

3. Ergebnisse

3.1. Die organotypische Kultur der Cochlea

Das *in vitro* Modell der Cochlea wurde benutzt, um direkt den Einfluss von Hypoxie und Ischämie auf die Haarzellen zu untersuchen. Dabei wurde die Region des OC neonataler Wistarratten des 3. bis 5. Lebensstages von den übrigen Strukturen der Cochlea isoliert. IHZ und ÄHZ wurden entsprechend ihrer unterschiedlichen Morphologie getrennt voneinander beurteilt. Die organotypische Kultur der Cochlea eignet sich gut, den Haarzellverlust unter Hypoxie und Ischämie, den Einfluss von pathogenetisch wichtigen Faktoren wie die K^+ -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} -Konzentration sowie die Wirkung von NMDA-Antagonisten zu untersuchen. Gleichzeitig ist die organotypische Kultur für die Beurteilung der Form des Zelltodes der Haarzellen gut geeignet.

3.2. Vulnerabilität der Haarzellen gegenüber Hypoxie und Ischämie in der organotypischen Kultur

Zunächst untersuchten wir den Verlust von Haarzellen nach Hypoxie- und Ischämie-Exposition. Die Abb. 4 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Rhodamin-Phalloidin gefärbten Haarzellen in der organotypischen Kultur unter normoxischen Bedingungen und nach 24 h Hypoxie. Das normale OC zeigt eine Reihe IHZ und drei Reihen ÄHZ. Wie man erkennt, führt Hypoxie zu einem irregulären Haarzellverlust, wobei der Hauptanteil der untergegangenen Haarzellen die IHZ betraf.

Für die Charakterisierung der Hypoxievulnerabilität wählten wir zwei Zeitpunkte für die Hypoxieexposition. In der Gruppe A wurde die organotypische Cochlea-Kultur direkt nach der Präparation einer Hypoxie ausgesetzt, in der Gruppe B erfolgte eine Prä-Inkubation der Kultur von 12 h (über Nacht) in Normoxie und danach eine Hypoxieexposition. In beiden Gruppen wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt.

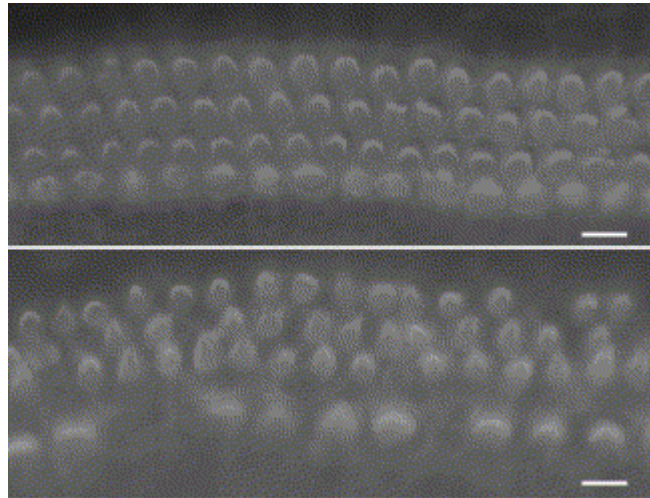


Abb. 4 Repräsentative Darstellung der Rhodamine-Phalloidin gefärbten Cochlea-Kultur (apikaler Teil) unter Normoxie (oben) und nach 24 h Hypoxie (unten). Der Strich entspricht 10 μm .

Die beiden Gruppen zeigen bemerkenswerte Unterschiede in der Vulnerabilität gegenüber Hypoxie. In der Gruppe A wurde nach 13 h Hypoxie ein Haarzellverlust von 15 % für die ÄHZ und 30 % für die IHZ ermittelt ($p < 0,001$ vs. Kontrollgruppe). Die Verlängerung der Hypoxie auf 36 h ergab einen signifikant höheren Haarzellverlust von 25 % für die ÄHZ und 55 % für die IHZ ($p < 0,001$ vs. 13 h). Bei beiden Hypoxiezeiten war die Differenz der Schädigung zwischen ÄHZ und IHZ signifikant ($p < 0,001$). Ein ähnliches Schädigungsmuster konnte in der Gruppe B nachgewiesen werden (nach 24 h Hypoxie 15 % ÄHZ und 20 % IHZ, nach 48 h 25 % ÄHZ und 45 h IHZ). Die Haarzellen von Segmenten, die sofort nach Präparation der Hypoxie ausgesetzt wurden, waren stärker geschädigt als die Haarzellen, die nach Präparation 12 h bei 37°C im Medium vorinkubiert wurden (Abb. 5).

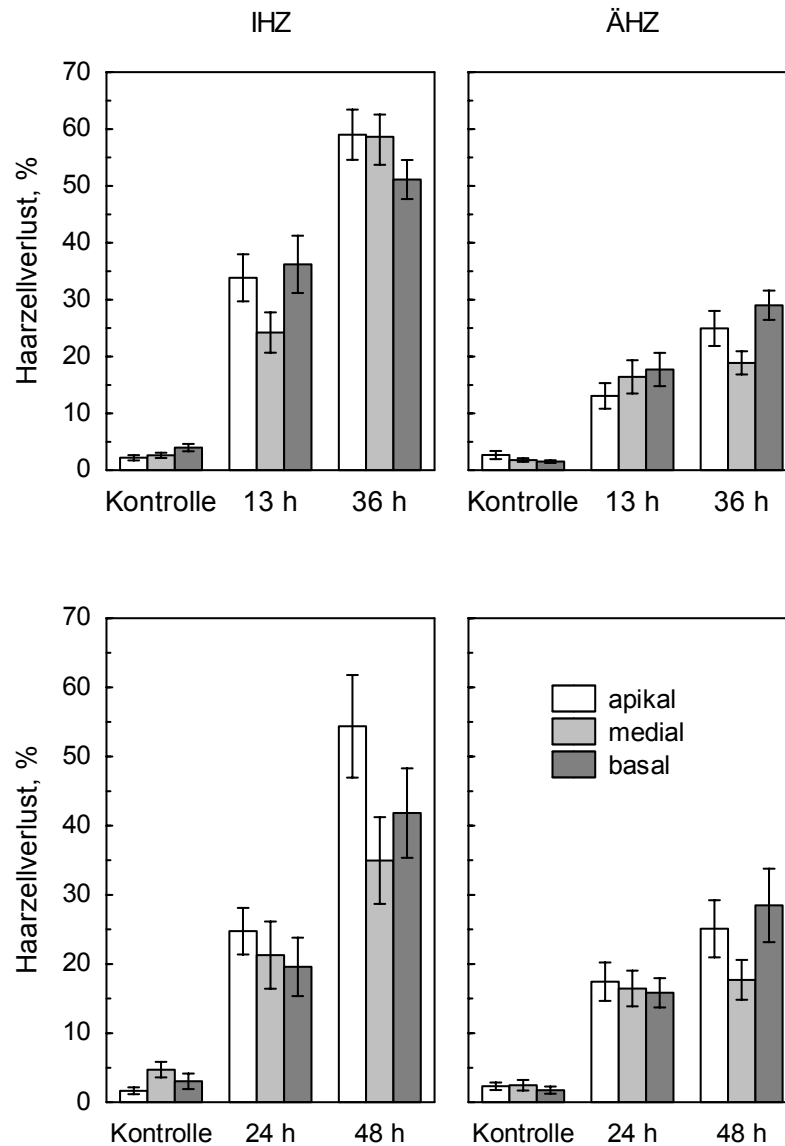


Abb. 5 Prozentualer Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) in den 3 cochleären Segmenten nach unterschiedlicher Hypoxiedauer im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Hypoxieexposition erfolgte unmittelbar (oben; 13 h n = 21, 36 h n = 41, Kontrollen n = 36) oder 12 h nach der Präparation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

Da es in der Gruppe A offensichtlich zu einer Addition von Schädigungsfaktoren (frische Präparation, Kultivierung und Hypoxie) kommt, benutzten wir für die folgenden Versuche den Versuchsaufbau der Gruppe B, das heißt die Hypoxie-/Ischämieexposition erfolgte erst nach Anwachsen und Stabilisierung der Kultur. Da die Hypoxieresistenz der

organotypischen Kultur unerwartet hoch war und der Ischämie eine größere klinische Relevanz zukommt als der Hypoxie, wurde die Vulnerabilität der HZ in der organotypischen Kultur unter ischämischen Bedingungen untersucht. Experimentell wurde die Ischämie durch die Exposition der Kultur in artifizieller Perilymphe mit Glukosemangel erzeugt. Es zeigte sich dabei, dass ein alleiniger Glukosemangel ohne Hypoxie zu keinem signifikanten Unterschied des Haarzellverlustes im Vergleich zur Kontrollgruppe führt (3 % bei IHZ und ÄHZ). Offensichtlich verfügen Haarzellen über so viele endogene Substrate (Glykogen, Keton-Körper, Kreatinphosphat, Aminosäuren), dass sie diese Zeit ohne Schädigung überleben. Bei einer Hypoxie in artifizieller Perilymphe von 8 h Dauer lag der Haarzellverlust für die ÄHZ bei 8 % und für die IHZ bei 14 %. Eine 8 h dauernde Ischämie erhöhte den Haarzellverlust dramatisch im Vergleich zur Hypoxie (19 % für ÄHZ und 39 % für IHZ) (Abb. 6).

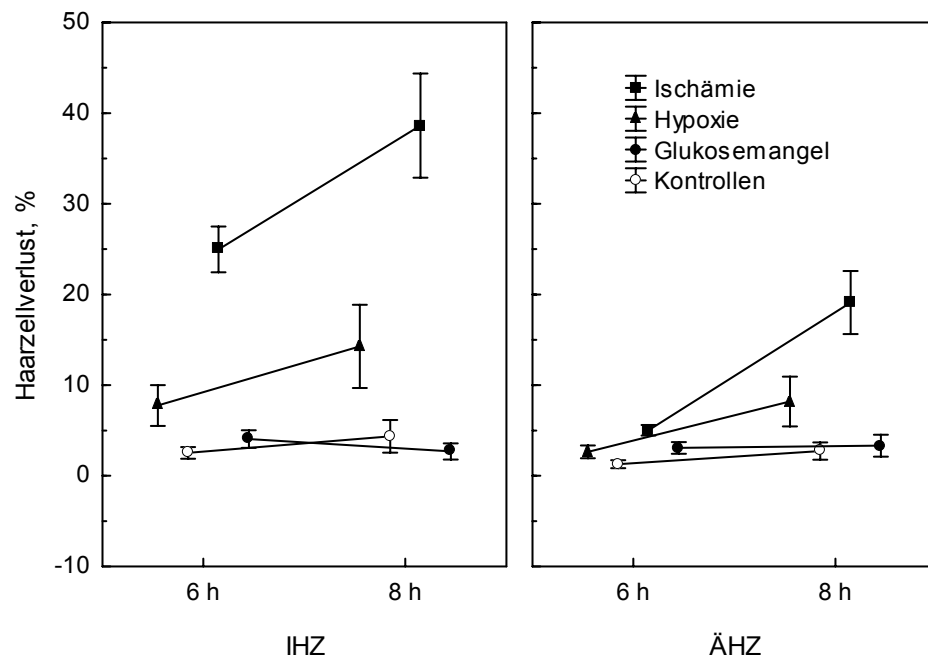


Abb. 6 Haarzellverlust (%) in der gesamten Cochlea nach 6 bzw. 8 h dauerndem Glukosemangel (n = 18), Hypoxie (n = 21) oder Ischämie (Glukosemangel + Hypoxie; n = 51) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (n = 19). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.3. Einflussfaktoren auf den Haarzellverlust

Bei der durch Hypoxie/Ischämie induzierten Schädigung der Haarzellen können Veränderungen der extrazellulären Ionenkonzentration von K^+ und Ca^{2+} im Sinne der Verstärkung oder Hemmung der Schädigung eine große Rolle spielen. So ist bekannt, dass es bei Hypoxie zum Austritt von K^+ aus der Zelle und Eintritt von Ca^{2+} in die Zelle kommt. Die pathologische K^+ -Depolarisation und die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden als Schlüsselfaktoren für die Zellschädigung angesehen.

3.3.1. Einfluss der Kalium-Konzentration auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen in der organotypischen Kultur

Da die Erhöhung der K^+ -Konzentration, wie in der Literatur beschrieben, einen toxischen Einfluss auf die Haarzellen haben kann, prüften wir den Einfluss von 5, 30, 50 und 70 mM K^+ in Normoxie und Ischämie.

