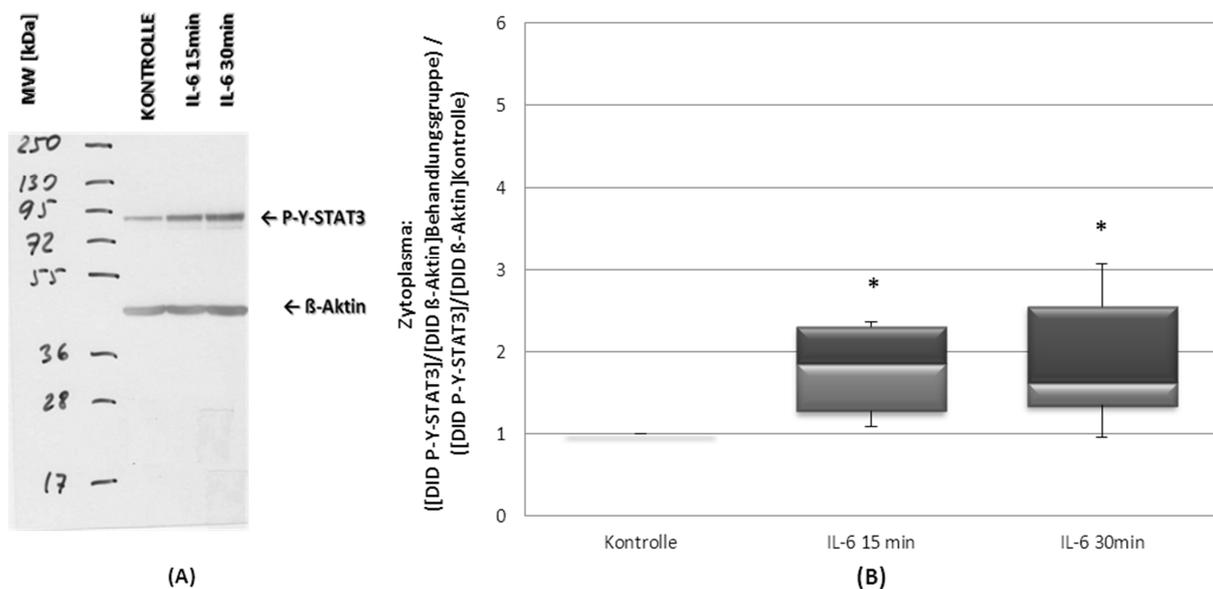


Abb. 17 Zytoplasmatische Phosphorylierung des STAT3 an der Tyrosin-Domäne nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels gegen P-Y-STAT3 und β-Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der P-Y-STAT3-Banden wurde gegenüber β-Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=7).  $*p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle.

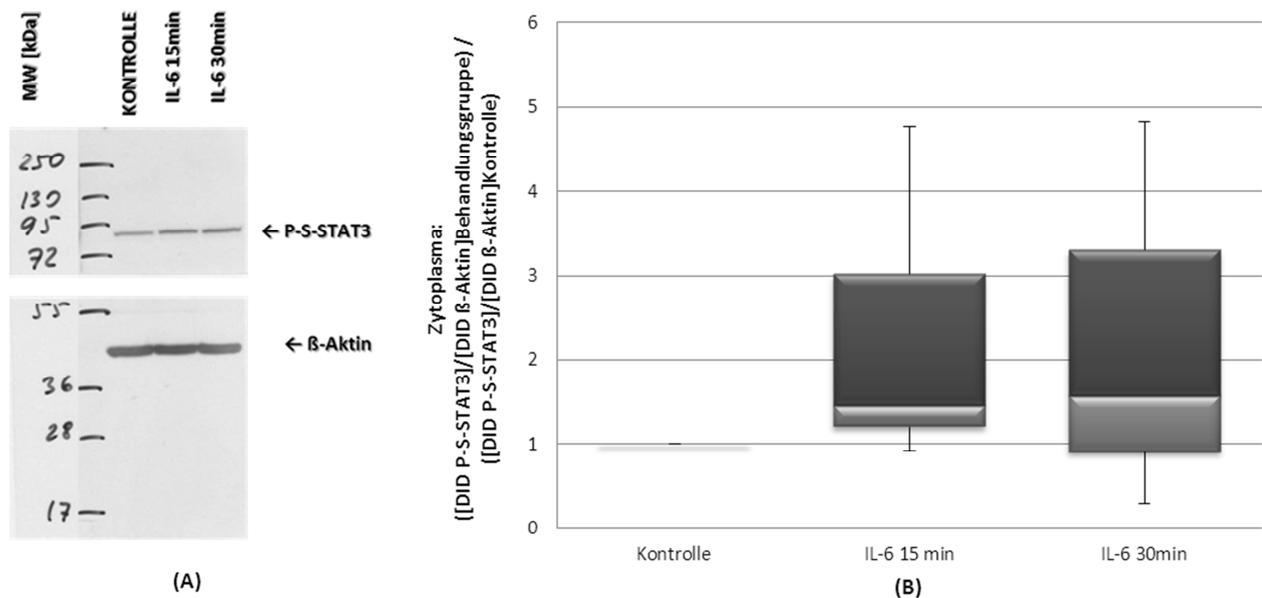


Abb. 18 Zytoplasmatische Phosphorylierung des STAT3 an der Serin-Domäne nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels gegen P-S-STAT3 und  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der P-S-STAT3-Banden wurde gegenüber  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung ( $n=7$ ).  $p>0,05$  für alle Gruppen.

#### 5.4.2 Effekt des IL-6 auf die nukleäre Translokation des STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung

Die Menge von STAT3 im Nukleus, die im Anschluss an die Inkubation mit IL-6 gemessen wurde, wies für beide Behandlungszeiträume (15min IL-6: Median=1,18, IQR=0,93; 30min IL-6: Median=1,95, IQR=1,65) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median=1, IQR=0) keine statistisch signifikanten Veränderungen auf (Abb.19). Mit zunehmender Inkubationszeit ließ sich der Trend einer Mengenzunahme beobachten (Abb.19).

Im Rahmen der Menge von nukleären P-Y-STAT3 als Folge der IL-6-Inkubation (IL-6 15min: Median=1,29 IQR=0,91; IL-6 30min: Median=1,94, IQR=1,22) ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Median=1, IQR=0) beobachten (Abb.20). Lediglich ein Aufwärtstrend des P-Y-STAT3-Levels ließ sich parallel zur steigenden Behandlungsdauer ermitteln (Abb.20).

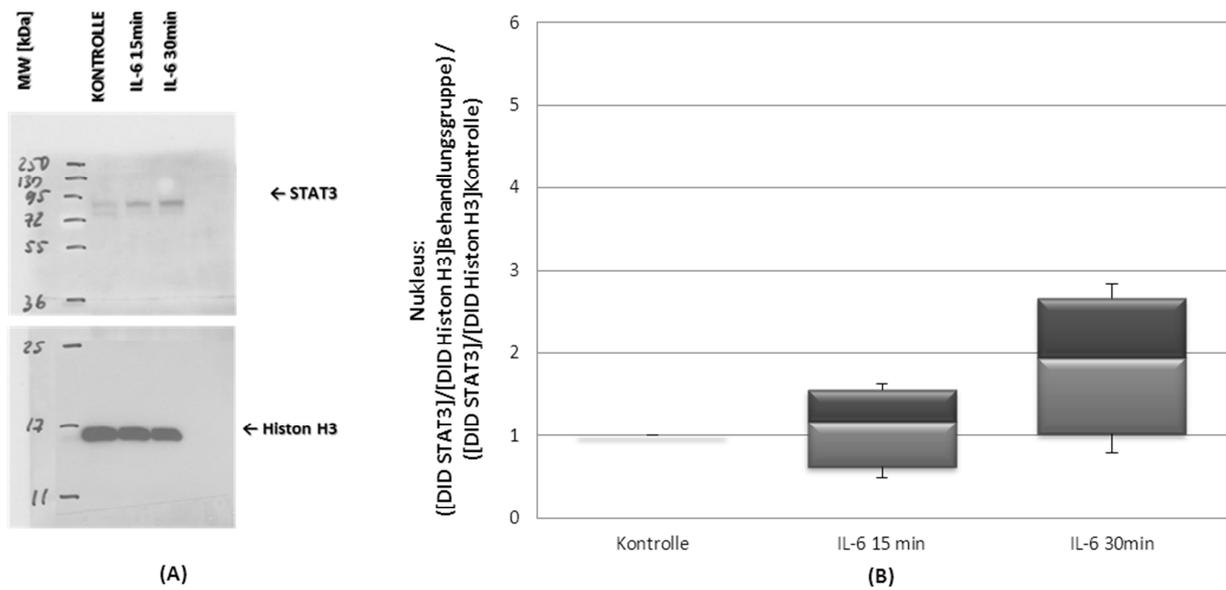


Abb. 19 Menge des nukleären STAT3 nach einer 15- oder 30-minütigen Inkubation mit IL-6 [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen STAT3 und Histone H3 gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der STAT3-Banden wurde gegenüber Histone H3 normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=4).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

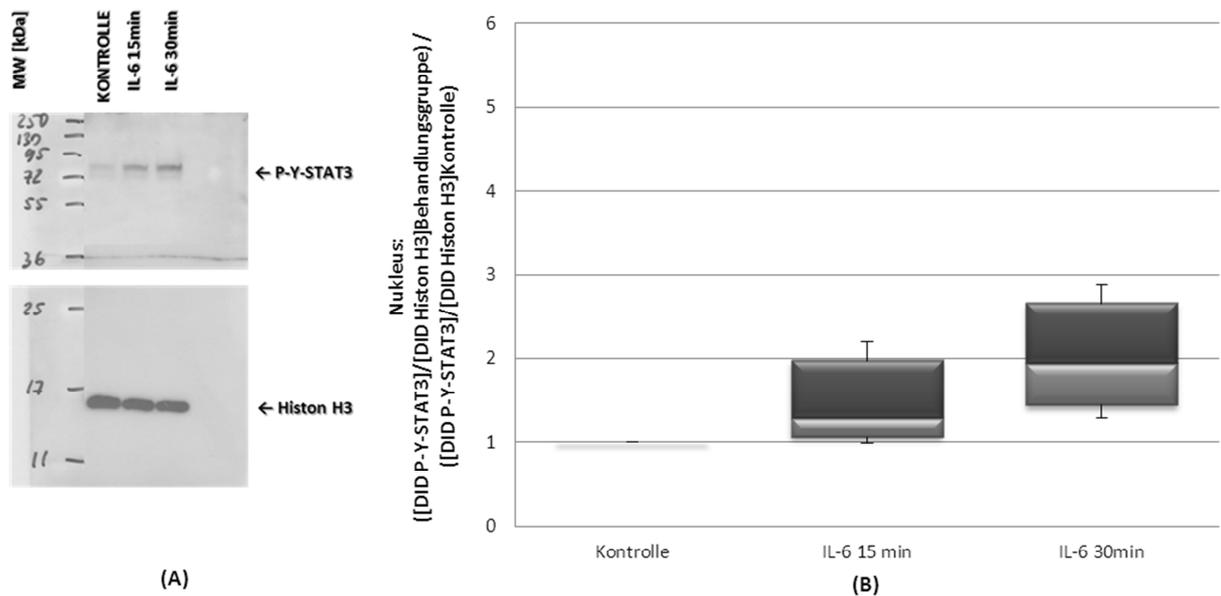


Abb. 20 Menge des nukleären P-Y-STAT3 nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen P-Y-STAT3 und Histone H3 gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der P-Y-STAT3-Banden wurde gegenüber Histone H3 normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=4).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

### ***5.4.3 Effekt des OSM auf die Menge von STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung im zytoplasmatischen Kompartiment der OCs***

Die Quotienten der zytoplasmatischen Menge des STAT3 wiesen keine statistisch signifikanten Veränderungen auf (Abb.21). Als Trend ließ sich feststellen, dass die Menge nach der OSM-Inkubation (15min OSM: Median= 1,25, IQR=1,04; 30min OSM: Median=1,12, IQR=0,76) im Vergleich zur Kontrolle (Median=1, IQR=0) zunahm und ihr Maximum nach 15 Minuten erreichte (Abb.21).

Bezüglich der zytoplasmatischen Tyrosin-Phosphorylierung des STAT3 konnten anschließend an die OSM-Behandlung gegenüber der Kontrolle für beide Inkubationszeiträume statistisch signifikante Unterschiede ermittelt werden (Abb.22) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA für Rangsummen nach Tukey). Der Anstieg (15min OSM: Median=2,89, IQR=7,17; 30min OSM: Median=2,40, IQR=3,12 jeweils vs. Median=1, IQR=0) erreichte seinen Höhepunkt nach 15 Minuten, wobei die Unterschiede der Quotienten für die beiden Inkubationszeiträume lediglich Trends darstellten und keine statistische Signifikanz aufwiesen (Abb.22).

Das zytoplasmatische P-S-STAT3-Level unterschied sich nach 15 Minuten (Median=2,50, IQR=2,12) statistisch signifikant von dem der Kontrolle (Median=1, IQR=0) (Abb.23) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA nach Bonferroni). Der Quotient der 30-minütigen Inkubation (Median=2,23, IQR=1,11) wies keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber dem kürzeren Behandlungszeitraum und der Kontrollgruppe auf (Abb.23). Als Trend ließ sich feststellen, dass die Serin-Phosphorylierung des STAT3 nach 15-minütiger Behandlung ihren Höhepunkt erreichte (Abb.23).

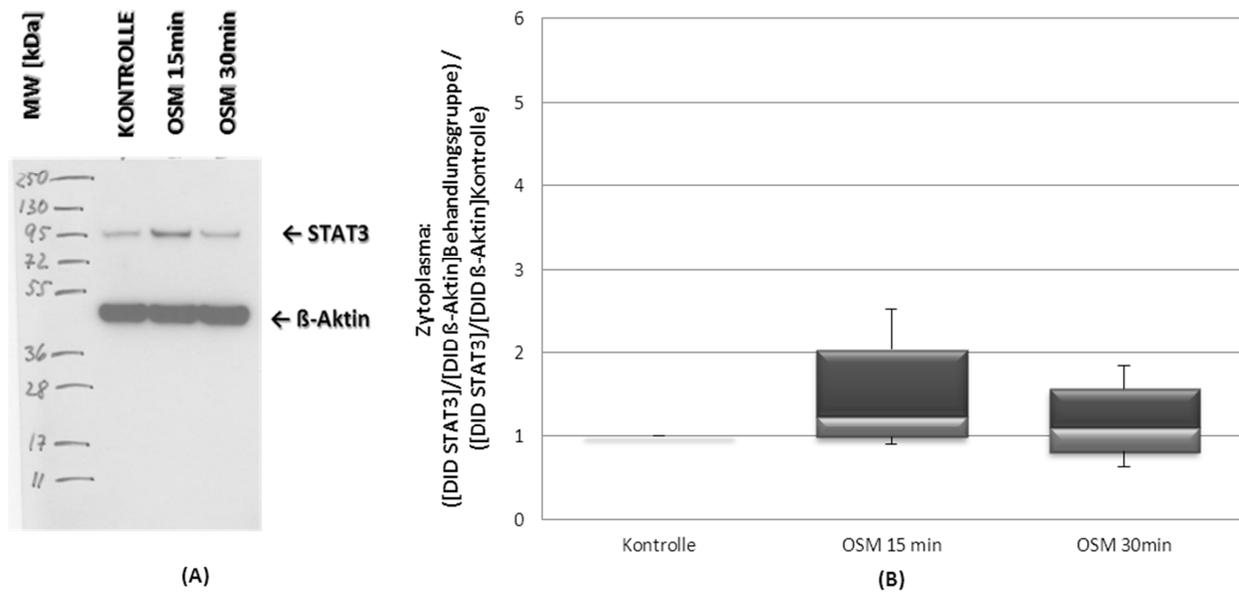


Abb. 21 Zytoplasmatische STAT3-Menge nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit OSM [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Menge erfolgte mittels gegen STAT3 und β-Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der STAT3-Bande wurde gegenüber β-Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

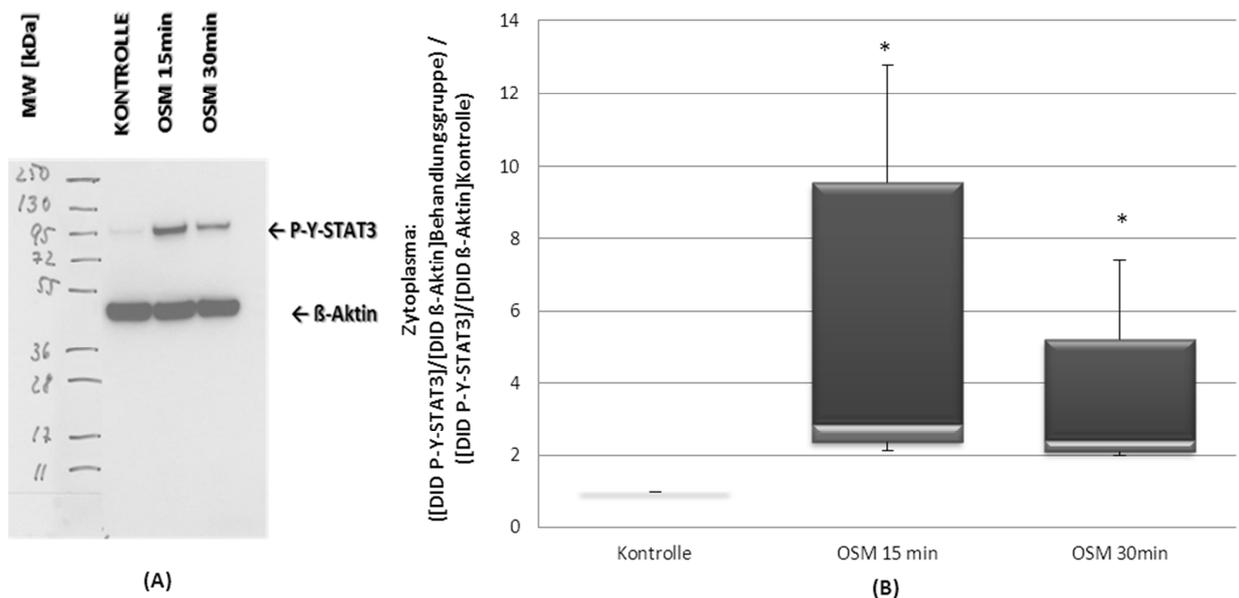


Abb. 22 Zytoplasmatische Tyrosin-Phosphorylierung des STAT3 nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit OSM [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels gegen P-Y-STAT3 und β-Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der P-Y-STAT3-Banden wurde gegenüber β-Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $*p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle.

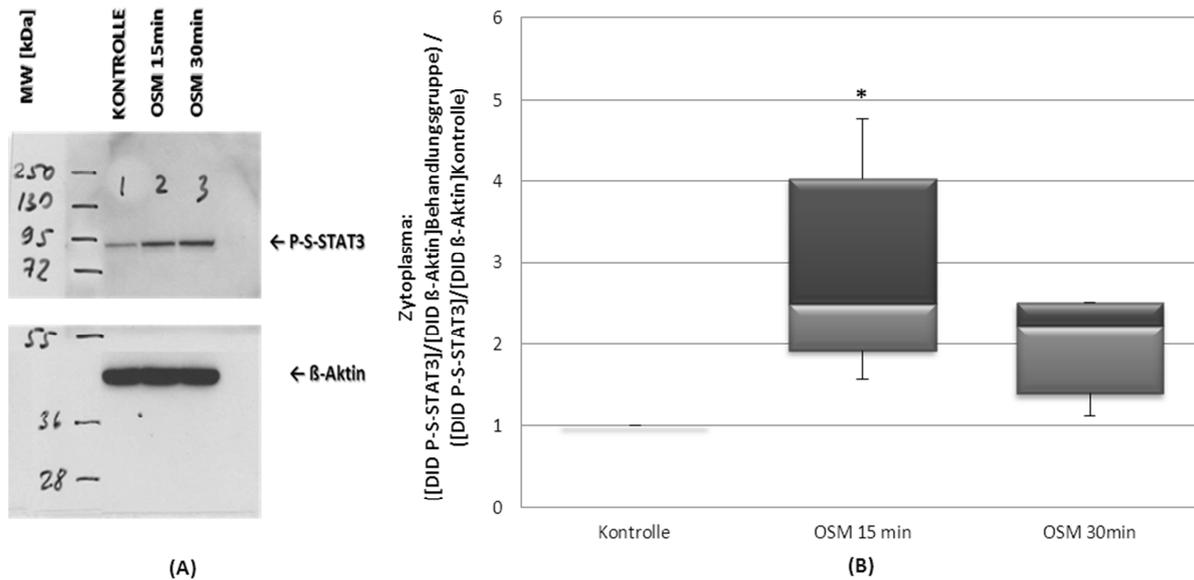


Abb. 23 Zytoplasmatische Serin-Phosphorylierung des STAT3 nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit OSM [30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels gegen P-S-STAT3 und  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der P-S-STAT3-Banden wurde gegenüber  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5). \* $p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle.

#### 5.4.4 Effekt des OSM auf die nukleäre Translokation des STAT3 und die STAT3-Phosphorylierung

Zwischen den ermittelten Quotienten bezüglich der nukleären STAT3-Proteinexpression erwiesen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Mit steigender Dauer der OSM-Inkubation (15min OSM: Median=1,52, IQR=1,25; 30min OSM: Median=1,06, IQR=2,08) ließ sich ein Aufwärtstrend der STAT-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Median=1, IQR=0) feststellen, der seinen Höhepunkt nach 15 Minuten erreichte (Abb.24).

Die P-Y-STAT3-Präsenz im Nukleus stieg nach der OSM-Behandlung für beide Inkubationszeiträume (15min OSM: Median=3,63, IQR=2,23; 30min OSM: Median=2,49, IQR=1,67) im Vergleich zur Kontrolle (Median=1, IQR=0) statistisch signifikant an (Abb.25) ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA nach Bonferroni). Der höchste Expressions-Trend wurde nach 15 Minuten erreicht, die Quotienten beider Behandlungszeiträume unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb.25).

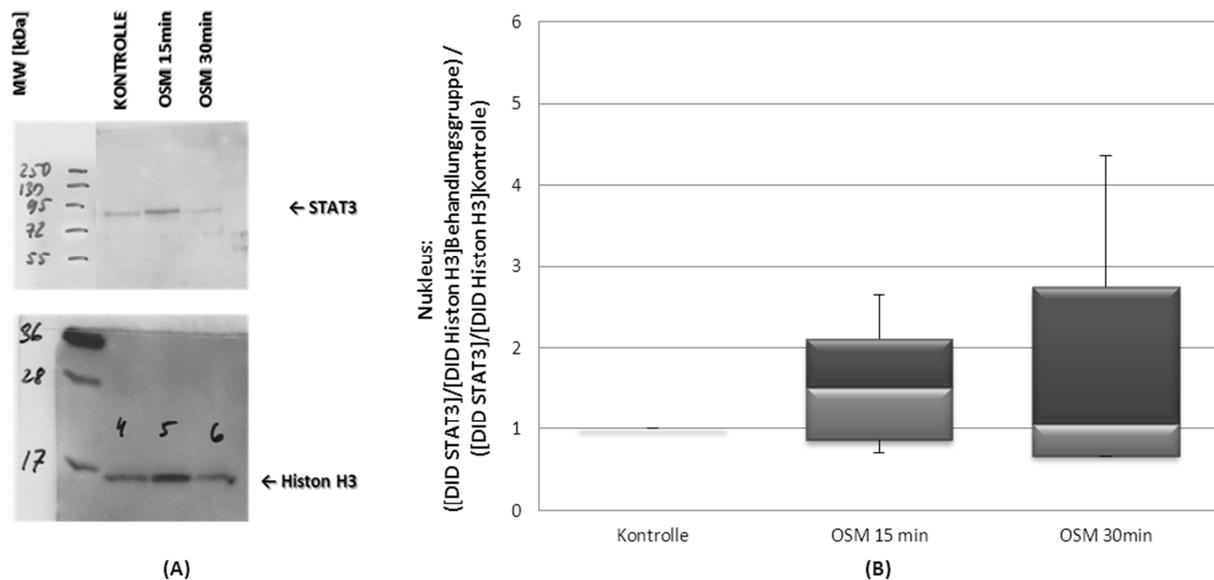


Abb. 24 Nukleäre STAT3-Menge nach einer 15- oder 30-minütigen Inkubation mit OSM[30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Menge erfolgte mittels gegen STAT3 und Histone H3 gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der STAT3-Banden wurde gegenüber Histone H3 normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

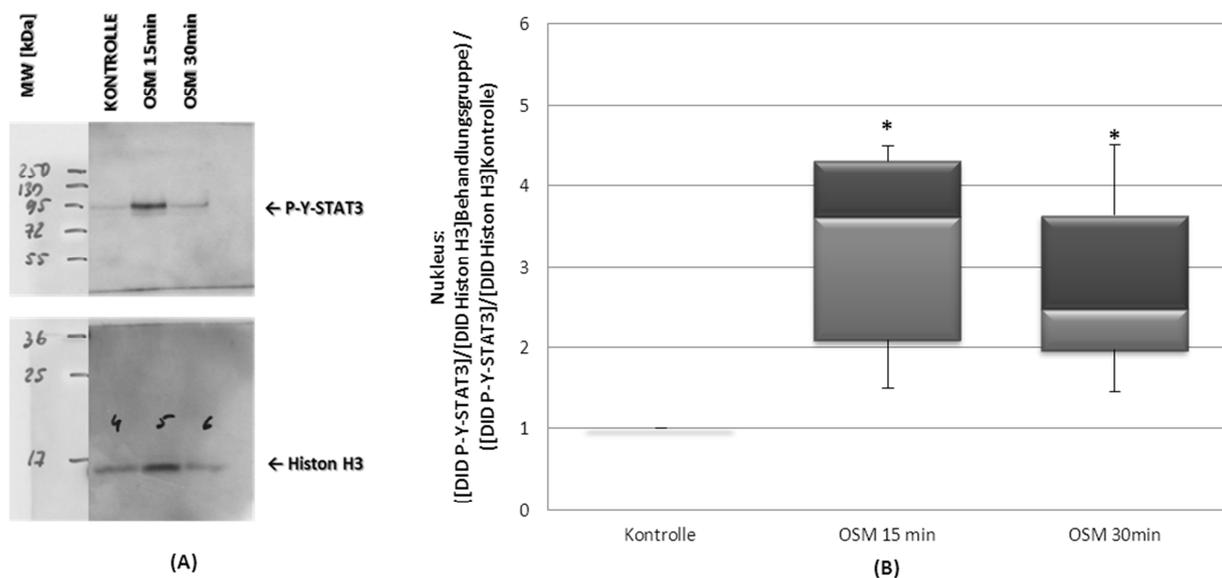


Abb. 25 Nukleäre Tyrosin-Phosphorylierung des STAT3 nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit OSM[30ng/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels gegen P-Y-STAT3 und Histone H3 gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte der P-Y-STAT3-Banden wurde gegenüber Histone H3 normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $*p < 0,05$ , statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle.

## **5.5 Effekt der Zytokine und des Ubichinons auf die Proteinexpression Apoptose-regulierender Faktoren**

Mittels Western Blottings wurden die Proteinexpressions-Änderungen von AIF, Bax, Survivin, BCL-2 und BCL-X im Anschluss an die Inkubation mit IL-6, OSM und Ubichinon analysiert. Die Explantate wurden für sechs und 14 Stunden mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] und Ubichinon [50µg/ml] inkubiert. Die optische Dichte der Banden von AIF (67kDa), Bax (20kDa), Survivin (16kDa), BCL-2 (26kDa) und BCL-X (26kDa) wurden gegenüber der von  $\beta$ -Aktin (42kDa) normalisiert. Die erhaltenen Quotienten der Behandlungsgruppen wurden gegenüber der der Kontrollgruppe, die jeweils über den gleichen Zeitraum mit Medium inkubiert worden war, ins Verhältnis gesetzt.

Bezüglich der AIF-Proteinexpression ließ sich für keine der Behandlungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied zur zugehörigen Kontrolle ermitteln (Abb.26). Es deutete sich lediglich der Trend an, dass die Werte der Behandlungsgruppen (IL-6 6h: Median=0,88, IQR=0,57; OSM 6h: Median=0,61, IQR=0,51; Ubichinon 6h; Median=0,94, IQR=0,57; IL-6 14h: Median=0,72, IQR=0,80; OSM 14h: Median=0,83, IQR=0,76; Ubichinon 14h; Median=0,23, IQR=0,75) gegenüber der Kontrolle (jeweils Median=1, IQR=0) abnahmen (Abb.26).

Die Bax-Expression wies für keine der Behandlungsgruppen eine statistisch signifikante Veränderung gegenüber der zugehörigen Kontrolle auf (Abb.27). Nach sechs Stunden zeichnete sich der Trend ab, dass die Bax-Expression nach IL-6 Behandlung gegenüber der Kontrolle (Median=1, IQR=0) zunahm (Median=1,30, IQR=1,01), nach OSM nahezu unverändert blieb (Median=1,01, IQR=1,81) und nach Ubichinon abnahm (Median=0,88, IQR=2,04). Nach 14 Stunden IL-6-Behandlung nahm die Expression gegenüber der Kontrolle (Median=1, IQR=0) Trend-mäßig ab (Median=0,83, IQR=0,86) und blieb nach OSM- (Median=1,02, IQR=1,23) und Ubichinon-Behandlung (Median=1,07, IQR=1,04) nahezu unverändert (Abb.27).

Durch die sechs- und 14-stündige Inkubation mit IL-6 (6h: Median=1,27, IQR=2,04; 14h: Median=1,33, IQR=1,99), OSM (6h: Median=1,56, IQR=3,19; 14h: Median=1,35, IQR=2,06) und Ubichinon 6h: Median=1,98, IQR=4,60; 14h: Median=0,81, IQR=0,55) ergaben sich für die Survivin-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb.28). Als Trend ließ sich feststellen, dass alle Behandlungen, bis auf die 14-stündige Ubichinon-Inkubation, zu einer Erhöhung des Survivin-Levels führten (Abb.28).

Hinsichtlich der BCL-2-Proteinexpression konnte weder für die sechs-stündige (IL-6: Median=0,99, IQR=0,75; OSM: Median=1,07, IQR=1,54; Ubichinon: Median=1,19, IQR=0,77), noch für die 14-stündige (IL-6: Median=1,08, IQR=0,44; OSM: Median=1,07, IQR=0,93;

Ubichinon: Median=0,93, IQR=0,51) Inkubation ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der zugehörigen Kontrolle (jeweils Median=1m IQR=0) nachgewiesen werden (Abb.29). Während die IL-6- und OSM-Inkubation die Expression kaum beeinflusste, ergab sich für die Ubichinon-Behandlung nach sechs Stunden ein Aufwärtstrend und für die nach 14 Stunden ein Abwärtstrend (Abb.29).

Die BCL-X-Proteinexpression ergab innerhalb keiner der Behandlungsgruppen einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der zugehörigen Kontrolle (Abb.30). Es ließen sich lediglich folgende Trends feststellen: Die sechsstündige IL-6 Inkubation (Median=1,04, IQR=0,64) führte zunächst zu keiner Änderung gegenüber der Kontrolle (Median=1, IQR=0), nach 14 Stunden (Median=1,16, IQR=0,43) zeigte sich ein Aufwärtstrend im Vergleich zur Kontrolle (Median=1, IQR=0); OSM führte nach sechs Stunden (Median=0,89,IQR=1,91) zu einer geringen Abnahme gegenüber der Kontrolle (Median=1, IQR=0) und nach 14 Stunden (Median=1,02, IQR=0,26) zu keiner Veränderung gegenüber der Kontrolle; Ubichinon führte nach beiden Inkubationszeiträumen (6h: Median=0,93, IQR=0,57; 14h: Median=0,68, IQR=0,12) zu einem Abwärtstrend der BCL-X-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Median=1, IQR=0) (Abb.30).

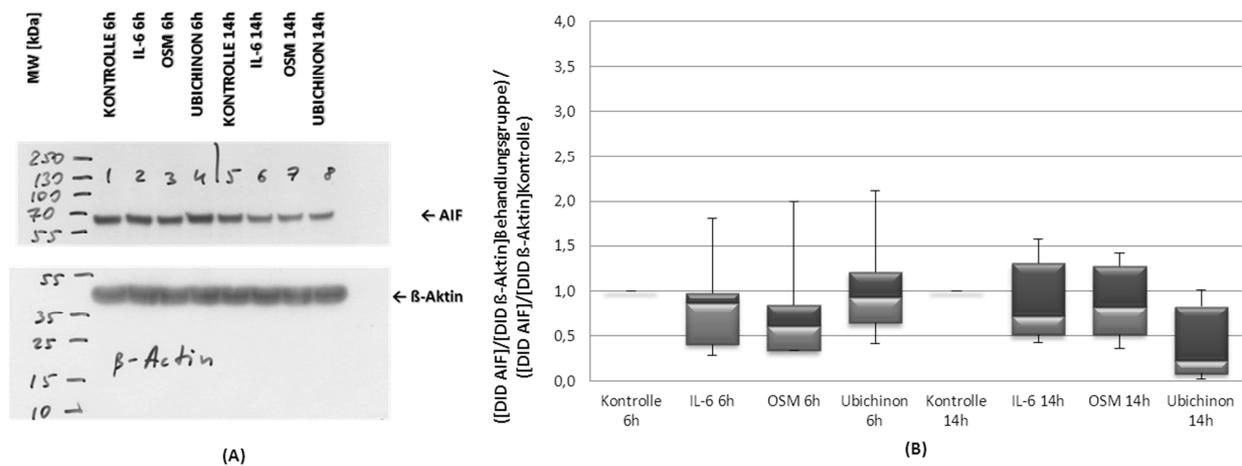


Abb. 26 AIF-Proteinexpression nach 6- oder 14-stündiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] oder Ubichinon [50µg/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen AIF und β-Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte AIF-Banden wurden gegenüber β-Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

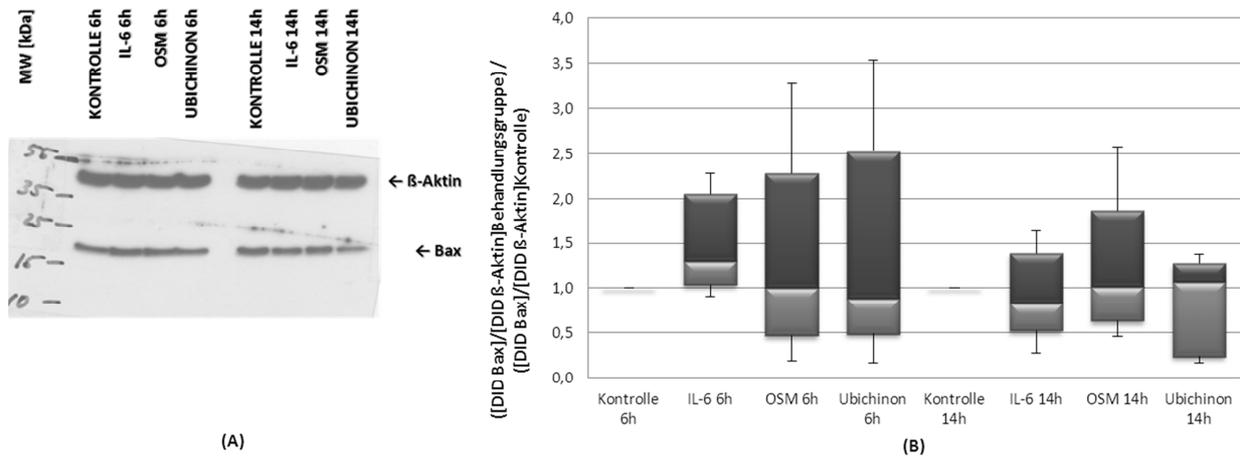


Abb. 27 Bax-Proteinexpression nach 6- oder 14-stündiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] oder Ubichinon [50 $\mu$ g/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen AIF und  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte Bax-Banden wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