In der normoxischen Gruppe mit 5 mM K^+ wurden 8,1-9,8 IHZ/100 μm und 34,1-36,2 $\text{ÄHZ}_{1-3}/100 \mu\text{m}$ in den apikalen, medialen und basalen Segmenten der Cochlea ermittelt. Die Erhöhung der Kaliumkonzentration von 30 auf 50 und 70 mM unter Normoxie zeigte keine wesentliche Veränderung in der Anzahl der IHZ und ÄHZ (Abb. 7). Die höhere Anzahl der IHZ bei 30 mM K^+ ist eher als Zufälligkeit einzuschätzen.

Eine Ischämie von 3 h schädigte weder die IHZ noch die ÄHZ in der vorliegenden Untersuchungsserie (Daten nicht gezeigt). Bei Steigerung der Ischämie auf 4 h stieg der Haarzellverlust sowohl bei IHZ als auch ÄHZ um 30-60 % an. Eine K^+ -Konzentration von 30 bzw. 50 mM beeinflusste den Schädigungsgrad nicht. Überraschenderweise wirkte die Erhöhung der K^+ -Konzentration auf 70 mM protektiv gegen den Ischämie bedingten Haarzellverlust (Abb. 8/9).

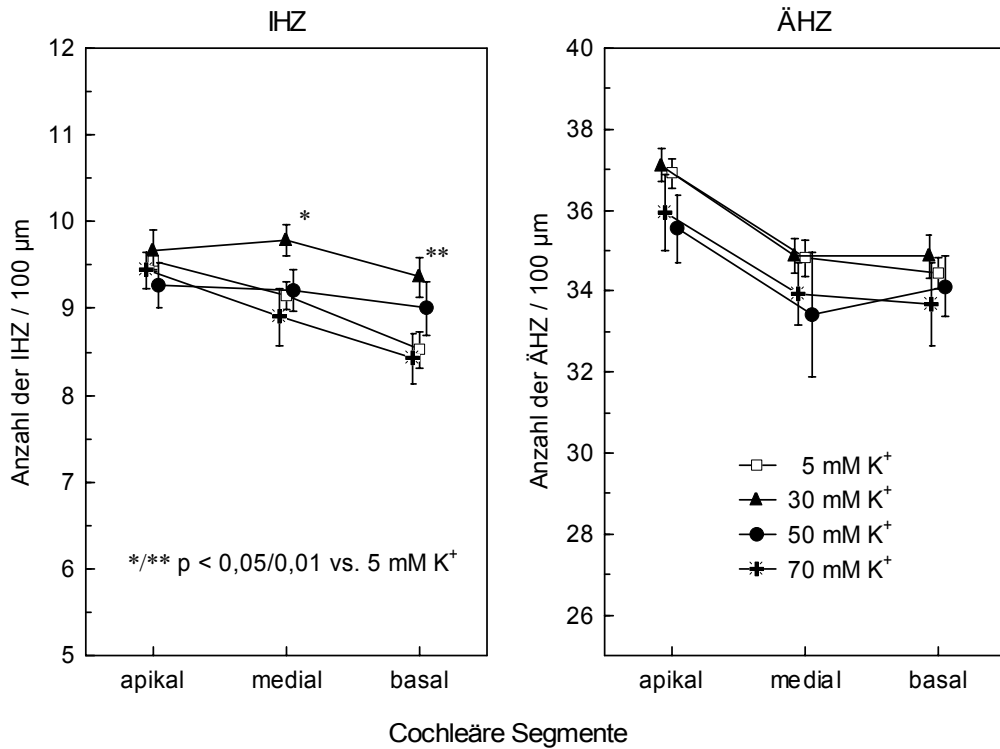


Abb. 7 Einfluss der Kalium (K⁺)-Konzentration im Medium unter Normoxie auf die Anzahl der inneren (IHZ) und äußeren (ÄHZ) Haarzellen, die in den 3 cochleären Segmenten/100 µm gezählt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler (5 mM K⁺, n = 36; 30 mM K⁺, n = 19; 50 mM K⁺, n = 17; 70 mM K⁺,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

Um die Ursache des protektiven Effektes von 70 mM K⁺ unter Ischämie näher zu beleuchten, wurden der Haarzellkultur die Substanzen Linopiridin, KB-R7943 oder Eosin zugesetzt. Linopiridin hemmt die KCNQ-Kanäle, KB-R7943 blockiert den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher, und Eosin blockiert die Plasmamembran-Kalzium-ATPasen (PMCA). KB-R7943 zeigte nur eine geringe Verschlechterung des Schadens in den medialen und basalen Segmenten der IHZ, ein Hinweis darauf, dass der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher nicht sehr stark an diesem protektiven Effekt beteiligt ist (Tabelle 2). Der Zusatz von 10 µM Linopiridin führte zu einem signifikanten Verlust der IHZ in allen Segmenten und der ÄHZ im basalen Bereich. Die Konzentrationserhöhung auf 100 µM Linopiridin verstärkte den Schaden an IHZ und ÄHZ deutlich. Eosin wirkte ähnlich wie Linopiridin und hob die protektive Wirkung von 70 mM K⁺ bei IHZ und ÄHZ auf.

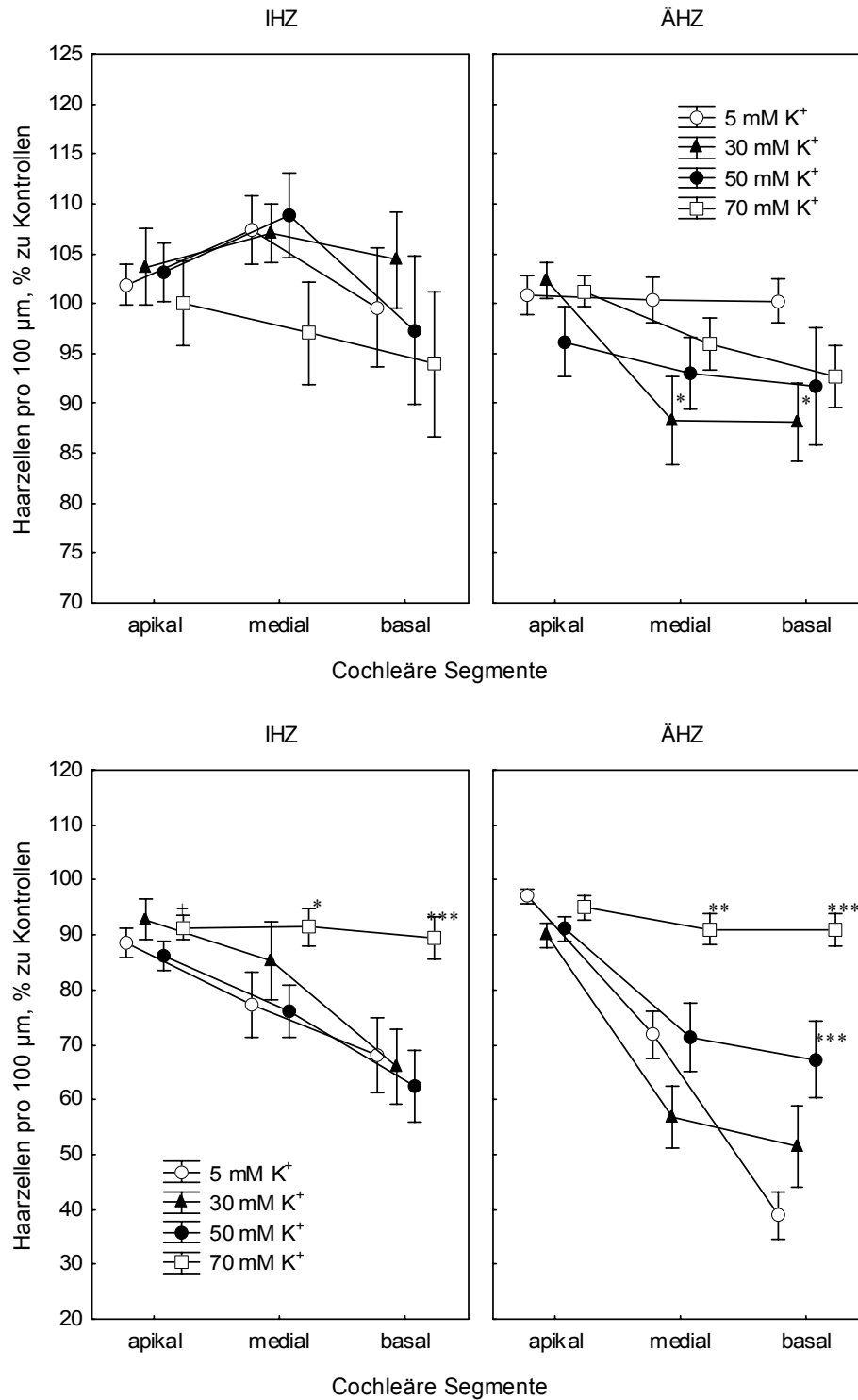


Abb. 8/9 Einfluss der Kalium (K⁺)-Konzentration im Medium auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ), die in den 3 cochleären Segmenten nach 3 h (Abb. 8, oben) und 4 h (Abb. 9, unten) Ischämie pro 100 µm gezählt wurden (% zu Kontrollen). Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler.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

Tabelle 2 Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) unter ischämischen Bedingungen und einer K^+ -Konzentration von 70 mM im Medium ohne Blocker oder mit Linopiridin, KB-R7943 bzw. Eosin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (% gegenüber Werten ohne Blocker bei 70 mM K^+ unter Normoxie).

Bedingung	IHZ			ÄHZ		
	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
Linopiridin 10 μ M, n = 5	44,9 \pm 13,2 ^c	43,8 \pm 13,9 ^c	62,3 \pm 20,3 ^c	1,5 \pm 3,3 ^d	4,2 \pm 3,3 ^d	34,5 \pm 7,1 ^b
Linopiridin 100 μ M, n = 5	42,7 \pm 13,1 ^b	78,2 \pm 20,3 ^c	86,1 \pm 11,5 ^c	17,6 \pm 10,6 ^a	77,8 \pm 10,4 ^c	74,6 \pm 7,3 ^c
K-BR7943 10 μ M, n = 5	0,8 \pm 5,1	23,1 \pm 10,7 ^a	28,2 \pm 1,8 ^a	-6,7 \pm 0,6	8,2 \pm 6,0	5,4 \pm 2,6
Eosin 10 μ M, n = 6	31,4 \pm 9,4 ^b	77,8 \pm 7,6 ^c	97,0 \pm 1,9 ^c	11,3 \pm 6,4	69,2 \pm 10,3 ^c	91,8 \pm 3,7 ^c

^{a/b/c} p < 0,05/0,01/0,001 vs. Gruppen ohne Blocker; ^d p < 0,05 vs. IHZ

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine K^+ -Konzentration > 30 mM im Modell der organotypischen Kultur der neugeborenen Ratte nicht toxisch ist, im Gegenteil, eine K^+ -Konzentration von 70 mM wirkt protektiv auf die ischämisch bedingte Haarzellschädigung. Linopiridin (Hemmung der KCNQ-Kanäle) und Eosin (Hemmung der PMCA) heben die Protektion auf.

3.3.2. Einfluss der Kalzium-Konzentration auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen in der organotypischen Kultur

In der Literatur gibt es eine Reihe von Befunden, die zeigen, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von entscheidender Bedeutung für die Funktion und das Überleben der Haarzellen ist. Über zwei Hauptmechanismen kann die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aufrechterhalten werden: 1) Aufnahme des Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher im endoplasmatischen Retikulum über die „smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase“ (SERCA) und 2) das Herausschleusen von Ca^{2+} aus der Zelle über PMCA. Um die Rolle und Bedeutung der Ca^{2+} -Homeostase für das Überleben von Haarzellen unter Ischämie

genauer zu verstehen, wurde der Effekt von Thapsigargin (10 nM-10 μ M) als Inhibitor der SERCA und Eosin (1,5-10 μ M) als Inhibitor der PMCA untersucht.

Die Cochlea-Kulturen wurden einer Ischämie von 4 h ausgesetzt. Die Tabelle 3 zeigt den Einfluss von Thapsigargin auf die Haarzellen unter Normoxie und Ischämie, wobei die Mittelwerte aus den apikalen, medialen und basalen Segmenten dargestellt wurden. Die Ischämie resultierte in einem signifikanten Verlust von IHZ und ÄHZ bei einer Analyse 24 h nach Ischämie (unveröffentlichte Daten). Der Verlust an IHZ betrug 35-51% und an ÄHZ 15-20% im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea, wobei das apikale Segment eine geringe Schädigung aufwies. Thapsigargin zeigt unter keiner der verwendeten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Haarzellen unter normoxischen Bedingungen. Auch unter ischämischen Bedingungen konnte kein additiver Effekt auf die ÄHZ und IHZ durch Thapsigargin festgestellt werden.

Tabelle 3 Anzahl der gezählten inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) pro 100 μ m unter Normoxie und Ischämie ohne (Kontrollen) und mit unterschiedlichen Thapsigargin-Konzentrationen [Mittelwert \pm Standardfehler (n)].

Thapsigargin-Konzentration	Normoxie		Ischämie	
	IHZ	ÄHZ	IHZ	ÄHZ
Kontrolle	9,5 \pm 0,1 (19)	12,2 \pm 0,1 (19)	5,5 \pm 0,6 (23)	9,6 \pm 0,3 (23)
10 nM	9,2 \pm 0,2 (5)	11,9 \pm 0,1 (5)	5,4 \pm 1,2 (5)	10,4 \pm 0,6 (5)
100 nM	9,1 \pm 0,2 (6)	12,0 \pm 0,1 (6)	4,2 \pm 1,3 (6)	9,4 \pm 0,8 (6)
1 μ M	9,0 \pm 0,1 (6)	11,8 \pm 0,2 (6)	5,9 \pm 1,5 (6)	8,8 \pm 1,1 (6)
10 μ M	9,1 \pm 0,4 (4)	11,9 \pm 0,3 (4)	8,6 \pm 0,4 (5)	10,0 \pm 0,9 (5)

Hingegen schädigte Eosin in jeder der verwendeten Konzentrationen die IHZ und ÄHZ bereits unter Normoxie signifikant. Den höchsten Eosin induzierten Schaden verursachte eine Konzentration von 10 μ M und mit ca. 25 % in beiden Haarzelltypen im

Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 10), wobei der Mittelwert aus den apikalen, medialen und basalen Segmenten dargestellt wurde.

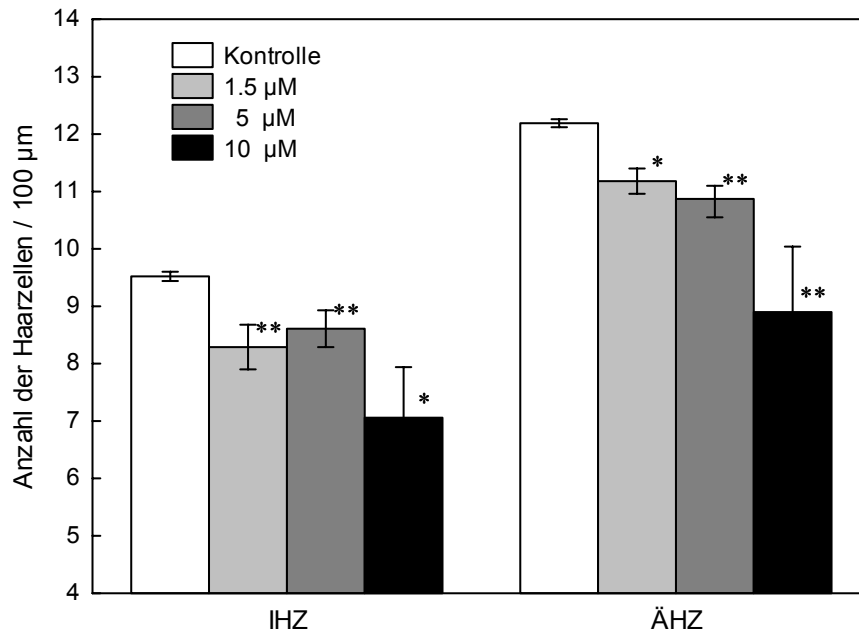


Abb. 10 Wirkung von unterschiedlichen Eosinkonzentrationen (1,5 µM, n = 15; 5 und 10 µM, je n = 9) auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 19). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler (*/** p < 0,05/0,01 vs. Kontrolle).

Unter Ischämie verstärkte Eosin den durch Ischämie induzierten Haarzellverlust im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung (Tabelle 4). Bei Konzentrationen von 1,5 µM war kein signifikanter Effekt bei beiden Haarzellarten zu ermitteln. 5 µM schädigt die IHZ um 60 % (p < 0,01 vs. Kontrolle), aber noch nicht die ÄHZ. Bei Konzentrationen von 10 µM Eosin war die IHZ um 80 % und die ÄHZ um 50 % geschädigt (p < 0,001).

Die Ergebnisse zeigen, dass die PMCA-Aktivität eine wichtige Rolle für das Überleben der Haarzellen unter Ischämie spielt.

Tabelle 4 Anzahl der gezählten inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) pro 100 µm unter Ischämie ohne (Kontrollen) und mit unterschiedlichen Eosin-Konzentrationen [Mittelwert ± Standardfehler (n)].

Zelltyp	Kontrolle	1,5 µM Eosin	5 µM Eosin	10 µM Eosin
IHZ	5,5 ± 0,6 (23)	4,2 ± 0,6 (20)	2,2 ± 0,6 (11)*	1,2 ± 0,3 (10)**
ÄHZ	9,6 ± 0,3 (23)	9,1 ± 0,5 (20)	8,1 ± 1,1 (11)	4,5 ± 0,9 (10)**

*/** p < 0,01/0,001 vs. Kontrolle

3.3.3. Wirkung von Magnesium auf die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen

In früheren Untersuchungen hatten wir gezeigt, dass die Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration auf lärminduzierte Haarzellschädigung protektiv wirken kann (Haupt et al., 2003). Von Pujol et al. (1993) wird die Rolle der NMDA-Rezeptoren für die Schädigung der IHZ hervorgehoben. Wir benutzten die organotypische Kultur, um die Wirkung dieser Faktoren auf die Hypoxie und Ischämie induzierte Schädigung zu untersuchen.

Zur Untersuchung des Einflusses von Mg^{2+} auf den hypoxischen Haarzellverlust wurde dem Kulturmedium eine Konzentration von 3 mM Mg^{2+} zugesetzt. Als Kontrollgruppe wurden parallel Segmente im Kulturmedium mit ebenfalls 3 mM Mg^{2+} -Zusatz normoxisch kultiviert. Dabei wurde zur Vergleichbarkeit eine Hypoxiedauer von 36 h gewählt (König et al., 2003). Die Ergebnisse sind in der Abb. 11 zusammengefasst. In allen Segmenten (apikal, medial, basal) konnte ein protektiver Effekt durch Mg^{2+} auf die Haarzellen nachgewiesen werden. In den IHZ ging der hypoxische Haarzellverlust um 50 %, in den ÄHZ um 70 % unter Mg^{2+} -Einfluss zurück. Wie oben beschrieben, blieben die IHZ unverändert um den Faktor 2,8 höher geschädigt als die zugehörigen ÄHZ.

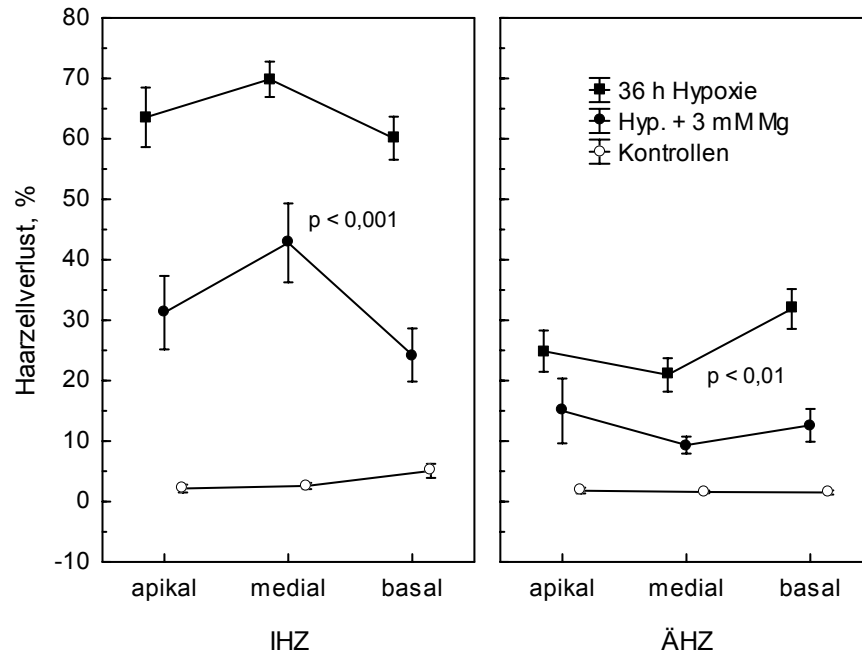


Abb. 11 Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) in den 3 cochleären Segmenten nach 36 h Hypoxie ohne (n = 12) und mit Zusatz von 3 mM Magnesium (Mg, n = 6) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (n = 15). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. $P < 0,01/0,001$ kennzeichnet die Signifikanzen zwischen den beiden Hypoxiegruppen.

3.3.4. Wirkung von MK 801 auf die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen

Um den Effekt von NMDA-Rezeptoren auf die hypoxieinduzierte Haarzellschädigung zu untersuchen, wurde MK 801, ein NMDA-Antagonist, der organotypischen Kultur zugesetzt. Dabei diente die Hypothese als Grundlage, dass vermehrte präsynaptische Glutamatausschüttung am NMDA-Rezeptor zur Exzitotoxizität führt.

Dem Kulturmedium wurde MK 801 in den verschiedenen Konzentrationen (1 und 10 μ M) zugesetzt, und anschließend wurden die Segmente 36 h Hypoxie exponiert. Parallel wurden eine hypoxische Vergleichsgruppe ohne MK 801-Zusatz und eine Toxizitätskontrolle in Normoxie mit dem Zusatz von 1, 10 und 100 μ M MK 801 untersucht.

Die Schädigungen der Haarzellen der normoxischen Kontrollgruppe mit MK 801 sowie in der Hypoxiegruppe ohne Zusatz von MK 801 lagen im Bereich vorangegangener

Untersuchungen. MK 801 reduzierte in beiden Konzentrationen den durch die Hypoxie induzierten Verlust an IHZ und ÄHZ signifikant, wobei die Wirkung bei 10 μM etwas höher war. Die ÄHZ wurden um bis zu 20 % weniger geschädigt und bei den IHZ, die wieder stärker beeinträchtigt waren als die ÄHZ, nahm die Schädigung sogar um ca. 20-40 % ab (Abb. 12).

Bei der Dosissteigerung des NMDA-Antagonisten MK 801 auf 100 μM zeigte sich entgegen unseren Erwartungen keine Protektion, sondern eine signifikante Verstärkung des Haarzellverlustes unter Hypoxie im Vergleich zu den hypoxischen Segmenten ohne Zusatz von MK 801 (Daten nicht gezeigt).

Damit bestätigen diese Untersuchungen auch im Modell der organotypischen Kultur die protektive Wirkung von Mg^{2+} und NMDA-Antagonisten auf Hypoxie bedingte Haarzellschädigung.

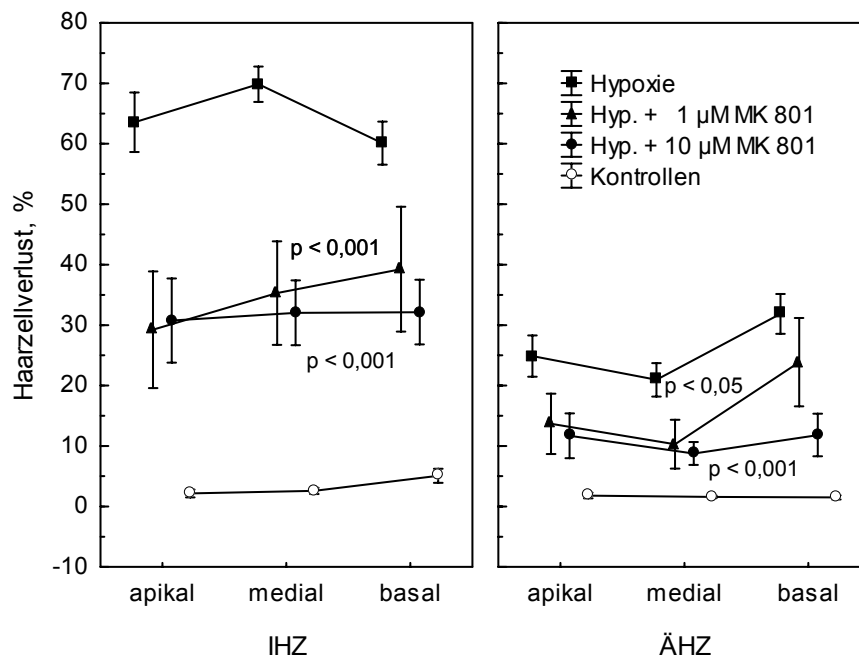


Abb. 12 Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (IHZ/ÄHZ) in den 3 cochleären Segmenten nach 36 h Hypoxie ohne ($n = 12$) und mit Zusatz von 1 μM ($n = 6$) bzw. 10 μM MK 801 ($n = 8$) im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($n = 15$). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. $P < 0,05/0,001$ kennzeichnet die Signifikanzen zwischen der unbehandelten und den mit MK 801 behandelten Hypoxiegruppen.