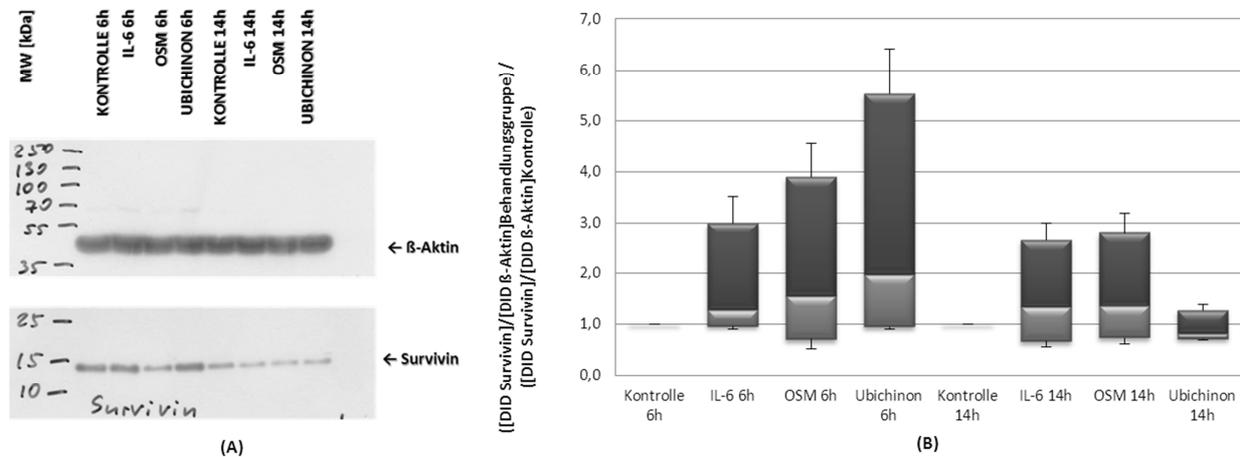


Abb. 28 Survivin-Proteinexpression nach 6- oder 14-stündiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] oder Ubichinon [50 $\mu$ g/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen AIF und  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte Survivin-Banden wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=4).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

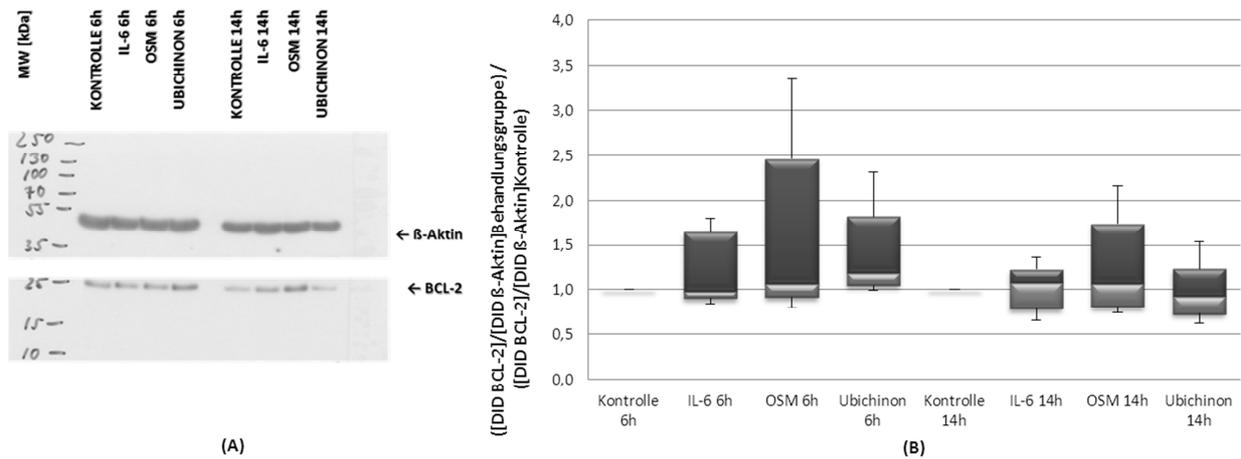


Abb. 29 BCL-2-Proteinexpression nach 6- oder 14-stündiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] oder Ubichinon [50µg/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen AIF und  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte BCL-2-Banden wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

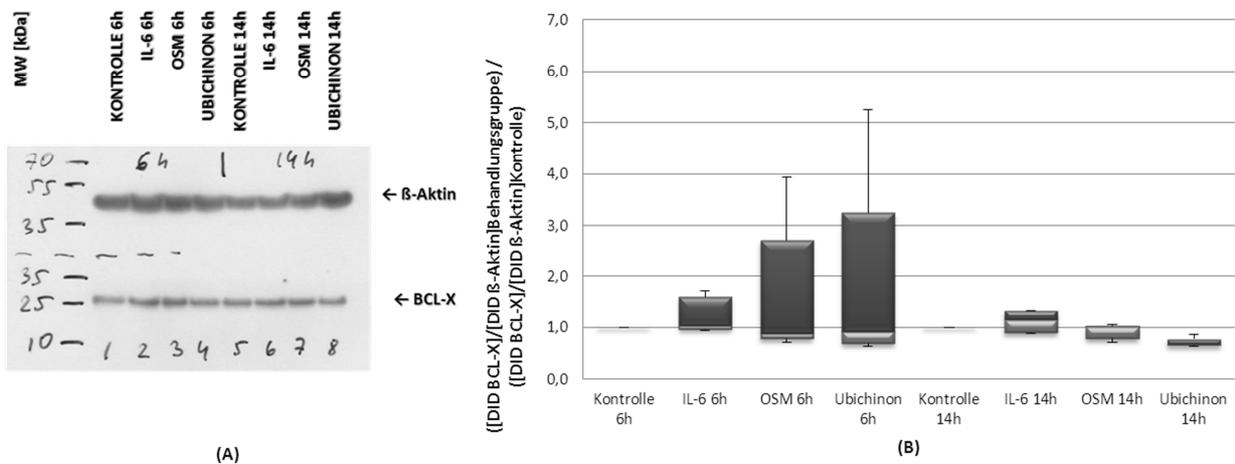


Abb. 30 BCL-X-Proteinexpression nach 6- oder 14-stündiger Inkubation mit IL-6 [30ng/ml], OSM [30ng/ml] oder Ubichinon [50µg/ml] im Vergleich zur mit Medium behandelten Kontrollgruppe. (A) Die Western-Blot-Analyse der Expression erfolgte mittels gegen AIF und  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern. (B) Die optische Dichte BCL-X-Banden wurden gegenüber  $\beta$ -Aktin normalisiert. Die berechneten Quotienten der Behandlungsgruppen wurden zu denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der ermittelten Verhältnisse erfolgt mittels sog. Box-Plots: Die Box stellt den Abstand zwischen dem ersten (untere Grenze) und dritten Quartil (obere Linie), den sog. Interquartilsabstand, dar; die Mittellinie in der Box bildet den Median ab, die Antennen erstrecken sich vom Minimum bis zum Maximum der Verteilung (n=5).  $p > 0,05$  für alle Gruppen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu ermitteln, ob STAT3 im OC einen Knotenpunkt der zellulären Signalwege darstellt, ob es durch Agentien, die unterschiedliche Wirkmechanismen nutzen, gleichermaßen induziert werden kann, welche Rolle STAT3 für die Morphologie wesentlicher Strukturen des OCs spielt, wie sich die Spiegel der verschiedenen STAT3-Phosphorylierungsprodukte in unterschiedlichen Zellkompartimenten im Anschluss an die Inkubation mit diversen Signalmolekülen verändern und ob diese Spiegeländerungen mit denen der Apoptose-regulierenden Proteine in Zusammenhang gesetzt werden kann.

### 6.2 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Bei dem verwendeten Modell handelt es sich um neugeborene Ratten, ihr Alter zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme lag zwischen drei und fünf Tagen, das Hörvermögen setzt aber erst um den elften postnatalen Tag ein <sup>51</sup>. Wir arbeiten demzufolge mit einem unreifen Modell. Ein sich entwickelnder Organismus unterscheidet sich hinsichtlich verschiedener Merkmale vom adulten Organismus, diese Beobachtung wurde hinsichtlich des OCs, zwar im Katzenmodell, bereits 1878 vom Londoner Chirurgen Urban Pritchard beschrieben <sup>52</sup>. Dieser Sachverhalt limitiert die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf die erwachsene Ratte bzw. auf das ausgereifte Innenohr. Dennoch weist dieses Modell Vorteile auf, die dazu geführt haben, dass wir es zur Untersuchung unserer Fragestellung ausgewählt haben: Aufgrund der noch knorpeligen Kapsel der *Cochlea* ist das Zielgewebe wesentlich besser zugänglich, dadurch können die Folgen der bei der Präparation unweigerlich entstehenden Gewebeverletzungen reduziert werden. Im Rahmen der *in vitro* Kultur des entnommenen Gewebes können die Auswirkungen der Anwesenheit ausgewählter Substanzen ermittelt werden und auf der Grundlage dieser Ergebnisse Protokolle für eine weitere Untersuchung im adulten Tiermodell gestaltet werden <sup>16</sup>.

Dadurch, dass im Rahmen der Betrachtung der Proteinspiegeländerungen Lysate des gesamten OCs verwendet wurden, sind Aussagen über Veränderungen stets auf das OC als Ganzes, als Gewebeverband, zu sehen und nicht als Vorgänge in individuellen Zelltypen dieses Verbandes. Gleichzeitig liegt genau darin ein methodischer Vorteil: Die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellklassen im Gewebeverband blieb während der Inkubation erhalten, was den physiologischen Vorgängen *in vivo* ähnlicher ist als die Betrachtung einer einzelnen Zellart in Zellkultur ohne interzelluläre Kommunikation und ohne die sich daraus entwickelnden Phänomene <sup>16</sup>.

Ausgewählte Zellarten wurden allerdings hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Obwohl diese Analyse unter definierten Standards erfolgte, ist nicht sicher zu überprüfen, ob eine morphologisch als defekt kategorisierte Zelle, tatsächlich auch funktionell defekt ist und vor allem ob eine intakt erscheinende Zelle tatsächlich uneingeschränkt ihre Funktion erfüllt. Das begründet sich einerseits in einer nicht vollkommen auszuschaltenden Rest-Abhängigkeit vom Evaluierenden und andererseits in der fehlenden Möglichkeit, im *in vitro* Modell Rückschlüsse auf die Funktionalität der Haarzellen ziehen zu können. Wenn Noxen eine Zelle allerdings soweit schädigen, dass sie ihre strukturelle Integrität nicht mehr wahren kann, liegt in der Regel eine funktionseinschränkende Schädigung vor. Setzt man diese Bedingung voraus, können modellhaft Schlussfolgerungen bezüglich der Funktion gezogen werden. Für das Phänomen der Cisplatin-induzierten Ototoxizität ist dieses Vorgehen weithin anerkannt.

### **6.3 Interpretation der Ergebnisse und Literaturvergleich**

#### **6.3.1 Effekte der Zytokine und des Ubichinons auf die Strukturen des OCs im Rahmen Cisplatin-induzierter Ototoxizität**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-6, OSM und Ubichinon sowohl die inneren als auch die äußeren Haarzellen in allen Abschnitten der *Cochlea* statistisch signifikant vor Cisplatin-induzierter Ototoxizität schützen konnten. Auch die Neuronenfortsatz-Dichte erreichte über die gesamte Spannweite der *Cochlea* in den mit den Protektiva präinkubierten und im Anschluss simultan mit Cisplatin inkubierten Explantaten statistisch signifikant höhere Werte als in den mit Cisplatin behandelten Explantaten. Durch den STAT3-Inhibitor WP1066 konnte der durch die Zytokine vermittelte protektive Effekt aufgehoben werden, der durch Ubichinon vermittelte Effekt hingegen nicht.

##### **6.3.1.1 Zytokine der IL-6-Familie und ihr Effekt auf die Strukturen des OCs im Rahmen Cisplatin-induzierter Ototoxizität**

Versucht man Schlussfolgerungen aus den Zytokin-vermittelten Effekten zu ziehen, muss man sich zunächst genauer mit den beiden für die Familie der IL-6-Zytokine exemplarisch ausgewählten Mediatoren beschäftigen. IL-6 ist dem Mediziner im klinischen Alltag ähnlich wie das C-reaktive Protein und das Serum-Procalcitonin vor allem als Indikator und Parameter zum Monitoring eines „*Systemic inflammatory response syndrome*“ (SIRS) oder eines SIRS mit nachgewiesenem infektiösen Ursprung, der Sepsis, bekannt<sup>53</sup>.

Tatsächlich ist IL-6 daran beteiligt, die fulminante Kaskade eines SIRS in Gang zu setzen, allerdings muss es, um diesen Effekt zu vermitteln, systemisch im Serum zirkulieren. Die

lokalen Effekte, die IL-6 ohne Übertritt hoher Konzentrationen in den systemischen Kreislauf auf ein Gewebe ausübt, unterschieden sich in Abhängigkeit des Gewebetyps, des Differenzierungsgrads des Gewebes, der IL-6-Konzentrationen und der Wirkungsdauer des Mediators auf das Gewebe, deutlich von den systemisch induzierten Effekten. Mitazaki et al. unterscheiden in einer ihrer Arbeiten ebenfalls zwischen systemischen und lokal in ausgewählten Organen induzierten Effekten: Das Ausmaß akuten Nierenversagens im Anschluss an Cisplatin-Administration wurde zwischen IL-6-Knock-out-Mäusen und dem Wildtyp verglichen<sup>54</sup>. In den Knock-out Mäusen zeigten sich lokal in der Niere verstärkt inflammatorische Prozesse, im Vergleich systemisch jedoch weniger stark ausgeprägte inflammatorische Prozesse<sup>54</sup>. Diese Beobachtung geht damit einher, dass bei fehlendem IL-6 akutes Nierenversagen seltener auftrat, die Gesamtüberlebensrate der Mäuse allerdings im Wildtyp höher war<sup>54</sup>. Man kann also deutlich schlussfolgern, dass sich die lokalen IL-6-Effekte durchaus von den systemisch vermittelten Effekten unterscheiden. In diesem Zusammenhang muss ebenfalls die Rolle der infiltrierenden Leukozyten diskutiert werden: Man könnte anmerken, dass die Reduktion der Nephrotoxizität bei fehlendem IL-6 durch die reduzierte Infiltration mit Leukozyten vermittelt wurde. Mitazaki et al. beschreiben allerdings, dass sie IL-6 vor allem im tubulären Epithel der Nieren nachweisen konnten und weniger in den invadierenden Neutrophilen<sup>54</sup>. Wir können schlussfolgern, dass durch die systemische Cisplatin-Zirkulation im Organismus als Ganzem verglichen mit verschiedenen Organen unterschiedliche Effekte erzielt werden. Setzt man voraus, dass Cisplatin IL-6-vermittelte Signalwege induziert, könnte eine lokale Präinkubation mit IL-6 die Effekte durch die anschließend durch Cisplatin angeregten und hypothetisch über IL-6 vermittelten Signalwege, auf das präinkubierte Gewebe begrenzt, modulieren. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit applizierten Mitazaki und Kollegen das Cisplatin intraperitoneal systemisch und nicht *in vitro*. Ein sich an die vorliegende Arbeit anschließender Arbeitsschritt wäre demnach, das potentielle Protektivum *in vivo* lokal und Cisplatin systemisch zu applizieren. Für viele Organe würde sich aus diesem Versuchsaufbau die technische Schwierigkeit ergeben, ein Reagenz streng lokal begrenzt zu applizieren. Hier stellt das Innenohr eine Besonderheit dar: Mit Hilfe transtympanischer Injektionen ist es möglich, Wirkstoffe in das Innenohr einzubringen, wo sie lokal begrenzt ihre Wirkung vermitteln<sup>9, 55, 56</sup>. Da das Innenohr aufgrund seiner Anatomie einen abgegrenzten Raum darstellt, können lokal hohe Wirkstoffpegel erreicht werden, ohne dass systemisch gesteigerte Spiegel erreicht werden<sup>9</sup>. Das ist vor allem bezüglich des hier verwendeten Protektivums günstig, da IL-6 systemisch wie oben bereits erwähnt generalisierte inflammatorische Prozesse induzieren kann. Bedingt durch diese Abgeschlossenheit kann zudem eine lokale Protektion erreicht werden, ohne die systemische, therapeutische Wirkung des Cisplatin abzuschwächen<sup>7</sup>.

Durch diesen Applikationsweg könnten die durch Rybak et al. zusammengestellten Anforderungen an ein Otoprotektivum erfüllt werden: Das Protektivum wäre lokal ungiftig, es könnten hohe Konzentrationen im Innenohr erreicht werden und Cisplatin's systemischer zytostatischer Effekt würde nicht reduziert werden <sup>7,9</sup>.