3.4. Art des Zelltodes unter Ischämie

3.4.1. Apoptose und Nekrose der Haarzellen

Im Zusammenhang mit der Protektion von Haarzellen ist von besonderem Interesse, welchen Anteil Apoptose und Nekrose am durch Ischämie induzierten Haarzellverlust hat. Während der nekrotische Zelltod als irreversibel angesehen wird, besteht bei dem apoptotischen Zelltod die Möglichkeit der präventiven Einflussnahme. Das methodische Problem dieser Untersuchung bestand darin, den apoptotisch bzw. nekrotisch induzierten Zelltod den Haarzellen und nicht z. B. den Stützzellen zuzuordnen. Die eindeutige Zuordnung der Zellkerne zu den HZ wurde durch folgendes Vorgehen erreicht: 1. Anfärbung der vitalen organotypischen Kultur mit Propidiumjodid (PI). 2. Fixierung der organotypischen Kultur und Anfärbung des Aktins mittels Phalloidin. 3. Färbung der DNA-Fragmente mittels DNA End labeling Assay (ApopTag).

Zunächst prüften wir das Verhalten der IHZ und ÄHZ nach Ischämie von 3 h und 4 h Dauer und zu verschiedenen Zeiten nach Ischämie (unmittelbar nach Ischämie und 24 h später). Die Abb. 13 zeigt die Anzahl von IHZ und ÄHZ im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea. Man kann folgendes erkennen: 1. Mit zunehmender Ischämiedauer fiel die Anzahl der nachweisbaren IHZ und ÄHZ ab. 2. Die Analyse der vorhandenen Haarzellen sofort nach Ischämieende war höher als 24 h später. 3. Die Anzahl der IHZ nach Ischämie fiel stärker ab als die der ÄHZ. Es ist interessant, dass der Verlust von IHZ stärker vom Untersuchungszeitpunkt abhängt als der von ÄHZ. 24 h nach Ischämie waren deutlich weniger IHZ vorhanden als unmittelbar nach Ischämie.

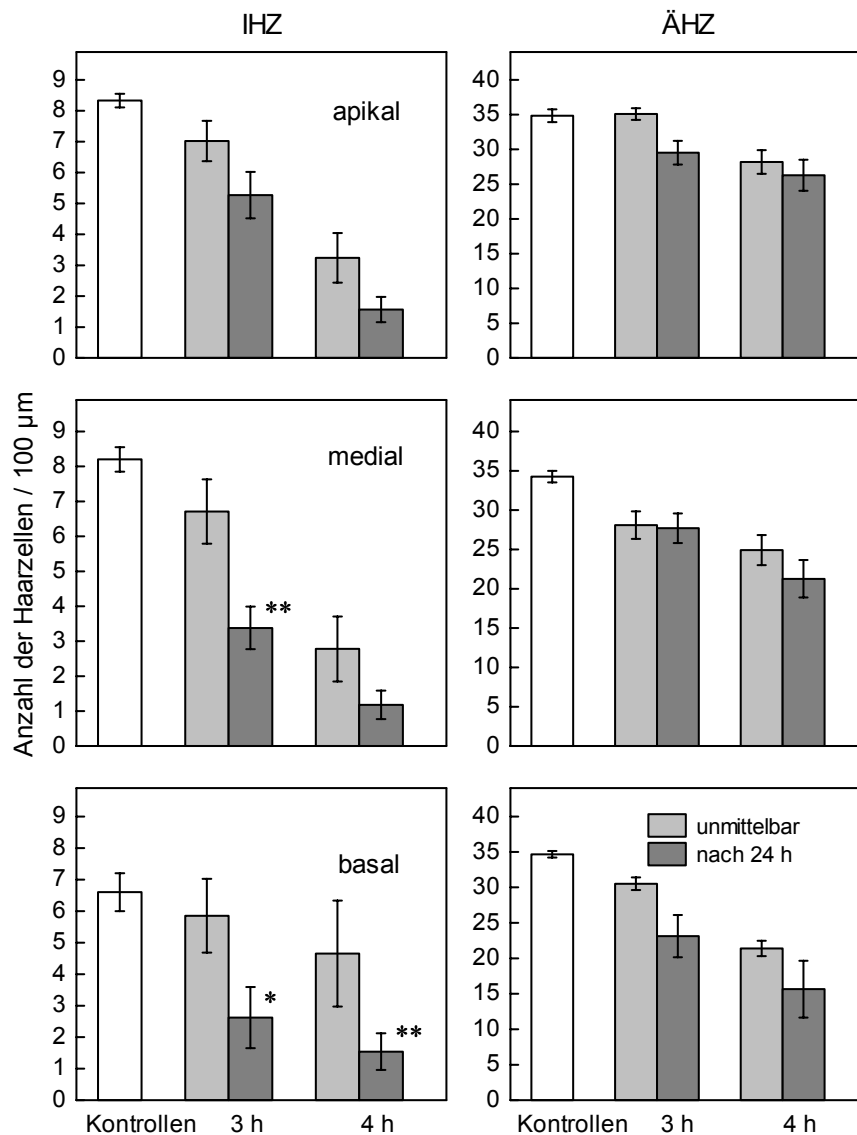


Abb. 13 Anzahl der inneren (IHZ) und äußeren Haarzellen (ÄHZ)/100 μm in den 3 cochleären Bereichen nach 3 h (n = 5-19) und 4 h Ischämie (n = 6-22) im Vergleich zu den Kontrollen (n = 18-28). Die Segmente wurden entweder unmittelbar oder 24 h nach der Ischämie fixiert (*/** p < 0,05/0,01 vs. unmittelbar). Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

Dann prüften wir die Kinetik des Verhaltens der gefärbten Kerne. Hierzu erfolgte die Probennahme ebenfalls mit Fixierung unmittelbar und 24 h nach Ischämie. Die Abb. 14 enthält den Anteil der nekrotischen und apoptotischen Kerne im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea. Die Abbildung erlaubt folgende Aussage: 1. Mit zunehmender Ischämiedauer stieg die Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Kerne an. 2. Die Analyse der nekrotischen Kerne sofort nach Ischämie-Ende zeigte mehr Kerne

als 24 h nach Ischämie. Wahrscheinlich handelt es sich hier um den Abbau nekrotischer Kerne. 3. Die Zahl der apoptotischen Kerne unmittelbar und 24 h nach Ischämie ist bei 3 h Ischämie identisch, bei 4 h Ischämie wird ein Anstieg apoptotischer Kerne gezählt. Wahrscheinlich handelt es sich hier um den verzögerten Zelltod („delayed cell death“).

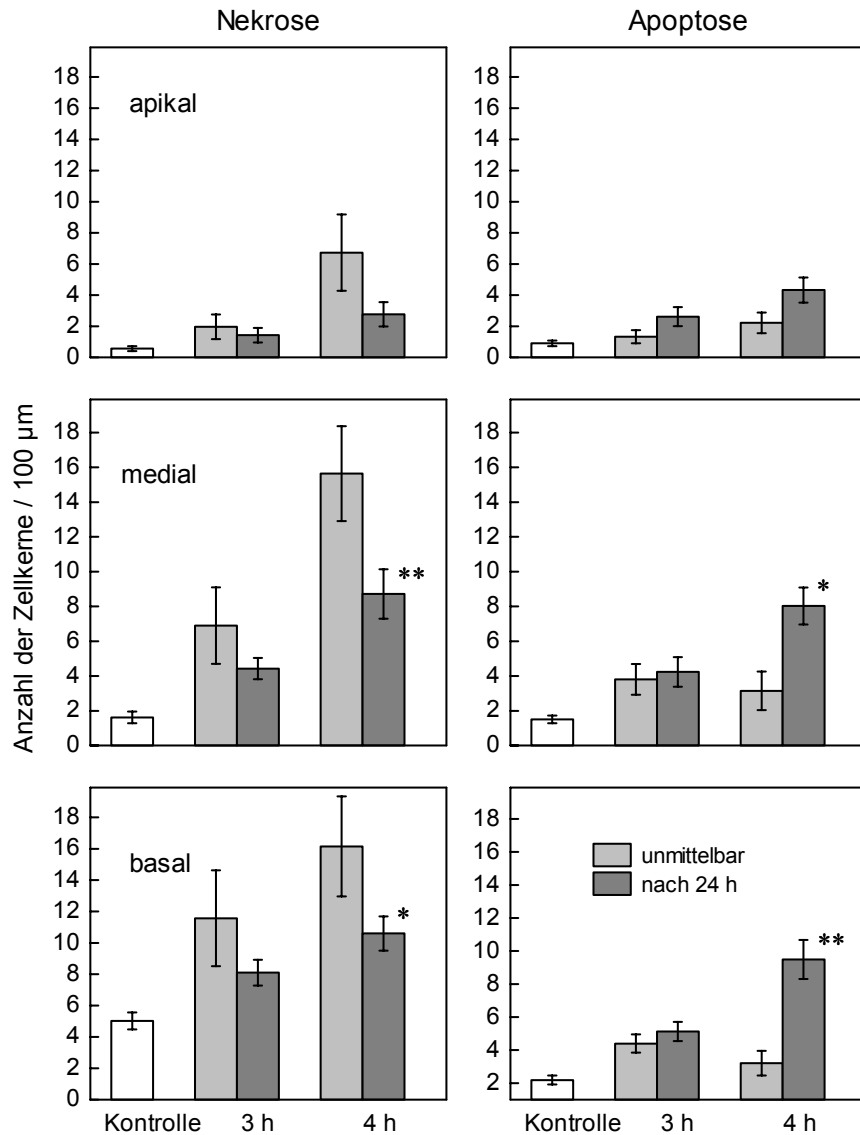


Abb. 14 Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellkerne/100 μm in den 3 cochleären Segmenten nach 3 h (n = 5-21) und 4 h Ischämie (n = 4-22) im Vergleich zu den Kontrollen (n = 18-28). Die Proben wurden entweder unmittelbar oder 24 h nach der Ischämie untersucht (*/** p < 0,05/0,01 vs. unmittelbar). Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

Vergleicht man die Abb. 13 und 14 hinsichtlich der Kinetik des Abfalls der Haarzellen und des Auftretens nekrotischer und apoptotischer Kerne, so fällt auf, dass nach 24 h IHZ

und ÄHZ abfallen, aber die Anzahl nekrotischer Kerne nicht ansteigt, sondern sogar abfällt. Zugleich beobachtet man den Anstieg der apoptotischen Kerne (insbesondere nach 4 h Ischämie). Dieses Verhalten ist am ehesten dadurch zu erklären, dass nekrotische Kerne innerhalb von 24 h abgebaut werden und mit PI nicht mehr nachweisbar sind. Da die Anzahl der IHZ stärker abfällt als die der ÄHZ, ist anzunehmen, dass die IHZ verstärkt in den apoptotischen Zelltod münden.

3.4.2. Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Zelltod

In der Literatur ist die protektive Wirkung von Wachstumsfaktoren gegenüber dem Haarzellverlust infolge unterschiedlicher Noxen beschrieben (Malgrange et al., 2002; Staecker und Van De Water, 1998). Durch die Herstellung rekombinanter Wachstumsfaktoren erlangen diese zunehmend therapeutische Bedeutung (z. B. Erythropoetin). Wir benutzten das oben beschriebene Vorgehen für die Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren, wobei besonders der Einfluss auf Apoptose und Nekrose interessierte. Für die Untersuchung wählten wir rhIGF-1, rhEPO und rhEGF. Die Wachstumsfaktoren wurden vor Ischämie zugegeben. Die Untersuchung des Zustandes der Haarzellen und Zellkerne erfolgte nur 24 h nach Ischämie, um einen Endzustand im Haarzellverlust nachzuweisen. Die Abb. 15 zeigt die Anzahl der Haarzellen nach Ischämie (3,5 h) mit und ohne Wachstumsfaktoren. Ischämie ohne Wachstumsfaktoren führte zu einem Haarzellverlust von 20-40% im medialen und basalen Segment der Cochlea ($p = 0,00$ vs. Kontrollen). rhIGF und rhEPO zeigten eine signifikante Reduzierung des Haarzellverlustes im medialen und basalen Segment der Cochlea um 27 % bzw. 14 %. rhEGF hingegen hatte keinen nachweisbaren Einfluss.

Zur Beurteilung des Einflusses der Wachstumsfaktoren auf die Art des Zelltodes wurde eine Unterscheidung in PI- und ApopTag®-gefärbte Zellkerne vorgenommen. Ischämie ohne Wachstumsfaktoren ergab jeweils 1-7 apoptotische und nekrotische Kerne.

rhEPO und rhIGF-1 reduzierten die apoptotischen und nekrotischen Kerne im medialen und basalen Cochlealsegment signifikant. rhEGF reduzierte die Anzahl der nekrotischen Kerne signifikant im basalen Segment (Abb. 16).

Bei unserem Vorgehen war zu erwarten, dass das Erscheinen der PI- und ApopTag®-gefärbten Zellkerne identisch mit der Anzahl des Haarzellverlustes ist. Um die Plausibilität der Zählung der Haarzellen (Phalloidin) und der gefärbten Zellkerne für die toten Haarzellen (PI, ApopTag®) zu prüfen, analysierten wir die Beziehung der vorhandenen Haarzellen zum Auftreten der Anzahl der gefärbten Kerne. Es wurde eine negative Korrelation gefunden ($r = -0,91$, $n = 15$; $p = 0,00$) (Abb. 17). Die Regressionsgerade zeigt, dass die Anzahl der gefärbten Kerne geringer als der Haarzellverlust ist (z. B. Abfall der Haarzellen von 46 auf 36 entspricht der Zunahme der gefärbten Kerne um 4).

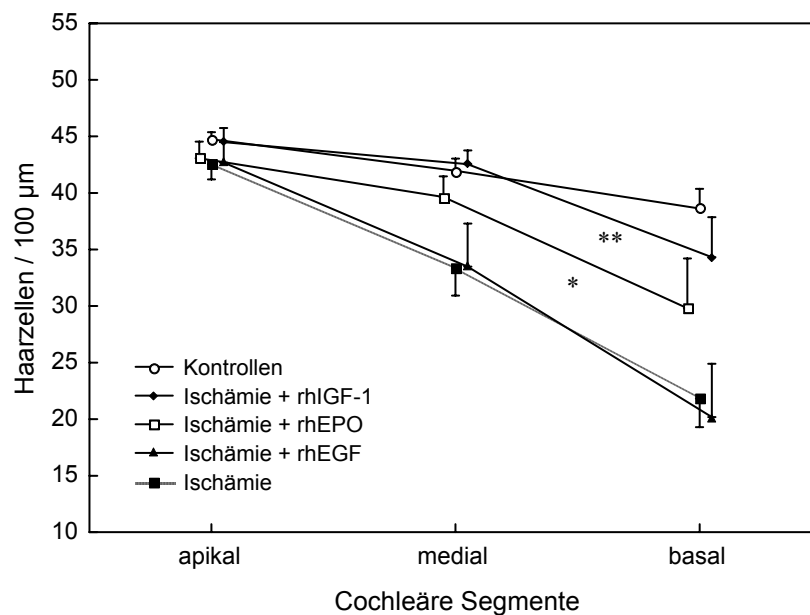


Abb. 15 Anzahl der im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea gezählten inneren und äußeren Haarzellen/100 μm der Kontrollgruppe ($n = 22-23$) sowie nach 3,5 h Ischämie ohne Wachstumsfaktoren (WF) ($n = 30-33$), mit rhEPO ($n = 8-9$), rhIGF-1 ($n = 11-12$) und rhEGF ($n = 9-11$). (Mittelwerte \pm Standardfehler; */** $p < 0,05/0,001$ vs. Ischämie ohne WF).

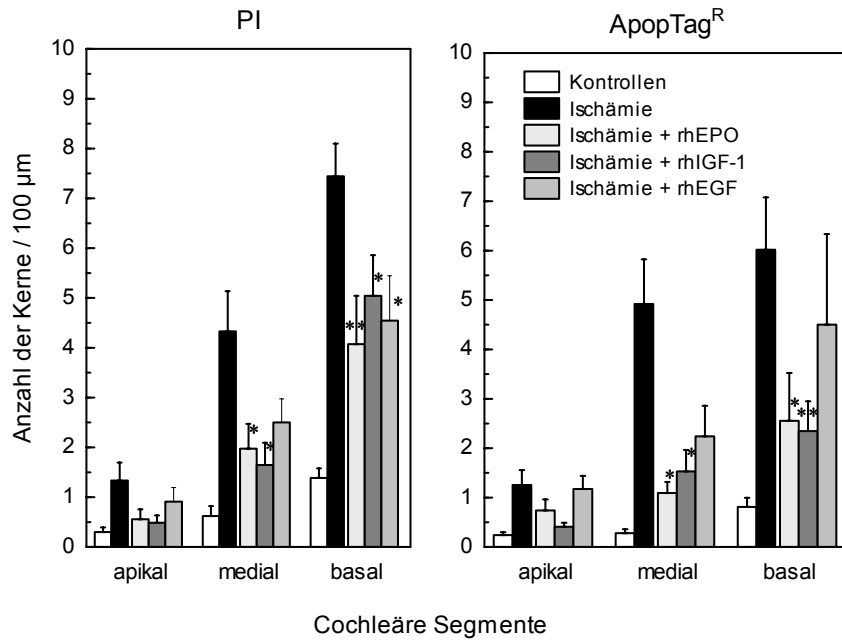


Abb. 16 Einfluss der Wachstumsfaktoren (WF) auf die Anzahl der nekrotischen (PI-gefärbten) und apoptotischen (ApopTag^R-gefärbten) Kerne, die in den 3 cochleären Segmenten der Kontrollgruppen (n = 18-23) und nach 3,5 h Ischämie ohne WF (n = 26-33) sowie mit rhEPO (n = 8-10), rhIGF-1 (n = 11-12) und rhEGF (n = 4-11) pro 100 µm gezählt wurden (Mittelwerte ± Standardfehler; */** p < 0,05/0,01 vs. Ischämie ohne WF).

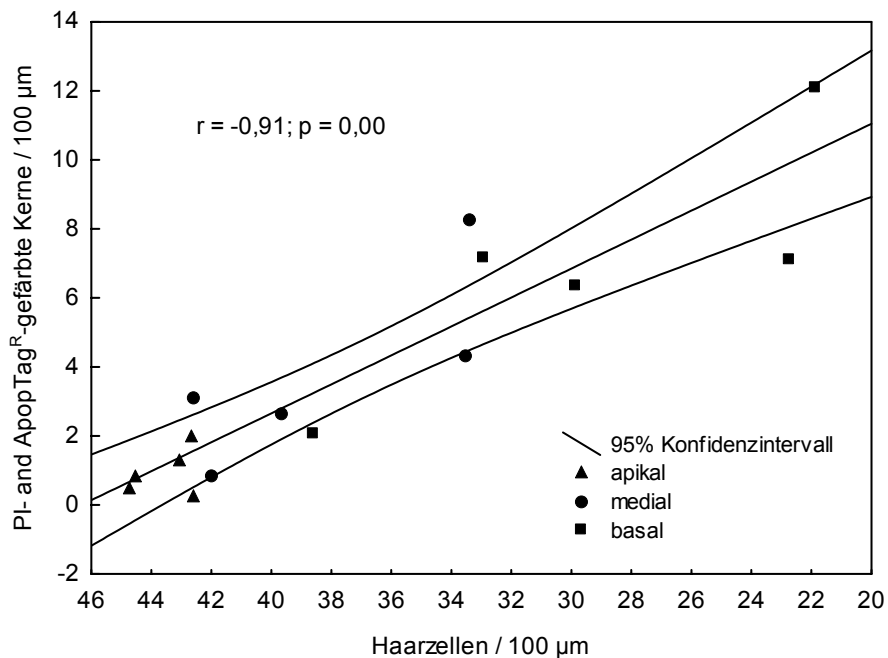


Abb. 17 Korrelation zwischen der Anzahl der Haarzellen und den PI- and ApopTag^R-gefärbten Kernen, die im apikalen, medialen and basalen Segment der Cochlea/100 µm gezählt wurden. Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen verwendet. (Kontrolle und Ischämie mit und ohne Wachstumsfaktoren).

Für die Beurteilung der Art des Zelltodes sind am ehesten die Ergebnisse der Probenentnahme sofort nach Ischämie heranzuziehen, weil nur bei diesem Versuchsansatz der Haarzellverlust mit den gefärbten Kernen übereinstimmte. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Anteil der nekrotischen Kerne deutlich höher war als jener der apoptotischen Kerne, ein Hinweis darauf, dass der Nekrose bei der Ischämie ein hoher Stellenwert zukommt.

Um zu prüfen, ob das OC Erythropoetin-Rezeptoren exprimiert, erfolgte der Nachweis mittels RT-PCR. Wie Abb. 18 zeigt, ist im OC eine deutliche Erythropoetin-Rezeptor-Bande zu erkennen.

Die Untersuchungen zeigen, dass für das Überleben von Haarzellen bei Hypoxie/Ischämie Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle spielen.

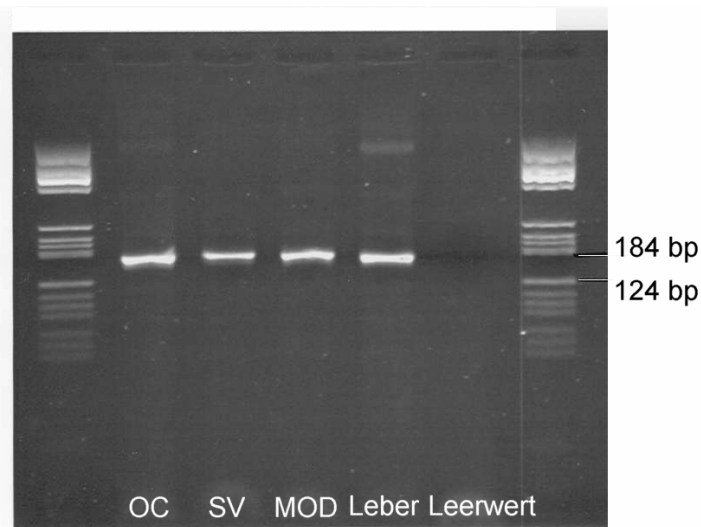


Abb. 18 Erythropoetin-Rezeptor-Bande in Organ Corti (OC), Stria vascularis (SV), Modiolus (MOD) im Vergleich zur Leber. Primer für EPO-RB (Acc. Nr. NM_017002, 1. Primer 5'-CTC-TCA-TCT-TGA-CGC-TGT-CT, 2. Primer 5'-CAG-CCA-TAG-CTG-GAA-GTT-AC)

3.5. HIF-1-Aktivität in der Cochlea

Hypoxie/Ischämie kann zum Zelltod oder über Verstärkung von Adaptationsfaktoren zum Zellüberleben führen. Ein Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Anpassung von Zellen und

Gewebe an Hypoxie/Ischämie ist HIF-1. Das Überleben der Haarzellen hängt stark von den benachbarten Zellen und Geweben ab. Gerade für die Innenohrfunktion ist bekannt, dass OC, MOD und SV eng zusammenarbeiten (z. B. Ionenhomeostase). Da die Cochlea aus diesen drei komplexen zellulären Strukturen besteht, haben wir für die nachfolgenden Untersuchungen nicht nur OC, sondern auch MOD und SV untersucht. Um die HIF-1-Expression zu untersuchen, wurden organotypische Kulturen und EZK von SV, MOD und OC hergestellt und einer Hypoxie von 24 h Dauer ausgesetzt. Diese Hypoxiedauer wurde gewählt, weil in vorangegangenen Experimenten dadurch ein geeigneter Haarzellschaden erreicht werden konnte und somit auf eine HIF-1-Aktivierung zu schließen war. Dabei wurde die HIF-1-Expression auf Aktivitätsebene, mRNA-Ebene und Protein-Ebene untersucht.