Die Beziehung zwischen IL-6 vermittelten Signalwegen und Cisplatin-induzierter Oto-toxizität im Innenohr wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht, zum Teil auch mit Ergebnissen, die unseren Beobachtungen auf den ersten Blick widersprechen. Kim et al. untersuchten den Einfluss von Cisplatin auf das vestibuläre System *in vivo* und *in vitro*: Zum Einen injizierten sie Mäusen Cisplatin intraperitoneal und untersuchten die Folgen, zum Anderen wurden immortalisierte, bipotente, utrikuläre Zellen (UB/UE-1), die sich in vestibuläre Stütz- und Haarzellen entwickeln können, für 24 Stunden mit Cisplatin behandelt <sup>25</sup>. Im Anschluss an die Inkubation beobachteten die Autoren eine gesteigerte Expression und Sekretion der sogenannten „proinflammatorischen Zytokine“ TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 *in vitro* und *in vivo*, darüber hinaus beschrieben sie eine erhöhte NF $\kappa$ B-Expression und nukleäre Translokation sowie die Beobachtung, dass die Zytokine nicht nur aus invadierenden Leukozyten stammen, sondern auch aus den Gewebe-eigenen Stütz- und vestibulären Haarzellen <sup>25</sup>. So et al. verwendeten ebenfalls sowohl ein *in vitro* Modell als auch ein *in vivo* Modell: HEI-OC-Zellen wurden mit Cisplatin behandelt, dabei handelt es sich um immortalisierte, auditorische Haarzell-Marker-exprimierende Zellen <sup>26</sup>. Außerdem wurde Ratten Cisplatin intraperitoneal appliziert und entnommenes cochleäres Gewebe sowie ihr Serum analysiert <sup>26</sup>. *In vivo* wurde ein Anstieg der mRNA-Level der „proinflammatorischen Zytokine“ im Serum und in den *Cochleae* beschrieben, dieser Anstieg konnte durch die Inkubation mit einem TNF $\alpha$ -Inhibitor (Etanercept) vermindert werden, *in vivo* konnte die durch Cisplatin-induzierte Schädigung der Zellen durch intraperitoneale Applikation dieses Inhibitors reduziert werden <sup>26</sup>. *In vivo* zeigte sich der TNF $\alpha$ -Anstieg im Anschluss an die Inkubation mit Cisplatin vor allem im Spiralligament, im Spirallimbus und im OC, die NF $\kappa$ B-Expression wurde im OC, im Spiralligament und in der *Stria vascularis* induziert, *in vitro* erfolgte die Steigerung der IL-6-, TNF $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ -Expression unabhängig von den Änderungen der mRNA-Expression, was für vorexistierende Speicher dieser Zytokine spricht <sup>26</sup>. Die Autoren beschrieben zudem eine erhöhte nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B in den Nukleus, nachdem HEI-OC-Zellen mit den Zytokinen behandelt wurden <sup>26</sup>. Beide Arbeitsgruppe zitieren die Arbeiten von Ramesh et al., in der die Autoren beschreiben, dass Cisplatin *in vivo* unter der Induktion von TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , RANTES, MIP-2, MCP-1, ICAM und IL-1 $\beta$  zu schwerem Nierenversagen führt, und die von Yoshida et al., in deren Rahmen gezeigt wurde, dass die *in vitro* Behandlung von einer Spiralligament-Fibrozyten-Zelllinie mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  die Expression von IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1, KC, MIP-2,

sICAM und VEGF induzierte, was, den Schlussfolgerungen der Autoren zufolge, *in vivo* zur Inflammation und Dysfunktion der Fibrozyten und folglich zu cochleären Funktionsstörungen führen könnte<sup>57,58</sup>. Um die Diskrepanzen zu den Ergebnissen dieser Arbeiten und der hier vorliegenden zu erklären, muss man zunächst den methodischen Aufbau analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Prozesse in einem Gewebe-Explantat untersucht. Es handelt sich um *in vitro* Experimente, jedoch bleibt die Kommunikation unter den verschiedenen Zelltypen im Gewebeverband erhalten. Bis auf die Arbeit von Ramesh et al. leiten sich die Ergebnisse der anderen Arbeiten zumindest teilweise aus Experimenten an immortalisierten Zelllinien ab. Die den vestibulären und cochleären Haarzellen ähnlichen Zelllinien unterschieden sich allein schon durch ihre Immortalität in verschiedenen Signalwegen von ihren im eigentlichen Gewebe lokalisierten Vorbildern. Gerade Apoptose-vermittelnde oder -hemmende Signalwege spielen für die Induktion oder Hemmung der Ototoxizität eine maßgebliche Rolle und können sich in Zelllinien grundlegend von post-mitotischen Haarzellen *in vivo* und im Gewebeverband *in vitro* unterscheiden. Dieser mögliche Unterschied wird dadurch verschärft, dass eine Zelle im Gewebeverband stets in interzellulärer Kommunikation zu den umgebenden Zellen steht, durch beispielsweise in den verschiedenen Stützzellen und Spiralganglionzellen induzierte Effekte können Haarzellen parakrin beeinflusst werden. So stellen Stützzellen neben Bausteinen des Gewebes auch Vermittler des Überlebens, der Funktion, Differenzierung, Apoptose und Phagozytose der Haarzellen dar und sind zudem am Überleben der Spiralganglionneuronen beteiligt<sup>59</sup>. Die Rolle der Stützzellen im OC ähnelt der der Gliazellen im zentralen Nervensystem, die beispielsweise für trophischen Support sorgen und Glutamat nach Signalübertragung aus dem synaptischen Spalt schleusen<sup>59</sup>. Darüber hinaus geht man davon aus, dass die Haarzellen, vermittelt von ERK-Signalwegen in den Stützzellen, über etwaige Schädigung kommunizieren und gemeinsam den Weg der Apoptose einschlagen<sup>59</sup>. Auch Raphael et al. schildern die tragende Rolle der Stützzellen im Rahmen von Regeneration und Verteidigung gegen toxische Einflüsse: So bilden Stützzellen am Sitz der zugrunde gegangenen Haarzellen Narben, die die entstandene Lücke versiegeln und damit eine Vermischung der funktionsrelevanten Flüssigkeitskompartimente verhindern<sup>60</sup>. Die Autoren führen weiterhin aus, dass Makrophagen nach Läsionen nur sporadisch im OC zu beobachten sind, dass Stützzellen ihre Rolle teilweise übernehmen und es sich bei den durch Phagozyten und Stützzellen induzierten inflammatorischen Prozessen um Mechanismen der Regeneration handelt, die, wenn sie aus der Balance geraten, aber auch schädigende Effekte erzielen können<sup>60</sup>. In einer Zelllinie können diese Effekte, die das Ergebnis eines komplexen Netzwerks von Signalwegen verschiedener Zellen darstellen, nur bedingt beobachtet werden, was Diskrepanzen zu Beobachtungen in Gewebe-Explantaten möglicherweise erklärt.

Weitere Abweichungen zu den vorliegenden Ergebnissen lassen sich teilweise dadurch erklären, dass nicht die Auswirkungen des IL-6 allein betrachtet worden ist. Wenn IL-6 untersucht wurde, dann stets im Zusammenhang mit den Spiegeländerungen verschiedener Zytokin-Gemische<sup>57</sup>. Wirken verschiedene Zytokine gleichzeitig auf eine Zelle, beeinflussen sich die induzierten Signalwege gegenseitig und der beobachtete Effekt ist ein Ergebnis dieses Wechselspiels. Die Ergebnisse können sich folglich durchaus von denen unterscheiden, die wir im Rahmen der lokalen Inkubation mit einem einzelnen Zytokin beobachten.

So et al. betrachten hingegen TNF $\alpha$  genauer: Die HEI-OC-Zellen wurden vor der Cisplatin-Behandlung mit Antikörpern gegen TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 behandelt, nur durch die TNF $\alpha$ -Blockade konnten die Zellen vor Toxizität geschützt werden, *in vivo* wurde simultan zur intraperitonealen Cisplatin-Applikation Etanercept intraperitoneal injiziert<sup>26</sup>. Durch diese Applikation konnte der Serumanstieg der „proinflammatorischen Zytokine“ verhindert werden und die Apoptose in der *Cochlea* reduziert werden. Cisplatin-induzierte, cochleäre Schäden wurden demzufolge hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von TNF $\alpha$  untersucht und nicht hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von IL-6.

Darüber hinaus ist die Wirkung von TNF $\alpha$  durch die intraperitoneale Applikation von Etanercept systemisch aufgehoben worden<sup>26</sup>. Eine systemische Inhibition beeinflusst die Homöostase des Immunsystems systemisch, beispielsweise durch ein verändertes Gewebe-Invasionsverhalten der Leukozyten. Es ist durchaus möglich, dass indirekt als Folge dieser veränderten Balance induzierte Prozesse zu den beobachteten Ergebnissen führen und die Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, im Rahmen derer die Zytokin-Applikation lokal erfolgte, erklären.

Für OSM konnte ein sehr ähnliches Protektionsprofil beschrieben werden, was auf die enge Verwandtschaft der beiden Zytokine zurückzuführen sein könnte. IL-6 und OSM weisen wie ihre direkten Verwandten LIF, CNTF und CT-1 sehr starke funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten zueinander auf und weisen starke Parallelen und Überlappungen hinsichtlich ihrer Funktion auf<sup>61</sup>. Die funktionelle Redundanz der beiden Zytokine ergibt sich möglicherweise daraus, dass sie beide mit Hilfe der gp130-Rezeptoruntereinheit intrazelluläre Signalwege induzieren<sup>61</sup>. Gp130 wird allgegenwärtig exprimiert und ist Bestandteil des Signal-vermittelnden Rezeptorkomplexes verschiedener Zytokine<sup>27</sup>. Bekannt geworden ist gp130 vor allem durch seine Expression im hämatopoietischen System, es wird aber auch auf anderen Zelltypen exprimiert, wobei das Ausmaß der Expression vom Aktivierungszustand der Zelle abhängen kann<sup>27</sup>. Fehlendes gp130 führte bei Mäusen zum bereits embryonal eintretenden Tod und defektes gp130 zu hämatopoietischen, kardialen, neurologischen, hepatischen, pulmonalen und immunologi-

schen Funktionsdefekten<sup>27</sup>.

Im Rahmen der Literaturrecherche dieser Arbeit konnten für OSM im Gegensatz zu IL-6 noch keine Daten zur Rolle dieses Zytokins im Innenohr gefunden werden. Xia et al. konnten allerdings im Rahmen der *Retinitis pigmentosa*, einer spontanen oder genetisch bedingten Degeneration der Photorezeptoren des Auges mit charakteristisch fortschreitendem Sehverlust, durch OSM vermitteltes protektives Potential nachweisen<sup>31</sup>. OSM schützte sowohl Zapfen als auch Stäbchen, wobei die Protektion über die umliegenden Müller-Zellen, die „Gliazellen“ des Auges, und einen Anstieg der STAT3-Aktivierung in diesen Zellen vermittelt wurde<sup>31</sup>. Wie in der vorliegenden Arbeit beziehen sich die Autoren auf die überlappenden Funktionen der verschiedenen IL-6-Familie-Zytokinen und zitieren eine Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass CNTF und LIF, zwei weitere Vertreter dieser Familie, eine wichtige Rolle im Rahmen der Regeneration von Axonen der retinalen Ganglienzellen spielen<sup>62</sup>. Verletzt man im Vorfeld einer *Nervus opticus* Schädigung die Linse oder behandelt das Auge mit Zymosan, so entwickeln die Axone ein regeneratives Potenzial, die Autoren konnten zeigen, dass dieser Prozess durch CNTF und LIF vermittelt wird, dass bei Ausschaltung eines Zytokins das andere den Effekt vermitteln kann und dass der Effekt bei gleichzeitiger Blockade beider Zytokine nicht auftrat<sup>62</sup>. Diese Beobachtungen stützen zum Einen die oben ausgeführte Erklärung für das parallele Protektionsmuster der beiden Zytokine, betonen die mögliche Bedeutung der Stützzellen im Umfeld der eigentlichen Sinnesorgane für die Vermittlung der Protektion und zum Anderen geben sie den Anreiz für weitere Untersuchungen: Wir wählten IL-6 aus den in der Einleitung erwähnten Gründen aus und OSM aufgrund der hohen Expression seines Rezeptors im Innenohr, in anschließenden Arbeiten gilt es zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Protektion um einen Effekt handelt, der auch für weitere Mitglieder der IL-6-Zytokin-Familie oder eventuell sogar für die gesamte Familie charakteristisch ist. Vor allem für LIF beobachtete Effekte lassen sich mit höherer Wahrscheinlichkeit auch für OSM nachweisen, da beide Zytokine sehr eng miteinander verwandt sind und OSM seine Wirkung im Menschen beispielsweise auch über den aus dem LIF-R und gp130 formierten Rezeptor induzieren kann<sup>31</sup>.

Die Zytokine der IL-6-Zytokinfamilie werden wie eingangs beschrieben auch als „Neurokine“ bezeichnet, ihr protektives Potential im Nervensystem wurde bereits weitaus umfangreicher untersucht als das im Innenohr<sup>28, 32</sup>. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte für IL-6 im medialen und für OSM im apikalen und basalen Abschnitt des OCs eine statistisch signifikant erhöhte Neuronenfortsatz-Dichte im Vergleich zur allein und ohne IL-6- oder OSM-Präinkubation mit Cisplatin behandelten Gruppe beschrieben werden. Gp130-induzierte Signalwege scheinen für die Vermittlung der Neuroprotektion ausschlaggebend zu sein: Über das akti-

vierte gp130 werden verschiedene Signalwege induziert - der JAK/STAT3-, Ras/MAPK- und der PI3K/Akt-Weg<sup>19</sup>. Mit Hilfe des Einsatzes verschiedener Kinase-Inhibitoren in PC12-Zellen, konnten dem PI3K-Weg maßgebliche, dem JAK/STAT3-Weg geringere und dem MAPK-Weg untergeordnete neuroprotektive Bedeutung zugeordnet werden<sup>19</sup>. Da beide in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zytokine ihre Wirkung mit Hilfe des gp130 induzieren, könnte die den Zytokinen gemeine Nutzung des gp130 das ähnliche Wirkungsprofil von OSM und IL-6 erklären. Auffällig ist allerdings, dass die beiden Zytokine jeweils in unterschiedlichen Abschnitten des OCs eine statistisch signifikante Protektion erreichten. Das erklärt sich möglicherweise dadurch, dass das jeweilige Zytokin in unterschiedlichem Maße die sich anschließenden Signalwege induziert und sich aus der Balance der verschiedenen Signalwege unterschiedliche Effekte ergeben. Darüber hinaus können sich die unterschiedlichen Protektionsmuster auch anhand des besonderen Zustands, in dem sich die Neuronenfortsätze zu dem Zeitpunkt der Gewebeentnahme befinden, begründen lassen. Kontakte zwischen Haarzellen und Spiralganglionneuronen bilden sich in den Modellen der Maus und der Ratte bereits embryonal aus und werden erst mit Einsetzen des Hörens feinmoduliert, um das Überleben bis dahin zu sichern, reicht minimale Haarzellaktivität aus<sup>63</sup>. Die Dichte, mit der die Haarzellen innerviert werden, hängt direkt mit der Tonotopie der *Cochlea* zusammen: Medial, wo die für die Kommunikation am bedeutsamsten Frequenzen verarbeitet werden, besteht eine höhere Innervationsdichte als apikal und basal<sup>64</sup>. Diese Ausreifung der Tonotopie wird maßgeblich von sogenannten Neurotrophinen vermittelt, die besonders in der Entwicklung des OCs exprimiert werden<sup>3</sup>. Besonders wichtig sind die beiden Vertreter BDNF und NT3, NT3 wird von apikal nach basal in absteigender Stärke exprimiert, für BDNF verhält es sich umgekehrt, ihr Verhältnis zueinander beeinflusst die Ausbildung der charakteristischen Verteilung der synaptischen Kontakte<sup>3</sup>. Die Balance, die NT3 und BDNF miteinander ausbilden, kann durch die Inkubation mit Zytokinen moduliert werden<sup>3</sup>. So ist es beispielsweise vorstellbar, dass OSM und IL-6 auf unterschiedliche Art und Weise sowie in unterschiedlichem Umfang in das Neurotrophin-Gleichgewicht eingreifen oder die verschiedenen Neurotrophine entlang der *Cochlea* eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber den beiden Zytokinen erzeugen und sich das differierende Protektionsmuster daraus ergibt. Whitlon et al. konnten im Modell der Kultur explantierter Spiralganglionneuronen protektives Potential für LIF, CNTF und OSM nachweisen, für IL-6 hingegen nicht<sup>65</sup>. Die Autoren beobachteten ebenfalls ein differierendes Protektionsprofil der verschiedenen Zytokine - Diskrepanzen zur vorliegenden Arbeit ergeben sich möglicherweise daraus, dass Whitlon und Kollegen die Spiralganglionneuronen neugeborener Mäuse zunächst aus dem Gewebe dissoziierten und dann separat kultivierten<sup>65</sup>. Die vorliegenden Beobachtungen zum neuroprotektiven Potential der Zytokine stehen im Einklang mit verschiedenen

Arbeiten aus der neurologischen Forschung, so konnten Hyatt et al. für IL-6 und LIF eine maßgebliche Rolle in der Regeneration von Axonen im Anschluss an deren Durchtrennung beschreiben und Callizot et al. beschrieben im Modell der Ratte eine durch IL-6-induzierte Reduktion Cisplatin-vermittelter Neurotoxizität<sup>66-68</sup>. Andererseits ist IL-6 auch in die Entstehung verschiedener neurologischer Krankheiten, wie der disseminierten Enzephalitis, involviert, wobei es seine Wirkung hier vor allem im Zusammenspiel mit TGF $\beta$  und vermittelt über das Verhältnis verschiedener T-Lymphozyten zueinander und nicht als einzelner Inkubationszusatz - wie in der vorliegenden Arbeit - erreicht<sup>27</sup>. Darüber hinaus hängt die durch Zytokine im Nervensystem erreichte Wirkung, wie bereits von Wang et al. beschrieben, von der erreichten IL-6-Konzentration und der bestehenden, beispielsweise inflammatorischen Vorschädigung des Gewebes ab<sup>24</sup>.

Es ist zusammenfassend zusätzlich davon auszugehen, dass die Neuriten der Spiralganglionneurone und die Haarzellen miteinander kommunizieren, vor allem in dem sich noch entwickelnden Zustand, in dem das OC explantiert wurde, und sich in den durch die Zytokine vermittelten Wirkungen gegenseitig beeinflussen.