3.5.1. HIF-1-Aktivität in der organotypischen Kultur

Zunächst wurden die Explant-Kulturen der verschiedenen Regionen der Cochlea mit den Vektoren pGL3 (Kontrolle) und pHRE transfiziert und deren luminometrische Aktivität gemessen (Abb. 19) (Gross et al., 2003).

Unter Normoxie zeigte sich eine geringe Luciferase-Aktivität mit keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Expression von pGL3 und pHRE. In allen drei Cochlea-Kulturen bestand aber bereits unter Normoxie eine basale Expression von pGL3, also eine Grundaktivität des SV 40-Promoters mit resultierender Luciferaseproduktion. Im Gegensatz dazu kam es unter Hypoxie (24 h) zu einer signifikanten pHRE Expression im MOD verglichen mit der SV, was zu einer signifikant erhöhten HIF-1-Aktivität im MOD im Vergleich zur SV führte (SV: $6,1 \pm 1,8$; OC: $19 \pm 6,8$; MOD $38,4 \pm 15,2$; $p < 0,03$, $n = 13$) (Gross et al., 2003).

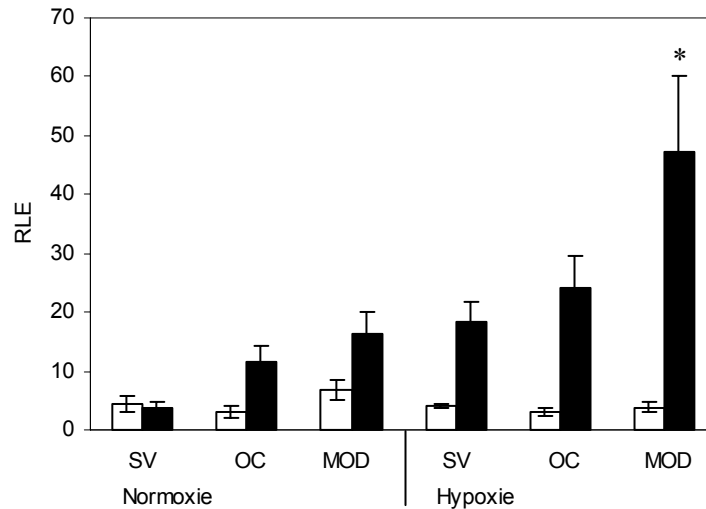


Abb. 19 Expression der Vektoren pGL3 (weiß) und pHRE (schwarz) in der Explant-Kultur von Stria vascularis (SV), Organ Corti (OC) und Modiolus (MOD) in Normoxie und Hypoxie (gemessen in RLE = relativen Lumineszenzeinheiten, Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 11-15$). Die Kulturen wurden direkt nach der Hypoxie (24 h) transfiziert (* $p < 0,001$ vs. SV).

3.5.2. HIF-1-Aktivierung unter Hypoxie und Ischämie in Einzelzellkultur

Da aufgrund der niedrigen Aktivität der Luciferase-Aktivität in der Explant-Kultur von einer niedrigen Transfektion ausgegangen werden muss, wurde die HIF-1-Aktivierung in den EZK von OC, MOD und SV gemessen. In Vorversuchen zeigte sich, dass die organotypische Kultur mit dem hier eingesetzten Verfahren nicht transfizierbar war. Daher wurde die EZK der Cochlea für die Bestimmung der HIF-1-Aktivität entwickelt. Bei der Präparation wurden der MOD und die SV von der OC-Region isoliert und in der EZK getrennt voneinander kultiviert.

Zunächst wurden die Transfektionsreagentien Transfast TM von Promega und CalPhos Mammalian Transfection Kit TM von Clontech für die Transfektion von Cochlea-EZK miteinander verglichen. Dabei waren die relativen Lumineszenzeinheiten (RLE) nach der Kalziumphosphatmethode jedoch um 3- bis 7fach höher als mit der Lipidmethode. Außerdem zeigte sich in der Kalziumphosphat transfizierten EZK eine höhere Vitalität, weshalb ihr der Vorzug gegeben wurde.

Es zeigte sich eine klar höhere RLE-Aktivität in den EZK verglichen zur organotypischen Kultur. Zum Beispiel wurden für die Region OC unter Normoxie RLE-Aktivitäten im Bereich von 100 und unter Hypoxie im Bereich von 1000 ermittelt. Damit zeigt sich eindeutig eine höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zur organotypischen Cochlea-Kultur. Die Expression des pGL3-Vektors, der als ein Indikator für die Transfektionseffizienz gilt, war in allen Regionen gleich.

Die Abb. 20 zeigt die HIF-1-Aktivität als Verhältnis zwischen pHRE/pGL3 in den Kontrollen und nach Hypoxieexposition von 6, 13, 24 oder 36 h. Durch den Quotienten pHBE/pGL3 kann der Einfluss der unterschiedlichen basalen Expression des SV 40-Promotors in den drei Cochlea-EZK eliminiert und damit die Werte untereinander verglichen werden. Das Verhältnis von Normoxie- zu Hypoxieaktivität stellt die HIF-1-Aktivierung durch Hypoxie dar.

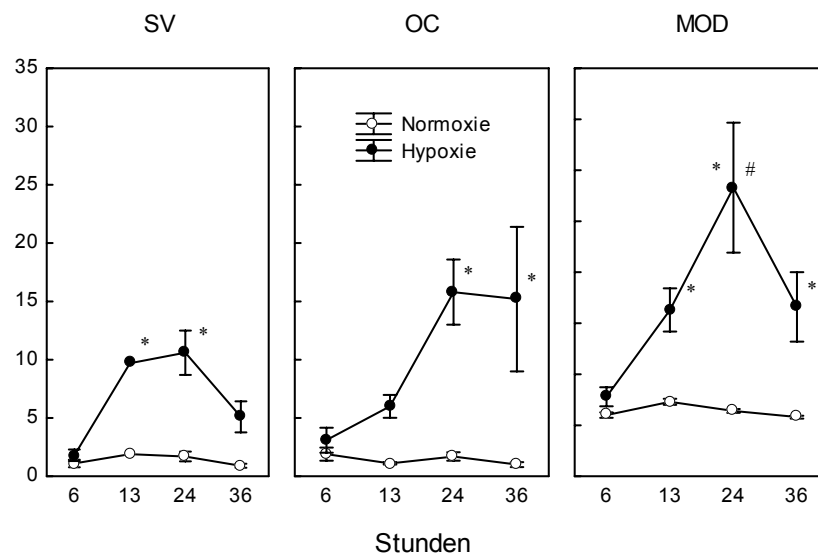


Abb. 20 Kinetik der HIF-1-Aktivität in den Einzelzellkulturen der drei Cochleagewebe Stria vascularis (SV), Organ Corti (OC) und Modiolus (MOD) nach 6 h, 13 h, 24 h und 36 h Hypoxie. Angegeben ist der Quotient aus pHRE/pGL3 unter Normoxie und Hypoxie (Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 4-6$ für jede Hypoxiezeit; * $p < 0,05$ vs. 6 h; # $p < 0,05$ im Vergleich zu SV).

Unter Normoxie wurde eine mittlere HIF-1-Aktivität von $1,4 \pm 0,5$ während der gesamten Zeit von 36 h ermittelt. Die hypoxischen Kulturen zeigten einen zeitabhängigen Anstieg der HIF-1-Aktivität. In der Region SV erreichte die HIF-1-Aktivität ihr Maximum nach 13 h Hypoxie und persistierte auf diesem Gehalt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Region OC und MOD ein kontinuierlicher Anstieg bis zu 24 h Hypoxie, und die HIF-1-Aktivität ist signifikant höher als in der SV.

Experimentell konnte nach einer 24-stündigen Hypoxie *in vitro* eine HIF-1-Aktivierung in den Regionen SV, OC und MOD nachgewiesen werden; im Bereich SV um den Faktor $6,4 \pm 1,5$, OC $9,4 \pm 3,0$ und MOD $14,1 \pm 3,5$ (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 4-6$).

Da in der klinischen Praxis Ischämie viel häufiger als reine Hypoxie vorkommt, prüften wir die HIF-1-Aktivierung unter Hypoxie und Glukosemangel (= Ischämie). Zum Erzeugen der Ischämie wurde ein Glukosemangelmodell in reiner Elektrolytlösung verwandt.

Prinzipiell lagen die RLE im kompletten Medium sowohl bei den pG13- als auch pHBE-transfizierten Kulturen wesentlich höher als im Elektrolytmedium, wobei dies als Ausdruck einer höheren Proteinsyntheserate ohne Einfluss auf die HIF-1-Aktivierung zurückzuführen ist. Die RLE-Werte in Elektrolytlösung mit und ohne Glukosezusatz unterscheiden sich nicht, so dass von einer ausreichenden Verfügbarkeit des Substrates ausgegangen werden kann.

Die HIF-Aktivierung in den drei Cochlea-Regionen in Elektrolytlösung mit und ohne Glukose sowie im kompletten Medium unter einer 13 h Hypoxie zeigte keine signifikanten Unterschiede. Auch hier konnte das schon früher ermittelte HIF-1-Aktivierungsprofil bestätigt werden, dass OC und MOD im Durchschnitt eine 3fach höhere HIF-1-Aktivierung als SV zeigen (Abb. 21).

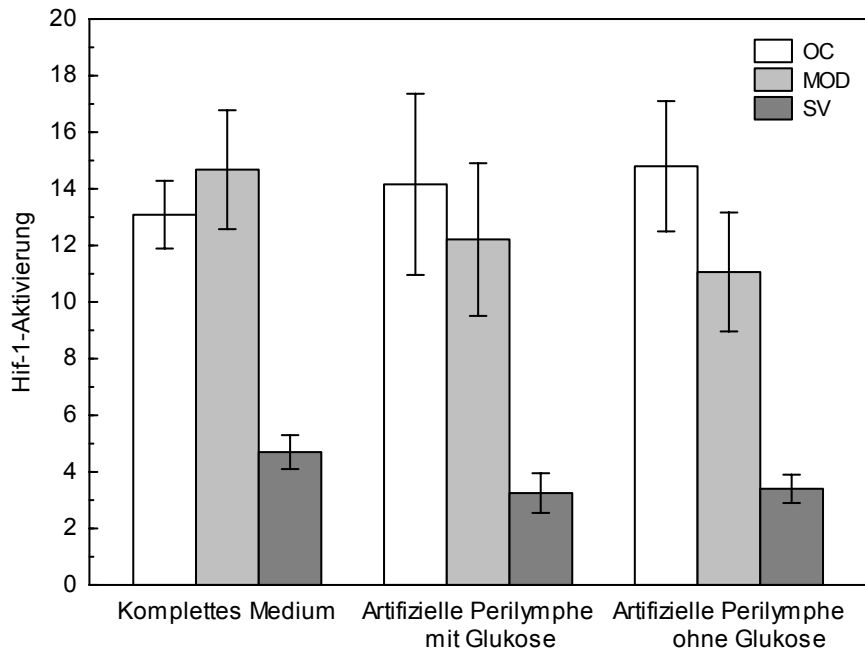


Abb. 21 Einfluss von Hypoxie und Ischämie auf die HIF-1-Aktivierung in der Einzelzellkultur von Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV). Die Untersuchung erfolgte im kompletten Medium (Hypoxie), in Elektrolytlösung mit Glukose (Hypoxie) und Elektrolytlösung ohne Glukose (Ischämie). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n = 4-6).

Bemerkenswert ist, dass sich bei Veränderung der experimentellen Bedingungen von Hypoxie zu Ischämie (Glukosemangel) kein Unterschied in der HIF-1-Aktivierung in den Regionen SV, MOD, OC zeigte. Allerdings war auch unter Ischämie die HIF-1-Aktivität im MOD und OC 3- bis 5fach so hoch wie in der SV. Daraus kann man ableiten, dass für die HIF-1-Aktivierung im Innenohr der Sauerstoffmangel der entscheidende Faktor ist und nicht der Substratmangel.

3.5.3. HIF-1 alpha Protein in der Einzelzellkultur

Um den Regulationsmechanismus und die Muster der unterschiedlichen HIF-1-Aktivierung in den einzelnen Cochlea-Regionen näher zu beleuchten, wurde HIF-1-Protein über HIF-1-ELISA/“Enzyme-linked immunosorbent assay“ gemessen.

Insgesamt war der HIF-1-Protein-Gehalt in den normoxischen und hypoxischen Zellen niedrig, weil anstatt des Kern-Extrakts der Zell-Extrakt zur Quantifizierung genommen

wurde. Der HIF-1-Protein-Gehalt war im MOD geringer als in OC und SV und nahm unter Hypoxie in allen 3 Bereichen zu. In den hypoxischen Proben war der HIF-Protein-Gehalt immer 2fach höher als in den Kontroll-Proben (Daten nicht gezeigt).

Um die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung von HIF-1 alpha zu charakterisieren, erfolgte eine zytochemische Darstellung von HIF-1 alpha in der EZK. Prinzipiell war unter normoxischen Bedingungen HIF-1 alpha in den Zellkernen nicht nachweisbar. Hingegen zeigten Zellen, die einer Hypoxie ausgesetzt sind, eine homogene Färbung aller Zellkerne. Interessanterweise waren bereits 60 min nach Hypoxieende die Zellkerne wieder entfärbt, was für einen schnellen Abbau von HIF-1 alpha spricht (Abb. 22).

Die Untersuchungen zeigen, dass sowohl Hypoxie als auch Ischämie zu einer starken Aktivierung von HIF-1 führen. Die HIF-1-Aktivierung ist in jenen Regionen, die neurosensorische Haarzellen oder neuronale Zellen (Modiolus) enthalten, am größten.

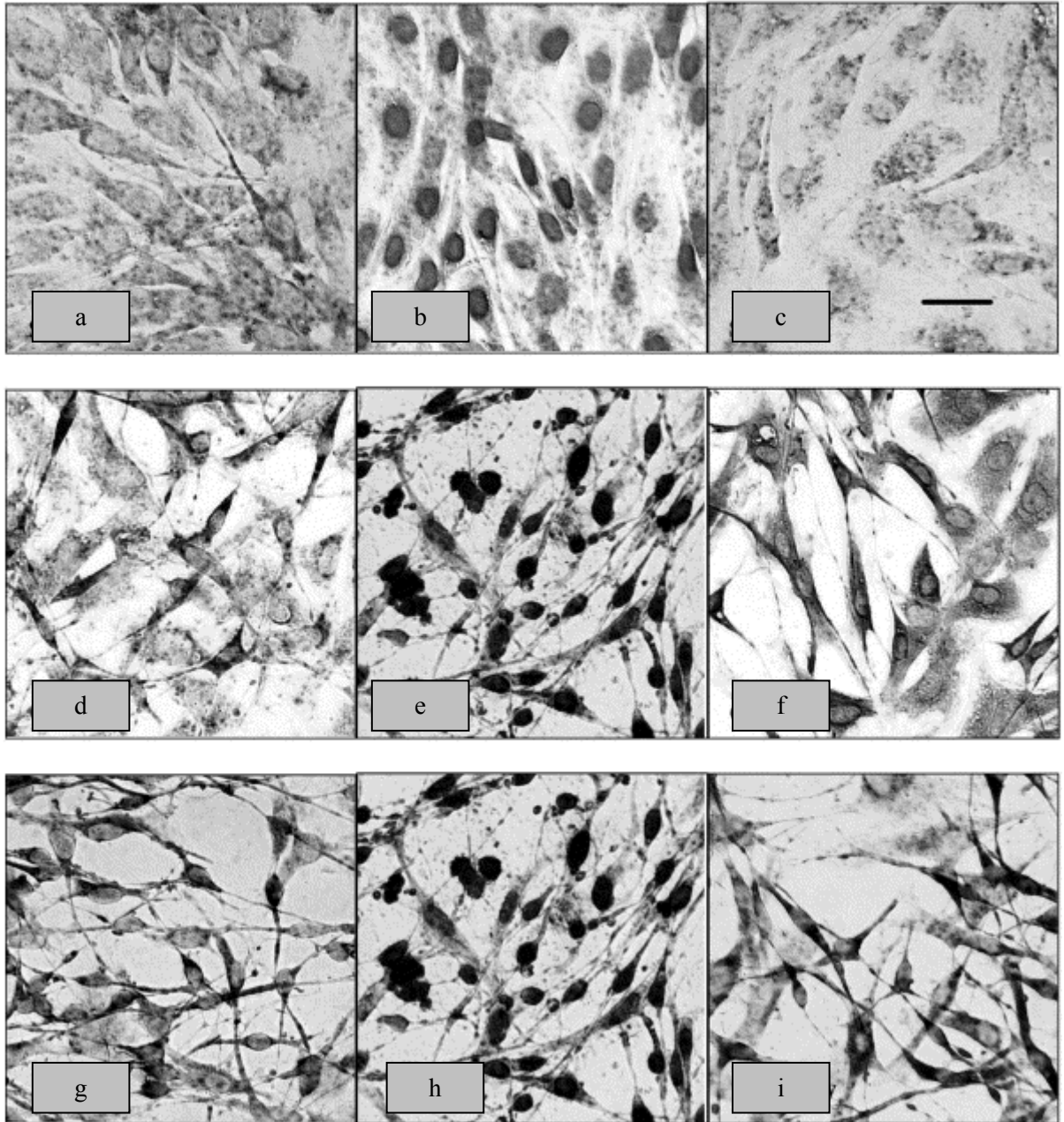


Abb. 22 Zytochemische Identifikation von HIF-1 alpha in Einzelzellkulturen von Stria vascularis (SV), Cortischem Organ (OC) und Modiolus (MOD) in Kulturen nach 24-stündiger Normoxie oder Hypoxie. (a) SV, Normoxie; (b) SV, Hypoxie; (c) SV, 60 Minuten nach Hypoxie; (d) OC, Normoxie; (e) OC, Hypoxie; (f) OC, 60 Minuten nach Hypoxie; (g) MO, Normoxie; (h) MO, Hypoxie; (i) MO, 60 Minuten nach Hypoxie. Dabei wurden normoxische Kulturen mit Kulturen, die einer Hypoxie von 24 h ausgesetzt waren und direkt nach Hypoxieende fixiert wurden, sowie mit Kulturen, die einer 24 h Hypoxie ausgesetzt waren aber 60 min nach Hypoxieende fixiert wurden, verglichen.

3.6. Genexpression in der Cochlea (mRNA)

Die Anpassung von Zellen und Geweben an Hypoxie/Ischämie geht mit Veränderungen der Genexpression, d. h. der Aktivität von Genen in Form von Synthese spezifischer mRNA, einher. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert etwa 50-60 Gene (Wenger et al., 1997). Da das Zellkulturmodell sowohl Wachstum als auch Reaktion auf Hypoxie/Ischämie beinhaltet, genügt die Analyse der HIF-1-abhängigen Gene allein nicht, um den komplexen Charakter der Anpassungsvorgänge in der Cochlea zu verstehen. Eine rationelle Methode der Untersuchung der Genexpression zahlreicher Gene ist die Microarray-Technik. In der vorliegenden Untersuchung haben wir uns für den Chip RN U34 entschieden, auf dem besonders neurobiologische Gene enthalten sind. Es erfolgte die Analyse der Genexpression an der frisch präparierten Cochlea (S1), nach 24 h Kultivierung (S2) und nach 24 h Kultivierung mit 5 h Hypoxie (S3).

3.6.1. Statistische Betrachtungen zu den angewandten Microarray-Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden so angelegt, dass eine Abschätzung der statistischen Sicherheit der Microarray-Untersuchungen möglich ist.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden von P1 OC zwei unabhängige Proben auf demselben Array untersucht (siehe Abb. 1, S. 36). Die Proben OC 1 und OC 2 ergaben identische Muster bei hierarchischer Clusterung (Abb. 29). Hingegen unterschieden sich die Muster in OC, MOD und SV der neugeborenen Ratte deutlich. Die Abb. 23 zeigt die Korrelation der normierten Signale von P1 OC 1 und P1 OC 2. Erwartungsgemäß besteht eine enge Korrelation, die durch die Gleichung $y = 1,0x$; $R^2 = 0,99$ ausgedrückt wird. Aus den Doppelbestimmungen kann man einen Variationskoeffizienten von $VK = 9,8 \pm 2$ bei $n = 321$ (beide Proben „present“) errechnen.

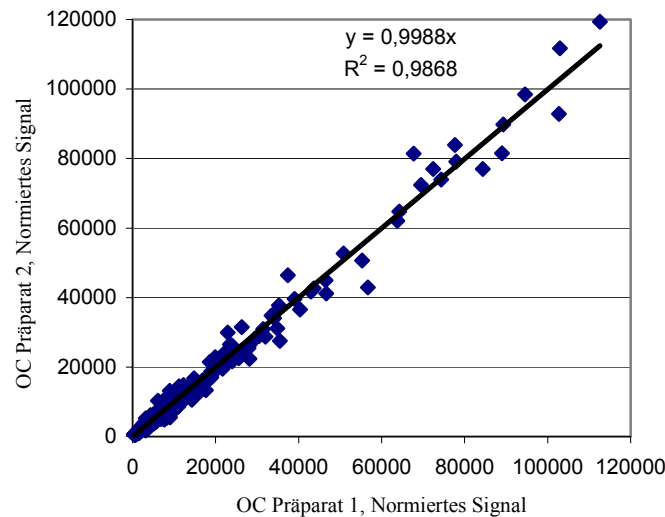


Abb. 23 Korrelation der normierten Signale von zwei Aliquotes des Organ Corti.

Eine ähnliche Korrelationsanalyse wurde für die Proben P2-P4 und P3-P5 durchgeführt. Um die statistische Aussage zu erhöhen, haben wir für diese Analyse nur Gene ausgewählt, deren p-Werte als „present“ ($< 0,04$) gewertet wurden und deren Differenz zwischen P2-P4 und P3-P5 einen VK $< 30\%$ aufwiesen. Diese Bedingungen erfüllten 263-316 Gene. Die Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Korrelationsanalysen OC, MOD und SV unter Normoxie, Kultivierung und Hypoxie zusammen.

In den folgenden Versuchen wurden als veränderte Expression nur jene Ergebnisse gewertet, die das ± 2 Fache (bei Hypoxie das $\pm 1,6$ Fache) betragen, somit besteht für die Daten eine akzeptable statistische Sicherheit. Die Abb. 24 zeigt exemplarisch die Daten für OC (P2 vs. P4). Es ist zu ersehen, dass eine signifikante Korrelation existiert, aber das Bestimmtheitsmaß geringer als bei Serie 1 ist. Der Regressionsquotient liegt im Bereich von 0,9-1,0. Der durchschnittliche VK der Doppelbestimmung schwankt im Bereich 1-13%.

Da P2 und P4 sowie P3 und P5 eine hohe Übereinstimmung zeigten, wurden in der weiteren Auswertung P2 und P4 zu P-Kultivierung (S2) sowie P3 und P5 zu P-Hypoxie (S3) zusammengefasst.

Tabelle 5 Korrelationsanalyse der normierten Signale von Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) unter den Bedingungen Normoxie, Kultivierung und Hypoxie

Bedingung	Cochleärer Bereich	Anzahl der Gene	Korrelations-Koeffizient r^2	Gleichung	VK
Normoxie (P1)	OC	321	0,99	$y = 1,0x$	$9,8 \pm 2$
Kultivierung (P2 und P4)	OC	298	0,973	$y = 0,933x$	$10,7 \pm 7,6$
	MOD	263	0,9448	$y = 1,021x$	$12,4 \pm 8,1$
	SV	316	0,9775	$y = 0,951x$	$11,1 \pm 7,8$
Hypoxie (P3 und P5)	OC	283	0,9568	$y = 0,949x$	$11,6 \pm 8,1$
	MOD	271	0,9695	$y = 1,152x$	$12,7 \pm 7,9$
	SV	307	0,9614	$y = 0,941x$	$12,1 \pm 7,8$

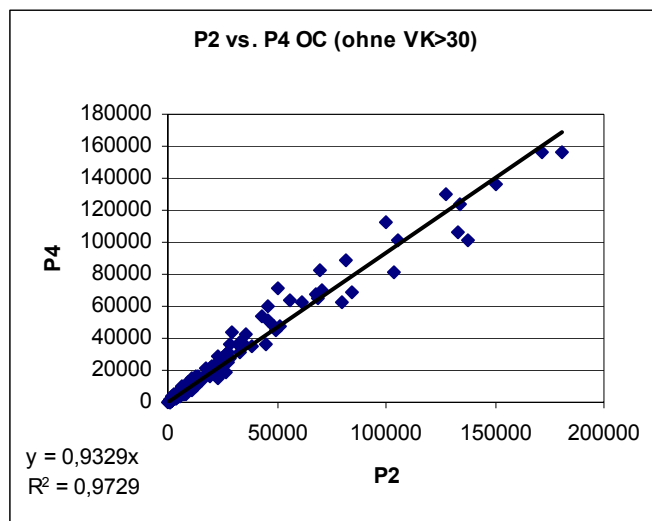


Abb. 24 Korrelation der normierten Signale des Organ Corti der Proben P2 und P4.