### ***6.3.1.2 Ubichinon und sein Effekt auf die Strukturen des OCs im Rahmen Cisplatin-induzierter Ototoxizität***

Dass Cisplatin seine ototoxische Wirkung über DNA-Addukte vermittelt, ist weithin bekannt und wurde eingangs bereits erläutert. Um die in der vorliegenden Arbeit beschriebene, durch Ubichinon vermittelte Oto- und Neuroprotektion diskutieren und verstehen zu können, muss man sich mit den weiteren zahlreichen Prozessen beschäftigen, die Cisplatin in einer Zelle auslöst. In vielen Arbeiten wird ein Zusammenhang zwischen ansteigenden ROS-Pegeln und Cisplatin induzierter Toxizität beschrieben. Fehlerhafte oder geschädigte DNA wird normalerweise durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem der Zelle erkannt und Fehler werden behoben, die durch Cisplatin induzierte Formänderung der DNA lockt allerdings sogenannte „*High-mobility-group*“- (HMG-) Proteine an, die eine hohe Affinität zu diesen Strukturen aufweisen, sich an diese anlagern und von den Mediatoren der Reparationsmechanismen abschirmen<sup>10</sup>. Durch die fehlende Reparatur werden Replikation und Transkription gestört, was die Toxizität des Cisplatins gegenüber sich schnell teilenden Zellen wie Tumorzellen und stark Protein-produzierenden Zellen wie Neuronen erklärt<sup>10,69</sup>. Als Folge führen diese Prozesse, zum Teil über den Anstieg von ROS, zur Apoptose-Einleitung<sup>10,69</sup>. Darüber hinaus ist Cisplatin auch in der Lage, den ROS-Spiegel indirekt zu erhöhen: Es beraubt die Zelle ihrer antioxidativen Verteidigungsmechanismen<sup>7</sup>. Es bindet direkt an die Schwefelwasserstoffgruppen, die für die Wirkung

der Antioxidantien ausschlaggebend sind, es reduziert die Kupfer- und Zinkvorkommen der Zellen - beide Metalle stellen wichtige Kofaktoren antioxidativer Enzyme dar - und vermindert den NADPH-Spiegel mit derselben Folge<sup>7</sup>. Berücksichtigt man diesen Einfluss des Cisplatin auf die Zelle, liegt es nahe, den in dieser Arbeit beschriebenen oto- und neuroprotektiven Effekt des Ubichinons dadurch zu erklären, dass den Zellen ein erhöhter Anteil an Antioxidantien zur Verfügung steht, um dem Einfluss des Cisplatin entgegen zu wirken. Menke et al. konnten nachweisen, dass durch eine Präinkubation mit Ubichinon, Änderungen des mitochondrialen Potentials, die durch Rotenon, einen Inhibitor der Atmungskette, induziert wurden, signifikant vermindert werden konnten und damit die durch mitochondriale Potentialänderungen vermittelte Apoptose-Induktion verhindert werden konnte<sup>70</sup>.

Diskutiert man Auswirkungen einer Behandlung mit Ubichinon, so muss zweifelsohne auch die Rolle der Mitochondrien im Zusammenhang mit der beobachteten Otoprotektion diskutiert werden. Mitochondriale Funktionsstörungen werden schon lange mit Störungen des auditorischen Systems in Verbindung gebracht, sowohl mit erworbenen als auch mit angeborenen, und sind auch direkt als Auslöser von Haarzell-Dysfunktion beschrieben worden<sup>71, 72</sup>. Angeborene Hörstörungen gehen beispielsweise mit Mutationen der mitochondrialen DNA einher; erworbener, Lärm-induzierter, sensorineuraler Hörverlust ist mit Glutamat-vermittelter Toxizität, sinkenden Glutathion- und steigenden ROS-Spiegeln vergesellschaftet und Presbyakusis neben anderen mitochondrialen Faktoren auch mit akkumulierenden mitochondrialen DNA Mutationen<sup>71</sup>. Das OC ist aufgrund mitochondrialer Kernkompetenzen wie der Energiebereitstellung, der Regulation des intrazellulären Kalzium-Spiegels und der pro- und antiapoptotischen Signalwege auf funktionstüchtige Mitochondrien angewiesen<sup>38, 71</sup>. Funktionstüchtige Mitochondrien sind wiederum auf Ubichinon als Bestandteil der Atmungskette und damit des mitochondrialen Metabolismus angewiesen<sup>33</sup>. Ein Teil der Cisplatin-Wirkung wird auch direkter Behinderung des mitochondrialen Metabolismus zugeschrieben, so reduziere Cisplatin beispielsweise die Menge schützender Antioxidation im mitochondrialen Zwischenmembranraum und hemme die mitochondriale Respiration<sup>73</sup>. Eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte wäre demzufolge auch, dass die Mitochondrien durch die Inkubation mit Ubichinon diese antioxidative Schutzschicht anreichern können und die Atmungskette während des Zeitraums der Präinkubation mit Ubichinon in Abwesenheit des Cisplatin gegenüber seines toxischen Einflusses gewappnet wird. Rosenfeldt et al. konnten für den Herzmuskel eine durch Ubichinon induzierte Effektivierung der Atmungskette beschreiben<sup>37</sup>.

Alterungsprozesse werden in Zusammenhang mit der Akkumulation von Mutationen in der mitochondrialen DNA gebracht, parallel dazu nimmt der Ubichinon-Spiegel mit dem Alter

sukzessive ab <sup>38</sup>. Auch für aus cochleärem Gewebe von Mäusen, die altersbedingte Hörverluste aufwiesen, isolierte, mitochondriale DNA ist ein Anstieg von Mutationen beschrieben und für den Menschen ist ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Mutationen und dem Schweregrad der Presbyakusis gezeigt worden <sup>38</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass nur etwa ein Prozent des in Zellen akkumulierten Cisplatin an nukleäre DNA gebunden vorliegt, für Cisplatin ist weiterhin beschrieben worden, dass es mitochondriale DNA mit höherer Affinität bindet als nukleäre <sup>73</sup>. Darüber hinaus wurde für Zellen, in denen die mitochondriale DNA nicht vorlag, eine Resistenz gegenüber Cisplatin nachgewiesen, in enukleierten Zellen konnte durch Cisplatin hingegen Apoptose induziert werden <sup>73</sup>. Die Cisplatin-Bindung an mitochondriale DNA verursacht eine verminderte Expression antioxidativer Proteine des Mitochondriums und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit der Apoptose-Einleitung <sup>73</sup>. Die durch Cisplatin induzierte Schädigung der Haarzellen und die Abnahme der Dichte der neuronalen Fortsätze als Modell des Zustands der Spiralganglien, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, beruht möglicherweise auf den Folgen der Schädigung der mitochondrialen DNA. Die Präinkubation mit Ubichinon wappnet die Mitochondrien möglicherweise vor den in der Folge durch Cisplatin induzierten Prozessen. In *in silico* Analysen und Arbeiten in murinen Zelllinien ist zudem gezeigt worden, dass Ubichinon auch an der Transkriptionsinduktion verschiedener Gene beteiligt ist <sup>34,74</sup>. Demzufolge ist es denkbar, dass durch die Ubichinon induzierte Transkription und anschließende Translation Proteine exprimiert werden, die den durch Cisplatin induzierten Prozessen in Haarzellen und Neuronen entgegenwirken und die beobachtete Protektion vermitteln, das wiederum würde die Bedeutsamkeit der Präinkubation ohne die Anwesenheit von Cisplatin unterstreichen.

Das Zusammenspiel der möglichen durch Ubichinon vermittelten Protektionsmechanismen scheint für die Aufrechterhaltung der Dichte der neuronalen Fortsätze besonders effektiv abzulaufen: Für alle drei Abschnitte der *Cochlea* konnten in den mit Ubichinon präinkubierten und im Anschluss gegenüber Cisplatin exponierten Explantaten ähnliche Mediane der Dichte der neuronalen Fortsätze erreicht werden wie in den Explantaten der Kontrollgruppe, wobei die Differenz zur Kontrollgruppe von apikal nach basal zunahm. Dieses Phänomen ließ sich für beide Haarzelltypen hingegen nicht beschreiben. Cisplatin scheint den Metabolismus und das *signaling* in Neuronen an einem Punkt empfindlich zu schädigen, der sich durch die Präinkubation mit Ubichinon als besonders modulierbar zeigt. Denkbar ist, dass die Neuronen besonders anfällig für die auf die Mitochondrien bezogene Cisplatin-Schädigung sind, da der reibungslose Ablauf des Proteintransports entlang der Ausläufer viel Energie verbraucht und deshalb ohne einen ungestörten mitochondrialen Stoffwechsel nicht gewährleistet werden kann, was sich letztlich in den morphologischen Schäden äußert. Die Präinkubation mit Ubichinon wirkt diesen Schäden

anscheinend durch die Stabilisierung der Atmungskette und eventuell zusätzlich durch die veränderte Expression antioxidativer Enzyme sehr effektiv entgegen. Dabei ist anzumerken, dass der Verlust an Fortsätzen der Neuronen nicht immer mit dem Zellverlust gleichgesetzt werden kann, sondern auch auf Störungen zellulärer Transportmechanismen beruhen kann<sup>75</sup>. Der beobachtete Effekt wird möglicherweise noch dadurch potenziert, dass sich die Neuronen zu dem Entnahmezeitpunkt des Gewebes noch im Differenzierungsstadium befinden: Direkt postnatal findet eine Steigerung der Anzahl der afferenten Synapsen an den inneren Haarzellen statt, die Reifung der afferenten Synapsen dauert postnatal zwei bis drei Wochen, an P5 und P6 bestehen zwischen den äußeren Haarzellen und den Neuriten genauso viele synaptische Kontakte wie zwischen den Neuriten und den inneren Haarzellen, mit der weiteren Ausreifung reduzieren sich diese Kontakte, dieser Prozess geht mit Apoptose und Neuriten-Rückzug einher<sup>64</sup>. Die Inkubation des Gewebes mit Ubichinon in dieser sensiblen Entwicklungsphase scheint die Neuronen vor der Induktion apoptotischer Prozesse zu schützen. Aus dieser Schlussfolgerung ergeben sich auch außerhalb der Ototoxizitätsforschung sehr interessante weitere Fragestellungen, mit Hilfe derer die Entwicklung und Differenzierung des auditorischen Systems genauer verstanden werden könnte. Protektive Auswirkungen des Ubichinons auf das Hörvermögen wurden bereits von anderen Autoren beschrieben: So zeigten Fetoni et al., dass die systemische und durch intratympanale Injektion gewährleistete lokale Administration von „Q-ter“, einem ebenfalls wasserlöslichen Ubichinonderivat, bei Ratten, die gegenüber akustischen Traumata exponiert wurden, die Anzeichen von Haarzell-Apoptose reduzierte, das Überleben von Haarzellen erhöhte, oxidativen Stress reduzierte und die BERA-Schwelle reduzierte<sup>39</sup>. Die Autoren betonen den Vorteil der lokalen Administration im auditorischen System, einen Vorteil, der auch im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unterstrichen werden muss. Aber auch in einem dem OC ähnlichen Organ, der Niere, konnte das Ausmaß der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität durch die systemische Behandlung mit Ubichinon, beginnend einen Tag vor und endend am sechsten Tag nach der Cisplatin-Applikation, deutlich reduziert werden<sup>36</sup>, die Autoren verweisen wie in der vorliegenden Arbeit darauf, dass durch Ubichinon die Expression oxidativer Enzyme gesenkt und die antioxidativer Enzyme gesteigert wird und die ROS-Spiegel reduziert werden können<sup>36</sup>. Ob Ubichinon in Zukunft tatsächlich als Protektivum gegenüber Cisplatin eingesetzt werden kann, oder sich wie der Radikalfänger Amifostin in klinischen Studien als nicht ausreichend wirksam erweist, gilt es zunächst in *in vivo* Studien zu untersuchen<sup>7</sup>. Da Ubichinon jedoch auf variableren Ebenen als der des Radikalfängers seine Wirkung entfalten kann, ist es möglich, dass anschließende Untersuchungen erfolgreich ausfallen werden.

### 6.3.1.3 Die Rolle des STAT3 im Rahmen der beobachteten strukturellen Effekte

Um die Funktion, die STAT3 in der Vermittlung der beobachteten Effekte spielt, zu identifizieren und zu analysieren, wurden die vor der Cisplatin-Behandlung mit IL-6, OSM und Ubichinon inkubierten Gruppen mit Explantaten verglichen, die simultan mit einem STAT3-Inhibitor und den möglichen Protektiva behandelt worden waren. Es zeigte sich, dass die durch die Zytokine erreichten protektiven Effekte durch die parallele Inkubation mit dem Inhibitor aufgehoben wurden und keine statistisch signifikante Protektion gegenüber Cisplatin erreicht wurde, die ohne die Behandlung mit dem Inhibitor jedoch reproduziert werden konnte. Dieser Effekt zeigte sich bezüglich beider Haarzelltypen, lediglich für die Dichten der apikalen Neuronenfortsätze wurde gegenüber Cisplatin durch IL-6 in Anwesenheit des Inhibitors eine Protektion erreicht, jedoch eine signifikant geringere als in Abwesenheit des Inhibitors. Die durch Ubichinon erreichte Protektion gegenüber Cisplatin wurde durch die Inhibitor-Behandlung hinsichtlich beider Haarzelltypen und der Dichte der neuronalen Fortsätze nicht reduziert.

WP1066 ist ein Derivat des schon länger bekannten STAT3-Inhibitors AG490, der die Tyrosinkinase JAK-2 hemmt und ursprünglich im Rahmen der sogenannten *targeted cancer therapy*, der gezielten Krebstherapie, eingesetzt werden sollte <sup>76</sup>. *In vitro* zeigten sich für AG490 zunächst vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Hemmung des Tumorwachstums, die sich in anschließenden Studien in verschiedenen Tiermodellen nicht bestätigen ließen <sup>76</sup>. Aus diesem Grund wurde WP1066 als potenterer Vermittler desselben Wirkungsmechanismus von Iwamaru et al. synthetisiert <sup>76</sup>. WP1066 hemmt die JAK-2-Kinase, und damit folglich die Tyrosinphosphorylierung des STAT3 sowie dessen Aktivierung dadurch und die anschließende Translokation in den Nukleus, WP1066 induzierte außerdem Apoptose in malignen Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* <sup>76</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des WP1066 nicht im Rahmen maligner Zellen untersucht, sondern hinsichtlich eines nicht maligne entarteten Gewebes. Um die Auswirkungen auf das sich noch in der Differenzierung befindliche Gewebe zu untersuchen, wurden die Haarzellenmorphologie und Dichte der neuronalen Fortsätze im Anschluss an die alleinige Inkubation mit WP1066 analysiert. Es ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle erheben, sodass die in den beobachteten Gruppen beschriebenen Ergebnisse auf die Funktion des WP1066 als STAT3-Inhibitor in Wechselwirkung mit den zugebenen Mediatoren zurückzuführen sind. Mithilfe des WP1066-Inhibitors wurde beispielweise bereits die ausschlaggebende Rolle des STAT3 im Rahmen der Entstehung von proliferativen Gefäßerkrankungen gezeigt <sup>43</sup>.

Die durch die Zytokin-Behandlung induzierten Effekte können aufgrund der beobachteten Ergebnisse zu großen Anteilen auf die klassischen Folgen der STAT3-Aktivierung zurückge-

führt werden. Die Ergebnisse ermöglichen es allerdings nicht, die Verwicklung des STAT3 in die durch Ubichinon induzierte Protektion auszuschließen. Da der verwendete Inhibitor lediglich die Tyrosin-Phosphorylierung des STAT3 inhibierte und die Serin-Phosphorylierung davon nicht betroffen war. Obwohl Ubichinon seine Wirkung möglicherweise auch gänzlich unabhängig von STAT3 entfaltet, scheinen die durch die Zytokine im OC induzierten Signalwege an einem Knotenpunkt mit den durch Ubichinon vermittelten Effekten verknüpft zu sein: Die inneren Haarzellen des apikalen Fragments konnten durch die simultane Behandlung mit Ubichinon und OSM signifikant besser vor Cisplatin-induzierten Schäden geschützt werden als die allein mit Ubichinon präinkubierten. Die neuronalen Fortsätze im medialen Fragment wurden durch simultane Behandlung mit Ubichinon und OSM signifikant besser gegen Cisplatin induzierte Schäden geschützt als allein mit OSM präinkubierte, dasselbe gilt für die Neuronenfortsätze im apikalen Fragment und deren Behandlung mit IL-6 und Ubichinon gegenüber der alleinigen Behandlung mit IL-6. Einen möglichen Verknüpfungspunkt stellt das STAT3 dar. Die Aktivierung des STAT3 erfolgt, wie eingangs erwähnt, auch über die Phosphorylierung der Serin-Domäne. Das nach Serin-Phosphorylierung erhaltene Produkt übernimmt vielfältige wichtige Funktion in der Zelle, wie jüngste Untersuchungen zeigen konnten<sup>77-79</sup>. Die Wirkungen der Serin-phosphorylierten STAT3-Form werden vor allem mit dem mitochondrialen Metabolismus in Verbindung gebracht: P-S-STAT3 ist an der Stabilisierung der Atmungskette beteiligt<sup>41, 80, 81</sup>. Da eine der durch Ubichinon induzierten Auswirkungen die Stabilisierung und die Modulation des mitochondrialen Metabolismus im Allgemeinen darstellt, ist es möglich, dass Ubichinon seine Wirkung teilweise über P-S-STAT3 vermittelt oder sich die Auswirkungen der durch die Zytokine gesteigerten P-S-STAT3-Spiegel und des Ubichinons im mitochondrialen Kompartiment potenzieren. Durch die in der Folge in geringerem Ausmaß anfallenden ROS wird die Einleitung der Apoptose hinausgezögert. Die Schlussfolgerung von Wegrzyn et al. könnte sich in diesem Fall auch auf die vorliegende Arbeit übertragen lassen: Zytokine und andere extrazelluläre Mediatoren können über die Rolle des STAT3 im Mitochondrium mittels induzierter Signalkaskaden den gesamten Energiemetabolismus der Zelle modulieren – ein Phänomen, das in sich in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus als durch Ubichinon potenziierbar gezeigt hat<sup>41</sup>. Mitochondriales P-S-STAT3 spielt zusätzlich im Zusammenhang mit NGF-induziertem Neuritenwachstum von PC-12-Zellen eine bedeutende Rolle<sup>80</sup>. In Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit durch die Zytokine induzierten Effekte scheint das P-S-STAT3 im Vergleich zum P-Y-STAT3 die untergeordnete Rolle zu spielen, da WP1066 vor allem die Tyrosin-Phosphorylierung hemmt und die Protektion durch Einsatz dieses Inhibitors vermindert wurde - eine teilweise Vermittlung ist jedoch denkbar.

Direkte Interaktion zwischen Zytokinen und den durch Ubichinon induzierten Prozessen könnte auch im Zusammenhang mit der durch Ubichinon vermittelten Genexpression entstehen: In *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass Ubichinon die Expression von TNF $\alpha$  als Folge der Behandlung mit Lipopolysacchariden zum Einen durch NF $\kappa$ B-abhängige Genexpression und zum Anderen durch seine antioxidative Wirkung reduziert<sup>34, 74</sup>. Es ist denkbar, dass die bereits erläuterten komplexen, durch die Zytokine induzierten Effekte durch die Modulation inflammatorischer Signalwege in Richtung regenerativer Prozesse verstärkt werden.

STAT3 selbst ist außerdem an der Regulation der ROS-Level in der Zelle beteiligt: Jung et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von Mäusen mit IL-6 im Vorfeld transienter, fokaler, zerebraler Ischämie neuroprotektiv wirkte<sup>28</sup>. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass diese Wirkungen über STAT3-Aktivierung mediiert wird und auf erhöhter Expression des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase beruht<sup>28</sup>. Wie bereits erläutert, kann Cisplatin seine schädigende Wirkung über die Erhöhung der ROS-Spiegel vermitteln, geht man davon aus, dass aktiviertes STAT3 auch Enzyme, die antioxidativ wirksam sind, induziert, könnte die durch die Zytokine vermittelte Protektion mittels dieses Mechanismus erklärt werden. Auch die teilweise statistisch signifikanten, synergistischen Effekte mit Ubichinon erklären sich möglicherweise damit, dass Ubichinon und die Zytokine, über STAT3 vermittelt, zu einer Erhöhung des antioxidativen Potentials in der Zelle führen und durch die Präinkubation ein „Depot“ zur Verteidigung gegen den Cisplatin-induzierten ROS-Anstieg angelegt werden kann. Dass durch Zytokine induzierte und möglicherweise über STAT3 vermittelte Effekte das Redox-Gleichgewicht der Zelle beeinflussen, stellten auch Mitazaki et al. fest: In IL-6-Knock-out-Mäusen erreichte der durch Cisplatin verursachte ROS-Anstieg im Rahmen des Cisplatin-induzierten, akuten Nierenversagens weitaus höhere Werte als im Wildtyp<sup>82</sup>. Es ist außerdem bekannt, dass die STAT3-Expression und -Phosphorylierung in Ischämie-überlebenden Neuronen hochreguliert werden sowie die STAT3-Translokation in den Nukleus – protektive Effekte werden sowohl autokrin, als auch parakrin vermittelt<sup>29</sup>.

Darüber hinaus muss in Bezug auf die STAT3-vermittelte Neuroprotektion zwischen akuten und subakuten Effekten unterschieden werden<sup>29</sup>. Direkt im Anschluss an die Ischämie vermittelt STAT3 die Wirkung eines inflammatorischen Mediators, der allerdings auch zu Prozessen wie Regeneration und Heilung beiträgt, im subakuten Verlauf wirkt STAT3 neuroprotektiv und Apoptose-hemmend<sup>29</sup>. Diese Beobachtung lässt sich auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übertragen: Die durch STAT3 erreichten Effekte tragen maßgeblich zur durch die Zytokine erreichten Protektion bei, Voraussetzung für die Protektion ist wahrscheinlich die Präinkubation und die intakte interzelluläre, parakrine Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen

des OCs. Die durch Ubichinon vermittelten Effekte beruhen wahrscheinlich nur zu geringen Anteilen auf den durch STAT3 induzierten Effekten und zu größerem Anteil auf einem anderen der oben diskutierten Mechanismen.

Iwamaru et al. untersuchten darüber hinaus die Wirkung des WP1066 auf intrazelluläre Spiegel des phosphorylierten ERK 1/2: In der betrachteten Zelllinie stieg der ERK-Spiegel an, während JAK-2 auf ein nicht mehr detektierbares Level absank<sup>76</sup>. Die verstärkte Aktivierung der ERK 1/2-induzierten Signalwege ist möglicherweise ebenfalls ausschlaggebend für die aufgehobene Protektion, was wiederum darauf hinweist, dass die beobachtete Protektion das Ergebnis des ausbalancierten Ineinandergreifens der vielfältigen, durch die Zytokine induzierten Signalwege darstellt. Mittels der durch den Inhibitor künstlich erzeugten Verschiebung dieses Gleichgewichts auf einen anderen Signalweg-Arm entstand in der Summe ein gänzlich anderer Effekt. Dass die durch Ubichinon vermittelte Protektion von dieser Verschiebung unbeeinflusst blieb, ist ein Hinweis dafür, dass diese Effekte entweder gänzlich unabhängig von STAT3 oder unabhängig vom klassischen P-Y-STAT3 und viel mehr über die von der Transkription unabhängigen Effekte des STAT3 vermittelt werden, beispielsweise durch die mitochondrialen Effekte des P-S-STAT3.

#### **6.3.1.4 Die Bedeutung der Präinkubation**

Vergleichen wir das Ausmaß der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Protektion mit dem der einleitend angeführten Dissertation von Yan Yu, lässt sich feststellen, dass sich das durch IL-6 vermittelte protektive Potential gegenüber Cisplatin für die inneren Haarzellen im apikalen und medialen Fragment reproduzieren ließ, sich aber auch auf den basalen Abschnitt der *Cochlea* ausweiten ließ und für die äußeren Haarzellen entlang der gesamten *Cochlea* ebenfalls beschrieben werden konnte<sup>49</sup>. Eine wahrscheinliche Ursache für die beobachtete Diskrepanz stellt der Parameter der Inkubationsdauer mit IL-6 dar. In der erwähnten Arbeit sind die Explantate für eine Stunde mit IL-6 präinkubiert worden, die simultane Inkubation mit Cisplatin schloss sich an<sup>49</sup>. In der aktuellen Studie wurden die Fragmente vor dem Cisplatin-Zusatz für 24 Stunden mit IL-6 präinkubiert. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Ausweitung der Protektion durch die vorbereitende Inkubation mit dem protektiven Agens vor der Behandlung mit der Noxe bedingt ist. Diese Beobachtung legt wiederum nahe, dass langfristig erreichte Ergebnisse der Zytokin-induzierten Signalwege den protektiven Effekt eher ermöglichen als unmittelbare Effekte. Das könnte dafür sprechen, dass sich langfristig eingestellte Gleichgewichte zwischen STAT3-induzierten Effekten und den im Sinne einer negativen Rückkopplung induzierten Prozessen steigend auf die beobachtete Protektion auswirken.

Zu den durch STAT3-Induktion langfristig induzierten Prozessen gehören die durch SOCS3 induzierten Signalwege. Signalwege, die durch Zytokine induziert werden, müssen in ihrer Wirkung auch wieder beendet werden, um ihren Signalcharakter zu wahren<sup>42</sup>. Vermittelt wird diese Gegenregulation einerseits durch extrazelluläre Faktoren, wie TGF- $\beta$ , IL-10, lösliche Rezeptoren und Zytokin-Antagonisten und andererseits durch intrazelluläre Mechanismen, wie spezielle Phosphatasen (SHP1, SHP2), die die aktivierenden Phosphatgruppen der am Signalweg beteiligten Mediatoren abspalten sowie durch die Mitglieder der SOCS-Familie<sup>42</sup>. SOCS-Proteine verändern die Kinetik der Zytokin-induzierten Effekte, so kann ihre Ausschaltung zu einer verzögerten Termination der JAK/STAT-Signalwege führen und in der Folge den vermittelten Effekt modulieren<sup>83</sup>. Beobachtete Zytokin-Effekte erklären sich durch das Wechselspiel der durch das Zytokin direkt und indirekt aktivierten Signalwege<sup>42</sup>. Die Folgen hängen wiederum von Gewebe- und Zelltyp, dem Differenzierungsgrad der Zelle, der Rezeptor- und Signalmolekülausstattung der Zelle und der interzellulären Kommunikation des Zellverbandes ab. Es besteht die Möglichkeit, dass im Rahmen der längeren Präinkubationszeit ein anderes Equilibrium der verschiedenen Signalwege erreicht wurde als im Rahmen der kürzeren, alleinigen Inkubation mit IL-6 und sich die ausgeweitete Protektion mit Hilfe dieses Unterschiedes erklären lässt. Liang et al. zogen in ihrer Arbeit zum Thema Haarzellregeneration im Modell des Zebrafischs ebenfalls die Schlussfolgerung, dass SOCS3 und STAT3 gleichermaßen bedeutsam für die Regeneration der Haarzellen im Anschluss an Kupfersulfat-induzierte Schäden sind, nachdem sie im Vorfeld unter Ausschaltung beider Mediatoren einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion neuer Haarzellen beschreiben konnten<sup>44</sup>. Diese Ergebnisse sind allerdings unter der Prämisse zu interpretieren, dass in dem in der vorliegenden Arbeit betrachteten Modell der Ratte keine Haarzellentstehung aus Stammzellen, wie beispielsweise im Zebrafisch, möglich ist.

Darüber hinaus ist es durchaus möglich, dass STAT3 eine längere Zeitspanne benötigt, um seine Funktion als Transkriptionsfaktor vollständig umzusetzen und die abweichenden Beobachtungen sich dadurch erklären, dass ein größerer Anteil an Genen induziert wurde sowie ein höherer Prozentsatz der mRNA bereits translatiert werden konnte. Szczepanek et al. unterscheiden in ihrem Review zur Rolle der STAT-Proteine im Mitochondrium ebenfalls zwischen kurzfristig induzierten Effekten, die möglicherweise vor allem durch die Wirkung auf die Mitochondrien erzielt werden, und zwischen langfristig erreichten Effekten, die über die klassische Wirkung als Transkriptionsfaktor im Rahmen von Stunden bis Tagen erreicht werden können<sup>81</sup>.

Betrachten wir die These, dass die IL-6-Spiegel in der Folge der Cisplatin-Behandlung ansteigen und dass ein solcher Anstieg auch einen Verteidigungsmechanismus der Zelle darstellen könnte, ergibt sich ein weiterer Erklärungsansatz für die Ausweitung des protektiven Potenti-

als durch die Präinkubation. Die Präinkubation mit IL-6 könnte den durch die systemische Zirkulation von Cisplatin induzierten, IL-6-vermittelten Effekten vorweggreifen, ihnen den Weg bahnen und die Effektivität dieses möglichen Verteidigungsmechanismus steigern. Shuai und Lin beschreiben das Phänomen, dass die Inkubation eines Gewebes mit einem Zytokin im Vorfeld einer wiederholten Behandlung mit diesem oder einem anderen Zytokin, abhängig vom Setting, den Effekt des Zytokins entweder steigern oder hemmen kann<sup>83</sup>. So konnten durch Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) vermittelte Effekte beispielweise durch eine vorher gehende Inkubation mit IFN $\gamma$  in niedrigen Konzentrationen gesteigert werden<sup>83</sup>. Greifen wir nun auf die bereits diskutierten Schlussfolgerungen von So et al. zurück, dass Cisplatin seine toxische Wirkung über IL-6 vermittele, so ist es durchaus möglich, dass die durch Cisplatin induzierten und möglicherweise über IL-6 vermittelten Effekte durch eine Präinkubation mit Zytokinen der IL-6-Familie und auch durch Ubichinon moduliert worden sind. Auf der Basis der erläuterten möglichen Gründe für die beschriebenen Beobachtungen ist eine mögliche Schlussfolgerung, dass sich das Gewebe durch die längere Präinkubation ohne das toxische Cisplatin mit Hilfe STAT3-induzierter Effekte in verschiedenen Kompartimenten gegen den Einfluss von Stressoren wappnen kann. Eine Fragestellung zukünftiger Arbeiten könnte sein, welchen Zeitraum die minimale protektive Präinkubationsdauer umfassen sollte und mit welcher Zeitspanne man optimale Protektionsergebnisse erhält.

#### **6.3.1.5 Vergleich der Auswirkungen auf die verschiedenen Haarzelltypen und entlang der verschiedenen Abschnitte der Cochlea**

Die äußeren Haarzellen nehmen Cisplatin im Vergleich zu den inneren verstärkt auf und sind auch sensibler gegenüber der Cisplatin-induzierten Ototoxizität<sup>84</sup>. Vorherige Arbeiten anderer Autoren, die die verschiedenen Abschnitte der *Cochlea* bezüglich des Schweregrads der durch Cisplatin-induzierten Ototoxizität verglichen, stellten eine besonders starke Schädigung des basalen Fragments fest<sup>16</sup>. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Haarzellen im basalen Fragment am stärksten durch die durch Cisplatin vermittelten Effekte geschädigt. *In vivo* beruht der bekannte Effekt teilweise darauf, dass im basalen Abschnitt früher höhere Spiegel des ototoxischen Agens erreicht werden<sup>85</sup>. In *in vitro* Arbeiten, wie der vorliegenden, wurden die erhöhte Empfindlichkeit des basalen Fragments gegenüber Cisplatin vor allem mit geringeren Spiegeln antioxidativer Metabolite in basalen Haarzellen begründet: Sha et al. beschrieben niedrigere Glutathion-Spiegel in basalen äußeren Haarzellen als in apikalen äußeren Haarzellen und eine signifikant geringere Schädigung der basalen äußeren Haarzellen durch Cisplatin als Folge der Behandlung mit verschiedenen antioxidativen Substanzen<sup>86</sup>. Die Ergebnisse dieser und der zitierten Arbeit lassen sich demzufolge möglicherweise mit einer von apikal nach basal zuneh-

menden Empfindlichkeit gegenüber ROS erklären. Für die durch Zytokine und Ubichinon vermittelte Protektion ließ sich hingegen kein einheitliches Muster entlang der tonotopischen Gliederung des OCs beobachten. Das ist beispielsweise damit erklärbar, dass die oben diskutierten Mechanismen, auf denen die drei Agentien ihren Effekt vermitteln, als Ergebnis aus interzellulärer Kommunikation, dem Zusammenspiel verschiedener Signalwege und in Zusammenschau mit den durch Cisplatin-induzierten Effekten entstehen. Aufgrund dieses sehr komplexen Wechselspiels lässt sich möglicherweise kein einheitliches Muster wie bei den durch den Zusatz einer einzelnen Substanz beobachteten Effekten erkennen. Das basale Fragment war allerdings deutlich schwerer von den Folgen der STAT3-Inhibition betroffen: Hier wurde die Zytokin-induzierte Protektion gegenüber Cisplatin am deutlichsten inhibiert. Da das basale Fragment auch am stärksten durch Cisplatin geschädigt wurde, liegt es nahe, dass die Inhibition der protektiven Mechanismen sich in diesem Fragment am stärksten auswirkt. Hinsichtlich des Verhaltens der beiden verschiedenen Haarzelltypen ließ sich bezüglich der Cisplatin-vermittelten Schädigung als auch bezüglich der Protektion und der STAT3-Inhibition ebenfalls kein eindeutiges Muster erkennen. Diese Beobachtungen widersprechen zunächst denen von Ding et al.: Die Autoren untersuchten die Cisplatin-Anreicherungen in und die Auswirkungen von Cisplatin auf die Haarzelltypen in demselben wie in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell und stellten fest, dass die Aufnahme des Cisplatins über Kupfer-Transporter erfolgt<sup>84</sup>. Es ist möglich, dass die Zytokin- oder Ubichinon-Behandlung die Expression oder Regulation dieser Transporter moduliert und die Beobachtungen aus diesem Grund voneinander abweichen.

Die Dichte der neuronalen Fortsätze wurde durch alle drei Protektiva im apikalen Abschnitt der *Cochlea* am stärksten geschützt, für die Schädigung und den Effekt der STAT3-Inhibition ließ sich hingegen kein einheitliches Muster ableiten. Unterschiede entlang der *Cochlea* lassen sich wie bereits erläutert möglicherweise auf die verschiedenen Gradienten der Neurotrophine zurückführen<sup>3</sup>.

### ***6.3.2 STAT3: Änderung der subzellulären Lokalisation und der Phosphorylierung als Antwort auf extrazelluläre Stimuli***

Um die Bedeutung des STAT3 als Vermittler der durch die Zytokine induzierten Effekte genauer zu identifizieren, wurden die Spiegel der Proteinexpression des STAT3 und seiner beiden Phosphorylierungsprodukte im zytoplasmatischen und nukleären Kompartiment nach 15- oder 30-minütiger Inkubation mit IL-6 oder OSM bestimmt. Im Anschluss an die IL-6-Behandlung zeigte sich im Zytoplasma keine statistisch signifikante Veränderung des STAT3-Spiegels, lediglich ein Abwärts-Trend mit zunehmender Inkubationsdauer, P-Y-STAT3 stieg

jedoch statistisch signifikant an und erreichte nach 15 Minuten den maximalen Wert, P-S-STAT3 veränderte sich nicht statistisch signifikant, zeigte mit zunehmender Dauer allerdings einen Aufwärtstrend. Im Nukleus ließen sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse beschreiben, lediglich ein Zunahme-Trend für STAT3 und P-Y-STAT3 mit steigender Inkubationsdauer. Im Anschluss an die OSM-Behandlung zeigte sich im Zytoplasma keine statistisch signifikante Veränderung bezüglich des STAT3, lediglich ein Aufwärtstrend mit einem Maximum bei 15 Minuten ließ sich beschreiben, für P-Y-STAT3 lag im Zytoplasma ein signifikanter Anstieg vor, der seinen Höhepunkt nach 15 Minuten erreichte, P-S-STAT3 zeigte nach 15 Minuten einen statistisch signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle, nicht jedoch nach 30 Minuten. Im Kern ließ sich für STAT3 im Anschluss an die OSM-Behandlung lediglich ein Aufwärts-Trend beschreiben, die P-Y-STAT3-Spiegel stiegen nach 15 und 30 Minuten hingegen statistisch signifikant an, mit einem Maximum nach 15 Minuten.

Die durch IL-6 vermittelten Effekte scheinen vor allem auf der Tyrosin-phosphorylierten Form des STAT3 zu beruhen, da sich hier statistisch signifikante Veränderungen zeigten. Es ist allerdings auch möglich, dass die möglicherweise durch P-S-STAT3 induzierten Effekte erst zu späterer Zeit eintreten und die Spiegeländerungen erst im Verlauf statistisch signifikante Veränderungen erreichen. Dieses Ergebnis regt demzufolge zu ausgedehnteren Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Proteinexpressionsänderungen an. P-Y-STAT3 stieg im Zytoplasma statistisch signifikant an, STAT3 hingegen nicht, sondern nahm als Trend eher ab. Daraus kann geschlossen werden, dass bereits im Zytoplasma vorhandenes STAT3 an der Tyrosindomäne phosphoryliert wurde und es sich dabei um einen sehr schnell eingeleiteten Prozess handelt, da der maximale Wert nach 15 Minuten beobachtet wurde. Ein etwaiger Anstieg des STAT3-Spiegels würde sich möglicherweise erst im weiteren Verlauf zeigen, da aktiviertes STAT3 auch die eigene Transkription aktiviert, dieser Prozess aber mehr Zeit benötigen würde. Die beschriebenen Ergebnisse gehen mit denen der Arbeiten einher, die den klassischen durch IL-6 induzierten und STAT3-vermittelten Signalweg beschreiben<sup>27, 29</sup>. Die Translokation des STAT3 scheint einen längeren Zeitraum als 30 Minuten zu benötigen: Im Nukleus konnten für STAT3 und P-Y-STAT3 ein Trend steigender Spiegel beobachtet werden, jedoch kein statistisch signifikanter Anstieg. Setzt man die Ergebnisse mit denen der morphologischen Untersuchungen in Relation, so kann davon ausgegangen werden, dass IL-6 zum einen unmittelbare Effekte induziert, die wiederum an der Einleitung langfristiger Prozesse beteiligt sind. Im Rahmen der 24-stündigen Präinkubation in Abwesenheit des Cisplatin führten diese langfristig eingeleiteten Prozesse anscheinend zu den morphologisch beobachtbaren Ergebnissen.

Im Vergleich zu IL-6 zeigen die durch OSM induzierten Effekte ein abweichendes zeitli-

ches Verlaufsmuster. Wie bei IL-6 zeigten sich für OSM bezüglich des zytoplasmatischen STAT3 keine statistisch signifikanten Änderungen, jedoch anders als bei IL-6 kein abnehmender, sondern ein zunehmender Trend mit einem Maximum nach 15 Minuten. Auch P-Y-STAT3 zeigte nach 15 Minuten den Scheitelpunkt des statistisch signifikanten Anstiegs. Die Tyrosin-Phosphorylierung wird demzufolge auch hier unmittelbar eingeleitet, jedoch mit einem geringeren damit einhergehenden STAT3-Verbrauch. Das lässt darauf schließen, dass aus anderen Kompartimenten STAT3 zur Verfügung gestellt wird oder die STAT3-Expression sehr kurzfristig induziert werden konnte. Diese Schlussfolgerung wird dadurch noch wahrscheinlicher, dass auch P-S-STAT3 nach 15 Minuten einen statistisch signifikanten Anstieg zeigte und auch hier möglicherweise vorliegendes zytoplasmatisches STAT3 verbraucht wurde und sich dennoch kein STAT3-Abfall zeigte. Allerdings ist es auch hier möglich, dass bereits vorliegendes beispielsweise mitochondriales P-S-STAT3 in das Zytoplasma transloziert wurde. Ein weiterer Unterschied im Vergleich zu den durch IL-6 induzierten Effekten zeigt sich darin, dass sich nach der OSM-Inkubation bereits nach diesen kurzen Zeiträumen statistisch signifikante Änderungen des P-Y-STAT3 im Nukleus beschreiben ließen, mit einem Maximum nach 15 Minuten. Beide Zytokine vermitteln ihre Wirkung wie bereits erläutert über die Rezeptoruntereinheit gp130, sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des ergänzenden Rezeptorbausteins<sup>27, 30</sup>. Die abweichenden Effekte des OSM sind demzufolge möglicherweise auf den OSM-R $\beta$  zurückzuführen, dieser scheint die Phosphorylierung des STAT3 schneller zu induzieren sowie auch seine Translokation in den Nukleus. Darüber hinaus scheinen die durch OSM induzierten Effekte auch durch P-S-STAT3 vermittelt zu werden, weil ein statistisch signifikanter Anstieg beschrieben werden konnte. Auch die laut des „National Center of Biotechnology Information“ bereits beschriebene, auffällig hohe mRNA-Expression des OSM-R $\beta$  unterstreicht zusätzlich die Bedeutsamkeit dieser Rezeptor-Untereinheit im Rahmen der beobachteten Effekte. Die graduellen Abweichungen der durch die beiden Zytokine induzierten morphologischen Effekte lassen sich möglicherweise ebenfalls auf den abweichenden Aufbau der Rezeptoren zurückführen.

### **6.3.3 *Beziehung zu Spiegeländerungen Apoptose-regulierender Proteine***

An der Vermittlung der durch Cisplatin induzierten Effekte sind apoptotische Prozesse beteiligt: Cisplatin erhöht, wie bereits erläutert, das ROS-Level und induziert die Aktivierung des mitochondrialen Bax, was, wie einleitend beschrieben, zu einer Cytochrom C-Freisetzung und konsekutiver Apoptose führt<sup>7, 12, 73</sup>. In Studien am Gerbil konnten im Anschluss an die Cisplatin-Behandlung ein erhöhtes Bax- und ein reduziertes BCL-2-Level detektiert werden<sup>12</sup>. BCL-2 bewahrt wie BCL-XL als Gegenspieler des Bax das Mitochondrium vor erhöhter Perme-

abilität<sup>33,73</sup>. Ob eine Zelle den Weg der Apoptose einschlägt, hängt vom Verhältnis der anti- und proapoptotischen Mediatoren zueinander ab<sup>73, 87</sup>. Die durch diese Mechanismen induzierte Apoptose der Haarzellen wird letztlich durch die Aktivierung von Caspasen vermittelt, für den Cisplatin-induzierten Hörverlust ist allerdings ebenfalls die Beteiligung Caspase-unabhängiger apoptotischer Mechanismen beschrieben worden: Mitochondriale Dysfunktion führt zur Aktivierung des AIF, der in den Zellkern transloziert wird und dort DNA-Fragmentierung und konsekutiven Zelltod vermittelt<sup>13, 73</sup>. Auch die durch das Mitochondrium und das endoplasmatische Retikulum regulierte Kalzium-Homöostase der Zelle wird durch die Cisplatin-Behandlung beeinflusst: Ein intrazellulärer Anstieg des freien Kalziums führt vermittelt über Calpaine, Calcineurin und Caspasen zu einer Aktivierung des Bid, Bad und Bax sowie zu einem Abbau des BCL-XL<sup>73</sup>. Das Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Vertreter der BCL-2-Familie verschiebt sich in der Folge in Richtung Apoptose<sup>73</sup>. Werden die Cisplatin-induzierten DNA-Addukte im Nukleus nicht repariert, kommt es zu einer Aktivierung des p53, das eine erhöhte Transkription des Bak und Bax, eine reduzierte Expression des Survivin und BCL-2 und durch die direkte Interaktion eine Inhibition des BCL-2 und BCL-XL vermittelt<sup>73</sup>.

Da BCL-2, BCL-XL und Survivin bekanntermaßen Zielstrukturen der STAT3-induzierten Transkription darstellen, bietet es sich an, den Zusammenhang zwischen Signalmolekülen wie IL-6 und OSM, die STAT3 induzieren, sowie zwischen Ubichinon, das STAT3 abseits seiner klassischen Rolle als Transkriptionsfaktor aktiviert, und den Regulatoren apoptotischer Prozesse zu analysieren<sup>88</sup>. Um zu untersuchen, ob die Zytokine und Ubichinon die beobachteten Effekte, STAT3-abhängig oder -unabhängig, mittels Modulation des Gleichgewichts pro- und antiapoptotischer Mediatoren induzierten, wurden die Spiegeländerungen einiger Vertreter in Folge sechs- oder 14-stündiger Inkubation mit IL-6, OSM und Ubichinon untersucht. Obwohl für STAT3 bereits eine Induktion des BCL-2 und eine Hemmung des p53 und für IL-6 im Rahmen NMDA-induzierter Neurotoxizität ein Bax-Anstieg sowie eine BCL-2-Reduktion beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit keine statistisch signifikante Modulation der untersuchten Apoptose-Regulatoren nachgewiesen werden<sup>89, 90</sup>. Es ließen sich lediglich Trends beobachten: Im Verlauf der IL-6-Behandlung nahm AIF stetig ab; Bax nahm zuerst zu, dann ab; Survivin stieg stetig an; BCL-2 blieb unverändert, wie BCL-XL zunächst auch, das nach vierzehn Stunden einen Zunahme-Trend zeigte. AIF zeigte nach der OSM-Behandlung gegenüber der Kontrolle reduzierte Werte, nahm im Verlauf allerdings wieder Trend-mäßig zu; Bax blieb unbeeinflusst; Survivin nahm gegenüber der Kontrolle als Trend zu, erreichte den Höchstwert allerdings bereits nach sechs Stunden; BCL-2 blieb unverändert und BCL-XL zeigte zunächst einen Abnahme-Trend und blieb im Verlauf ebenfalls unverändert.

Auch für Ubichinon ist bereits eine Hemmung der Cytochrom-C-Freisetzung, eine Reduktion der Cisplatin-induzierten p53-Aktiveringung und eine Inhibition der konsekutiven Caspase-Induktion beschrieben worden<sup>36, 38, 39</sup>. Die Behandlung mit Ubichinon ließ lediglich Trends von Spiegeländerungen der pro- und antiapoptotischen Mediatoren erkennen und keine statistisch signifikanten Veränderungen: AIF zeigte im gesamten Verlauf einen Abnahme-Trend; Bax nahm zunächst ab und blieb im Verlauf unverändert; Survivin zeigte zunächst einen Zunahme- und im Anschluss einen Abnahme-Trend; BCL-2 nahm zunächst zu und zeigte dann einen Abnahme-Trend; BCL-XL nahm im Verlauf Trend-mäßig stetig ab. Aus den für die Zytokine und Ubichinon beschriebenen Trends lassen sich keine eindeutigen Aussagen über ein Verlagerung des Gleichgewichts in die pro- oder antiapoptotische Richtung ableiten

Die Aktivierung oder Inhibition der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie kann sowohl auf der transkriptionalen als auch auf der post-transkriptionalen Ebene erfolgen, so können apoptotische Effekte beispielweise durch erhöhte Phosphorylierung, reduzierten Abbau und erhöhte Expression des Bax vermittelt werden<sup>73</sup>. Durch die in dieser Arbeit untersuchten Spiegel der Apoptose-Mediatoren wurde möglicherweise nur ein Ausschnitt dieser möglichen Wege beschrieben, eine Beteiligung dieser Mediatoren an der Vermittlung der beobachteten Effekte ist demzufolge nicht sicher auszuschließen.

Aus den beschriebenen Ergebnissen kann darüber hinaus geschlussfolgert werden, dass die über STAT3-vermittelte, Zytokin-induzierte Protektion, die anhand morphologischer Analysen festgestellt werden konnte, zumindest teilweise auf anderen durch STAT3 hervorgerufenen Effekten beruht als der direkten Modulation der ausgewählten Apoptose-Regulatoren. Aus dieser Schlussfolgerung können weitere Fragestellungen für sich anschließende Arbeiten abgeleitet werden, die mit der Motivation bearbeitet werden sollten, die Zielstrukturen des STAT3 in diesem Zusammenhang genauer zu identifizieren.

#### **6.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl zwei Vertreter der IL-6-Zytokin-Familie als auch Ubichinon die durch Cisplatin induzierte Schädigung der inneren und äußeren Haarzellen sowie die Reduktion der Neuronenfortsatz-Dichte mildern konnten. Die bereits in vorherigen Arbeiten gezeigte, durch IL-6 vermittelte Protektion der Haarzellen konnte reproduziert, auf beide Haarzelltypen und alle Abschnitte der *Cochlea* ausgeweitet, auf die Dichte der neuronalen Fortsätze übertragen und für einen weiteren Vertreter dieser Zytokin-Familie, OSM, ebenfalls beschrieben werden.

Im Rahmen der Zytokin-vermittelten Protektion konnte für die Tyrosin-phosphorylierte

Form des Transkriptionsfaktors STAT3 eine ausschlaggebende vermittelnde Wirkung hinsichtlich beider betrachteten Strukturen beschrieben werden. Neben der Tyrosin-phosphorylierten Form konnten auch Spiegeländerungen der Serin-phosphorylierten Form im Anschluss an die Inkubation mit OSM festgestellt werden, die die beobachtete Protektion möglicherweise teilweise vermitteln. Im Rahmen der durch Ubichinon induzierten Protektion muss ein von P-Y-STAT3 weitestgehend unabhängiger Vermittlungsmechanismus angenommen werden, eine Beteiligung der Serin-phosphorylierten Form des STAT3 kann hingegen nicht ausgeschlossen werden, da der verwendete Inhibitor nur die Tyrosin-Phosphorylierung hemmte und sich die Wirkungen der Zytokine und des Ubichinons potenzierten. Diese Beobachtung lässt sich durch die Hypothese erklären, dass STAT3 und seine beiden Phosphorylierungsprodukte als Knotenpunkte der protektiven Signalwege fungieren. Abbildung 31 zeigt die intrazellulären Signalwege, die dieser Hypothese entsprechen. In zukünftigen, sich anschließenden Arbeiten gilt es, diese aus der vorliegenden Arbeit abgeleitete Hypothese zu überprüfen.

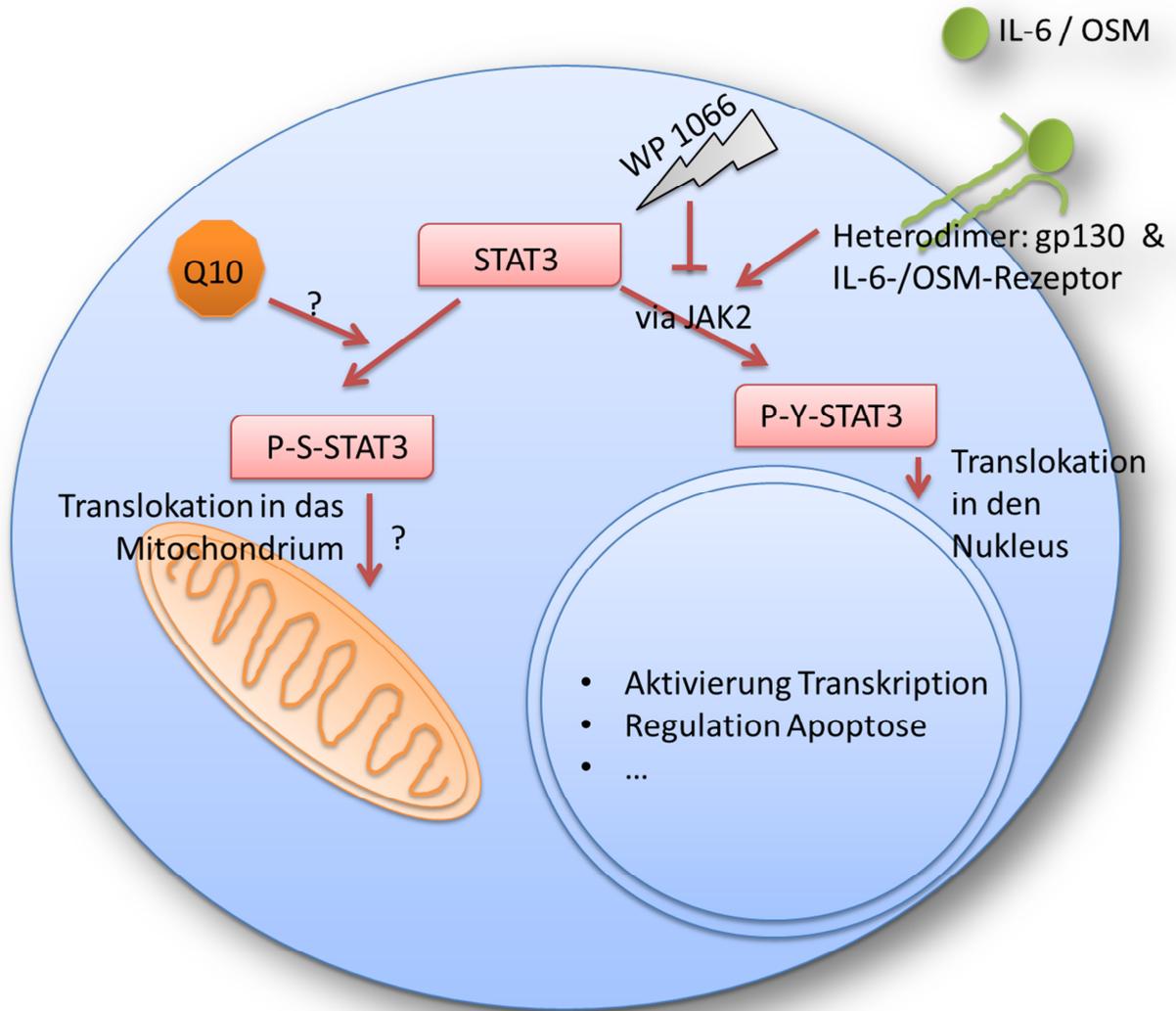


Abb. 31 Darstellung der teilweise hypothetischen intrazellulären Signalwege. Experimentell bestätigt werden konnte in dieser Arbeit, dass die Zytokin-induzierte Otoprotektion mittels Tyrosin-phosphoryliertem STAT3 vermittelt wird, das nach seiner Phosphorylierung in den Nucleus transloziert wurde. Diese Vorgänge konnten durch den Inhibitor der JAK-2-Kinase und der damit verbundenen Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung aufgehoben werden. Die durch Ubichinon vermittelte Protektion konnte durch die Hemmung der STAT3-Tyrosin-Phosphorylierung nicht aufgehoben werden. Das schließt eine Beteiligung der Serin-phosphorylierten STAT3-Form an den beobachteten Protektionseffekten nicht aus. Inwiefern die Ubichinon-induzierte Protektion über diesen Signalweg vermittelt wird, gilt es in sich anschließenden Arbeiten zu überprüfen. Lediglich hypothetisch angenommene Signalwege sind mit einem Fragezeichen markiert worden. IL-6 = Interleukin-6, OSM = Oncostatin M, Q10 = Ubichinon, gp130 = Glykoprotein 130, JAK2 = Janus-Kinase-2, WP 1066 = STAT3-Inhibitor III WP 1066, STAT3 = Signal Transducer and Activator of Transcription 3, P-S-STAT3 = Serin-phosphorylierte Form des STAT3, P-Y-STAT3 = Tyrosin-phosphorylierte Form des STAT3, → = Induktion, —| Inhibition. Es handelt sich um eine vereinfachte, schematische Darstellung. Sowohl die JAK-2-Kinase als auch das STAT3 befinden sich in unmittelbarer Rezeptornähe.

Durch die mit Hilfe von Ubichinon erreichten Protektionsergebnisse lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies maßgeblich an der durch Cisplatin induzierten Oto- und Neurotoxizität beteiligt sein muss.

Aus den Untersuchungen der Spiegeländerungen verschiedener pro- und antiapoptotischer Mediatoren konnten keine maßgeblichen Aussagen abgeleitet werden, möglicherweise gewinnen die beschriebenen Trends im Wechselspiel mit Cisplatin im Verlauf größere Bedeutung, auch hieraus lassen sich Fragestellungen für anschließende Arbeiten ableiten.

Besondere Bedeutung im Rahmen der Protektion konnte der Präinkubation der Explantate mit den Mediatoren im Vorfeld der Cisplatin-Exposition zugewiesen werden. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen lassen sich wichtige Charakteristika eines eventuell ableitbaren, klinischen Protektionsprotokolls definieren. Indem die Folgen der systemischen Applikation der verwendeten Protektiva mit denen der lokalen Administration verglichen wurden, konnte das Potential des eleganten Weges der transtympanalen Medikamenteninjektion im Zusammenhang eines solchen Protektionsprotokolls herausgestellt werden und seine Bedeutung unterstrichen werden. Bevor über das Design eines solchen Protokolls diskutiert werden kann, müssen die Ergebnisse dieser zur Grundlagenforschung zählenden Arbeit zunächst *in vivo* und im adulten Tiermodell re-evaluiert werden. Dennoch leistet diese Arbeit aufgrund der abgeleiteten weiteren Fragestellungen einen Beitrag auf dem Weg zum Design eines klinischen Protokolls, mit dessen Hilfe Patienten in Zukunft vor den Dosis-limitierenden Nebenwirkungen verschiedener Zytostatika geschützt werden können. In diesem Fall käme das einer Milderung der den Patienten von der Kommunikation mit dessen Umfeld ausschließenden, durch Cisplatin-induzierten Ototoxizität gleich.

## 7 Schriftenverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 2 ed. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2006.
2. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Slapnick SM. Physiologie. 6 ed. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2010.
3. Nayagam BA, Muniak MA, Ryugo DK. The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems. *Hear Res* 2011;278(1-2):2-20.
4. Boenningshaus H-G, Lenarz T. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 13 ed. Berlin; Heidelberg: Springer; 2007.
5. Mathers C, Smith A, Concha M. Global burden of hearing loss in the year 2000. 2000. Geneva, World Health Organization. Ref Type: Pamphlet
6. Koegel L, Jr. Ototoxicity: a contemporary review of aminoglycosides, loop diuretics, acetylsalicylic acid, quinine, erythromycin, and cisplatinum. *Am J Otol* 1985;6(2):190-199.
7. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2007;226(1-2):157-167.
8. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Pharmakologie und Toxikologie. 17 ed. Stuttgart: Thieme; 2010.
9. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med* 2009;219(3):177-186.
10. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(8-9):1229-1235.
11. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(4):307-320.
12. Devarajan P, Savoca M, Castaneda MP et al. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 2002;174(1-2):45-54.
13. Casares C, Ramirez-Camacho R, Trinidad A, Roldan A, Jorge E, Garcia-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(12):2455-2459.
14. Brock PR, Knight KR, Freyer DR et al. Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new International Society of Pediatric Oncology Boston ototoxicity scale. *J Clin Oncol* 2012;30(19):2408-2417.

15. Travis LB, Fossa SD, Sesso HD et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity and ototoxicity: new paradigms for translational genomics. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(5).
16. Yorgason JG, Luxford W, Kalinec F. In vitro and in vivo models of drug ototoxicity: studying the mechanisms of a clinical problem. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7(12):1521-1534.
17. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5 ed. New York: Garland Science; 2001.
18. Kaufmann SHE. *Basiswissen Immunologie*. 1 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
19. Kunioku H, Inoue K, Tomida M. Interleukin-6 protects rat PC12 cells from serum deprivation or chemotherapeutic agents through the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT3 pathways. *Neurosci Lett* 2001;309(1):13-16.
20. Weiss TW, Samson AL, Niego B, Daniel PB, Medcalf RL. Oncostatin M is a neuroprotective cytokine that inhibits excitotoxic injury in vitro and in vivo. *FASEB J* 2006;20(13):2369-2371.
21. Jazayeri JA, Upadhyay A, Vernallis AB, Carroll GJ. Targeting the glycoprotein 130 receptor subunit to control pain and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30(12):865-873.
22. Tiberio L, Tiberio GA, Bardella L et al. Mechanisms of interleukin-6 protection against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Cytokine* 2006;34(3-4):131-142.
23. Mitazaki S, Honma S, Suto M et al. Interleukin-6 plays a protective role in development of cisplatin-induced acute renal failure through upregulation of anti-oxidative stress factors. *Life Sci* 2011;88(25-26):1142-1148.
24. Wang XQ, Peng YP, Lu JH, Cao BB, Qiu YH. Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA attack and its signal transduction by JAK and MAPK. *Neurosci Lett* 2009;450(2):122-126.
25. Kim HJ, So HS, Lee JH et al. Role of proinflammatory cytokines in cisplatin-induced vestibular hair cell damage. *Head Neck* 2008;30(11):1445-1456.
26. So H, Kim H, Lee JH et al. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8(3):338-355.
27. Silver JS, Hunter CA. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2010;88(6):1145-1156.
28. Jung JE, Kim GS, Chan PH. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke. *Stroke* 2011;42(12):3574-3579.

29. Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(3):464-479.
30. Baker BJ, Qin H, Benveniste EN. Molecular basis of oncostatin M-induced SOCS-3 expression in astrocytes. *Glia* 2008;56(11):1250-1262.
31. Xia X, Li Y, Huang D et al. Oncostatin M protects rod and cone photoreceptors and promotes regeneration of cone outer segment in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One* 2011;6(3):e18282.
32. Moidunny S, Dias RB, Wesseling E et al. Interleukin-6-type cytokines in neuroprotection and neuromodulation: oncostatin M, but not leukemia inhibitory factor, requires neuronal adenosine A1 receptor function. *J Neurochem* 2010;114(6):1667-1677.
33. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
34. Schmelzer C, Lindner I, Vock C, Fujii K, Doring F. Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study. *IUBMB Life* 2007;59(10):628-633.
35. Markley HG. CoEnzyme Q10 and riboflavin: the mitochondrial connection. *Headache* 2012;52 Suppl 2:81-87.
36. Fouad AA, Al-Sultan AI, Refaie SM, Yacoubi MT. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology* 2010;274(1-3):49-56.
37. Rosenfeldt F, Marasco S, Lyon W et al. Coenzyme Q10 therapy before cardiac surgery improves mitochondrial function and in vitro contractility of myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129(1):25-32.
38. Guastini L, Mora R, Dellepiane M, Santomauro V, Giorgio M, Salami A. Water-soluble coenzyme Q10 formulation in presbycusis: long-term effects. *Acta Otolaryngol* 2011;131(5):512-517.
39. Fetoni AR, De BP, Eramo SL et al. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *J Neurosci* 2013;33(9):4011-4023.
40. Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia* 2005;19(4):513-523.
41. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 2009;323(5915):793-797.
42. Wang J, Campbell IL. Cytokine signaling in the brain: putting a SOCS in it? *J Neurosci Res* 2002;67(4):423-427.

43. Daniel JM, Dutzmann J, Bielenberg W et al. Inhibition of STAT3 signaling prevents vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Basic Res Cardiol* 2012;107(3):261.
44. Liang J, Wang D, Renaud G, Wolfsberg TG, Wilson AF, Burgess SM. The stat3/socs3a pathway is a key regulator of hair cell regeneration in zebrafish. [corrected]. *J Neurosci* 2012;32(31):10662-10673.
45. Zhang X, Xiao W, Wang L, Tian Z, Zhang J. Deactivation of signal transducer and activator of transcription 3 reverses chemotherapeutics resistance of leukemia cells via down-regulating P-gp. *PLoS One* 2011;6(6):e20965.
46. Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(12):2545-2579.
47. Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol* 2014;545:35-65.
48. Cheung CH, Huang CC, Tsai FY et al. Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Onco Targets Ther* 2013;6:1453-1462.
49. Yu Y. Gene and Protein Expression Patterns in the Rat Inner Ear during Ototoxicity and Otoprotection. Berlin: Charité Universitätsmedizin; 2009.
50. Sobkowicz HM, Loftus JM, Slapnick SM. Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993;502:3-36.
51. Uziel A, Romand R, Marot M. Development of cochlear potentials in rats. *Audiology* 1981;20(2):89-100.
52. Pritchard U. The Development of the Organ of Corti. *J Anat Physiol* 1878;13(Pt 1):99-103.
53. Aloy A. *Chirurgische Intensivmedizin: Kompendium Für Die Praxis*. 1 ed. Wien; New York: Springer; 2007.
54. Mitazaki S, Kato N, Suto M, Hiraiwa K, Abe S. Interleukin-6 deficiency accelerates cisplatin-induced acute renal failure but not systemic injury. *Toxicology* 2009;265(3):115-121.
55. Crane RA, Camilon M, Nguyen S, Meyer TA. Steroids for treatment of sudden sensorineural hearing loss: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Laryngoscope* 2014.
56. Meyer T. Intratympanic treatment for tinnitus: a review. *Noise Health* 2013;15(63):83-90.
57. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002;110(6):835-842.
58. Yoshida K, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. Effect of proinflammatory cytokines on cultured spiral ligament fibrocytes. *Hear Res* 1999;137(1-2):155-159.

59. Monzack EL, Cunningham LL. Lead roles for supporting actors: critical functions of inner ear supporting cells. *Hear Res* 2013;303:20-29.
60. Raphael Y. Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. *Br Med Bull* 2002;63:25-38.
61. Heldin CH, Purton M. *Signal Transduction*. 2 ed. Cheltenham: Nelson Thornes; 1998.
62. Leibinger M, Muller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D. Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci* 2009;29(45):14334-14341.
63. Appler JM, Goodrich LV. Connecting the ear to the brain: Molecular mechanisms of auditory circuit assembly. *Prog Neurobiol* 2011;93(4):488-508.
64. Bulankina AV, Moser T. Neural circuit development in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda)* 2012;27(2):100-112.
65. Whitlon DS, Grover M, Tristano J, Williams T, Coulson MT. Culture conditions determine the prevalence of bipolar and monopolar neurons in cultures of dissociated spiral ganglion. *Neuroscience* 2007;146(2):833-840.
66. Hyatt SH, Rohrer H, Zigmond RE. The conditioning lesion effect on sympathetic neurite outgrowth is dependent on gp130 cytokines. *Exp Neurol* 2010;223(2):516-522.
67. Yang P, Wen H, Ou S, Cui J, Fan D. IL-6 promotes regeneration and functional recovery after cortical spinal tract injury by reactivating intrinsic growth program of neurons and enhancing synapse formation. *Exp Neurol* 2012;236(1):19-27.
68. Callizot N, Andriambeloson E, Glass J et al. Interleukin-6 protects against paclitaxel, cisplatin and vincristine-induced neuropathies without impairing chemotherapeutic activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62(6):995-1007.
69. Marullo R, Werner E, Degtyareva N et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* 2013;8(11):e81162.
70. Menke T, Gille G, Reber F et al. Coenzyme Q10 reduces the toxicity of rotenone in neuronal cultures by preserving the mitochondrial membrane potential. *Biofactors* 2003;18(1-4):65-72.
71. Fischel-Ghodsian N, Kopke RD, Ge X. Mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Mitochondrion* 2004;4(5-6):675-694.
72. Jensen-Smith HC, Hallworth R, Nichols MG. Gentamicin rapidly inhibits mitochondrial metabolism in high-frequency cochlear outer hair cells. *PLoS One* 2012;7(6):e38471.
73. Sancho-Martinez SM, Prieto-Garcia L, Prieto M, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther* 2012;136(1):35-55.

74. Schmelzer C, Lindner I, Rimbach G, Niklowitz P, Menke T, Doring F. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. *Biofactors* 2008;32(1-4):179-183.
75. Klein R, Brown D, Turnley AM. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. *BMC Neurosci* 2007;8:61.
76. Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E et al. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* 2007;26(17):2435-2444.
77. Qi QR, Yang ZM. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World J Biol Chem* 2014;5(2):231-239.
78. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19(21):2628-2637.
79. Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS et al. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1091:151-169.
80. Zhou L, Too HP. Mitochondrial localized STAT3 is involved in NGF induced neurite outgrowth. *PLoS One* 2011;6(6):e21680.
81. Szczepanek K, Lesnefsky EJ, Larner AC. Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol* 2012;22(8):429-437.
82. Mitazaki S, Hashimoto M, Matsushashi Y et al. Interleukin-6 modulates oxidative stress produced during the development of cisplatin nephrotoxicity. *Life Sci* 2013;92(12):694-700.
83. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003;3(11):900-911.
84. Ding D, He J, Allman BL et al. Cisplatin ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures. *Hear Res* 2011;282(1-2):196-203.
85. Hellberg V, Wallin I, Ehrsson H, Laurell G. Cochlear pharmacokinetics of cisplatin: an in vivo study in the guinea pig. *Laryngoscope* 2013;123(12):3172-3177.
86. Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res* 2001;155(1-2):1-8.
87. Tian CJ, Kim YJ, Kim SW, Lim HJ, Kim YS, Choung YH. A combination of cilostazol and Ginkgo biloba extract protects against cisplatin-induced Cochleo-vestibular dysfunction by inhibiting the mitochondrial apoptotic and ERK pathways. *Cell Death Dis* 2013;4:e509.
88. Lim SL, Park SY, Kang S et al. Morusin induces cell death through inactivating STAT3 signaling in prostate cancer cells. *Am J Cancer Res* 2015;5(1):289-299.

89. Liu Z, Qiu YH, Li B, Ma SH, Peng YP. Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA-induced apoptosis and its signal-transduction mechanisms. *Neurotox Res* 2011;19(3):484-495.
90. Niu G, Wright KL, Ma Y et al. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 2005;25(17):7432-7440.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elisabeth Freutel, geb. Gerschner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Molekulare Mechanismen der Zytokin- und Ubichinon-induzierten Otoprotektion gegenüber Cisplatin“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

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







## Danksagung

Ich freue mich, dass ich nun am Abschluss meiner Arbeit auf die vergangenen Jahre zurückblicken kann und die Gelegenheit nutzen kann, den Menschen zu danken, ohne die die Entstehung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. med. Birgit Mazurek, meiner Doktormutter und Direktorin des Tinnituszentrums der Charité, danken. Ich möchte ihr für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas sowie für das damit verbundene Vertrauen danken. Weiterhin danke ich ihr für die Überlassung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien sowie für das Ermöglichen der Teilnahme an mehreren nationalen und internationalen Kongressen. Besonderer Dank gilt ihr aber für den konstanten wissenschaftlichen Dialog und ihre Worte der Motivation während jeder Phase des Arbeitsprozesses

Mein Dank gilt meiner Co-Mentorin Frau Dr. Agnieszka Szczepek. Sie hat mich auf dem Weg von den ersten Pipettierversuchen bis zur Fertigstellung dieser Dissertation begleitet. Dabei waren mir nicht nur ihr wissenschaftlicher Erfahrungsschatz und ihre analytische Denkweise, sondern auch ihre außergewöhnliche Kreativität, ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft eine große Stütze entlang des Arbeitsprozesses.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen des molekularbiologischen Innenohrforschungslabors: Frau Dr. Uta Reich, Frau Astrid Machulik, Frau Elke Hoffmann, Frau Julia Fuchs und Frau Dipl. Biol. Olga Hegend. Ich danke ihnen für die gute und familiäre Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für ihre technische Unterstützung und Beratung sowie für die schöne Zeit, die wir zusammen hatten. Besonders möchte ich Frau Julia Fuchs und Frau Dipl. Biol. Olga Hegend für die gewissenhafte, geduldige und technisch herausragende Einführung in die Praxis des wissenschaftlichen Arbeitens und in die experimentellen Protokolle der Arbeitsgruppe danken.

Auch bei Herrn Jörg Rösner bedanke ich mich ganz herzlich für die Einführung in die Bedienung des Konfokalmikroskops und für seinen Rat, wann immer ich seine Hilfe brauchte.

Mein tief empfundener Dank gilt zu guter Letzt meiner Familie. An erster Stelle danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die Anfertigung dieser Dissertation erst ermöglicht haben und mich stets darin bekräftigt haben, mir hohe Ziele zu stecken und mich Schritt für Schritt an sie heran zu arbeiten. Weiterhin danke ich meiner Schwester Johanna, meinen Schwiegereltern

und meinen Freunden, die mich stets motiviert und mir ihr Ohr geliehen haben. Besonders danke ich meinen Großeltern, für ihre mitfühlende Unterstützung entlang des Weges und für Ihre unermüdliche Ermutigung. Ich danke Tobias für seine Geduld, sein Verständnis, für die Ruhe, die er auch in unruhigen Zeiten ausstrahlt und für seinen bedingungslosen Rückhalt.