Bei Voranalysen stellte sich heraus, dass P1 und P2-P5 stärker voneinander abweichen, obwohl eine Normierung der Hybridisierungsdaten vorgenommen wurde (P1 eine Hybridisierungsserie, P2-P5 zweite und dritte Hybridisierungsserie). Da sich P1 sowie P2 und P4 biologisch unterscheiden (P1 ist frisch präpariert, P2 und P4 Kultivierung), kann die Korrelation aller Gene keine Aussage zur Zuverlässigkeit der Microarray-

Untersuchungen machen ($p < 0,04$). Unter der Annahme, dass „housekeeping“ Gene durch die Kultivierung wenig in ihrer Expression verändert sind, haben wir für den Vergleich P1 und P2-P4 nur die „housekeeping“ Gene herangezogen. Die Tabelle 6 zeigt die Korrelationsanalyse für OC, MOD und SV. Es zeigt sich, dass eine signifikante Beziehung zwischen P1 und P-Kultivierung existiert. Der Regressionsquotient liegt zwischen 0,86 und 1,2. Der durchschnittliche VK liegt im Bereich 15-22 %. Veränderungen um den Faktor 2 (100 %) zwischen P1 und P2-P4 Kultivierung können somit als statistisch signifikant angesehen werden.

Tabelle 6 Korrelationsanalyse der normierten Signale der „housekeeping“ Gene von Cortischem Organ (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) zwischen Normoxie (P1) und Kultivierung (P2/P4).

Cochleärer Bereich	Anzahl der Gene	Korrelations-Koeffizient r^2	Gleichung	VK
OC	12	0,9751	$y = 1,139x$	$16,1 \pm 11,0$
MOD	15	0,9268	$y = 1,207x$	$21,5 \pm 14,5$
SV	14	0,8509	$y = 0,86x$	$14,9 \pm 11,4$

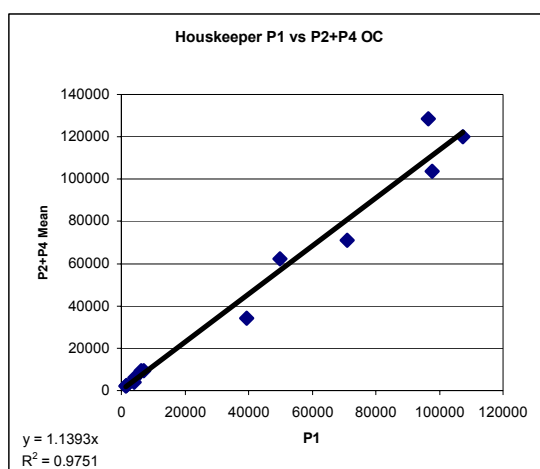


Abb. 25 Korrelation der normierten Signale der „housekeeping“ Gene in den Proben P1 und P2-P4 von Organ Corti.

Wie Abb. 25 am Beispiel OC zeigt, sind sowohl die Korrelation als auch die Streuung akzeptabel. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Proben P1 und P2-P4 vergleichbar sind.

Für die Abschätzung der Variation der normierten Signale zwischen P2 und P4 wurde der \log_2 des Quotienten von P2 und P4 in Abhängigkeit vom normierten Signal P2 analysiert. Die Abb. 26 lässt exemplarisch für die Daten des OC erkennen, dass für alle normierten Signale ($p < 0,04$, $VK < 30\%$) die Variation des Quotienten kleiner als $\log_2 = \pm 0,6$ (1,5fach) beträgt. Da wir im Folgenden nur die Veränderungen $\pm 2,0$ oder höher betrachtet haben, können wir davon ausgehen, dass die gefundenen Veränderungen statistisch signifikant sind.

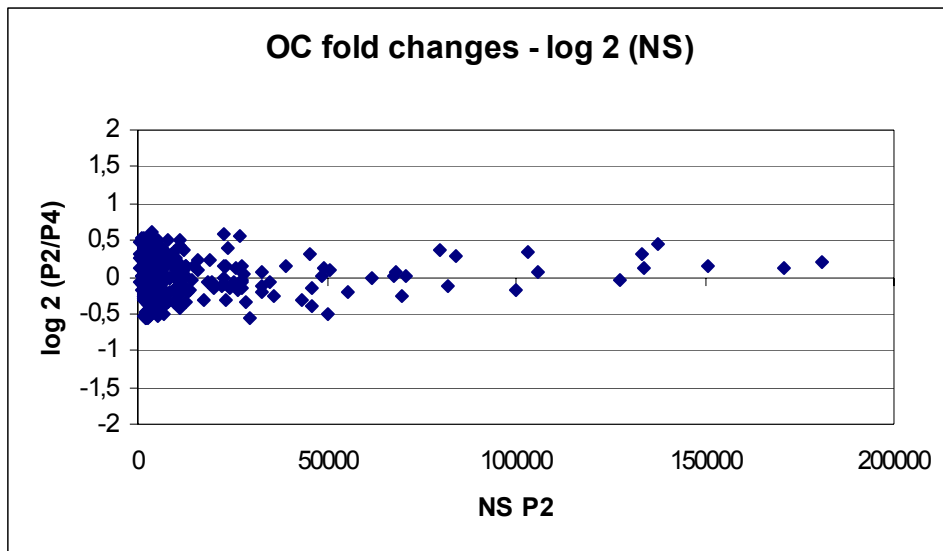


Abb. 26 Variation der normierten Signale der Proben P2 und P4 des Organ Corti.

Eine andere Möglichkeit der Darstellung des Fehlers ist die Analyse der Signifikanzschwelle ($-\log_{10}$ der p-Werte) in Abhängigkeit vom absoluten Wert des normierten Signals (\log_2). Für P2 OC z. B. ergibt sich, dass die normierten Signale im Bereich $\log_2 = 13$ (8192) eine Signifikanz von $p \leq 0,01$ ($\log_{10} = -2$) aufweisen (Abb. 27).

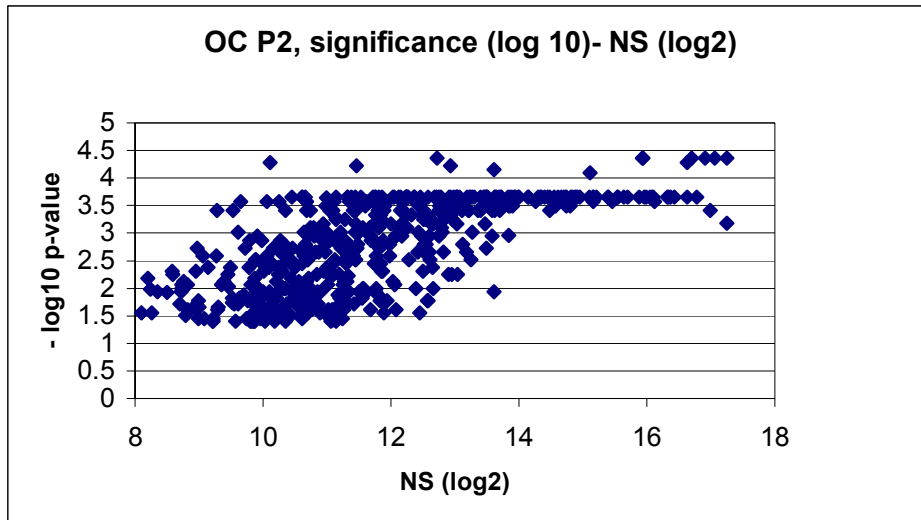


Abb. 27 Analyse der Signifikanzschwelle der normierten Signale des Organ Corti (P2).

Ein allgemeines Kriterium für die Güte von Microarray-Daten ist die Verteilung der normierten Signale (absolut und log 2). Die Abb. 28 zeigt die Histogramme von P1 OC. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, liegt bei Darstellung der Absolutwerte keine Normalverteilung vor (Abb. 28 oben). Wandelt man die linearen normierten Signale in log 2-Werte um, so ergibt sich eine Normalverteilung, ein Hinweis auf die Zuverlässigkeit der Microarray-Daten (Abb. 28 unten).

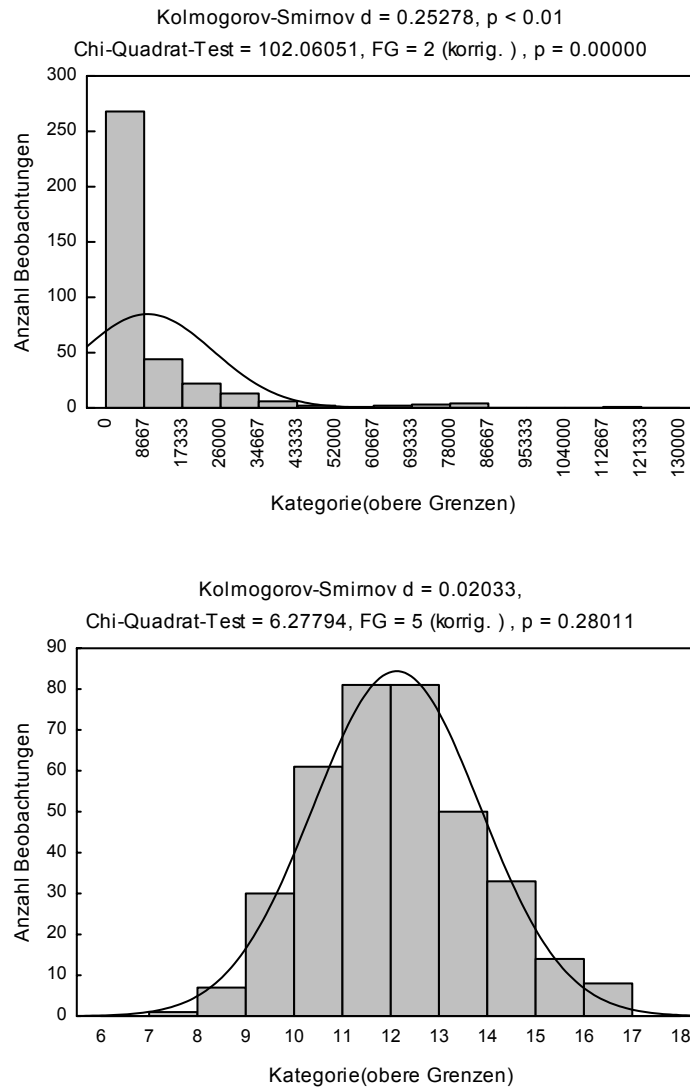


Abb. 28 Histogramm der Absolutwerte (oben) und der log 2-Werte (unten) der normierten Signale des Organ Corti (P1) mit Verteilungsanpassung.

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

Die Abb. 29 zeigt das globale Muster der Genexpression der neugeborenen Ratte in den Regionen OC, SV und MOD. Dabei wird jedem Gen in den einzelnen Regionen eine Linie zugeordnet. In der Darstellung bedeutet die Farbe Rot eine hohe, die Farbe Blau eine niedrige und die Farbe Gelb eine mittlere Genexpression. Die Berechnung der dargestellten Genexpressionsmuster erfolgte ohne Kenntnis der Herkunft des Clustermaterials.

In den nachfolgenden Untersuchungen ist der Fokus auf die Genexpression im OC, MOD und in der SV gelegt worden. Da es vor allem um das Verständnis der spezifischen Expression in der Cochlea ging, wurde folgende Herangehensweise gewählt: a) Analyse der Gene, die in einer Region besonders hoch exprimiert werden, b) Analyse der Gene, die in einer Region mehr als zweimal so hoch gegenüber den anderen beiden Regionen exprimiert werden und c) die Analyse jener Gene, die nur in einer Region exprimiert werden.

Unter Berücksichtigung der Funktion der Genprodukte bei Hypoxie/Ischämie wurden die Gene entsprechend ihrer Hauptfunktion in folgende Gruppen eingeteilt:

1. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene, 2. Wachstums- und Überlebensgene, 3. Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion, 4. Andere. Zum besseren Verständnis dieser Ergebnisse werden Ergebnisse und Diskussion größtenteils zusammen dargestellt.

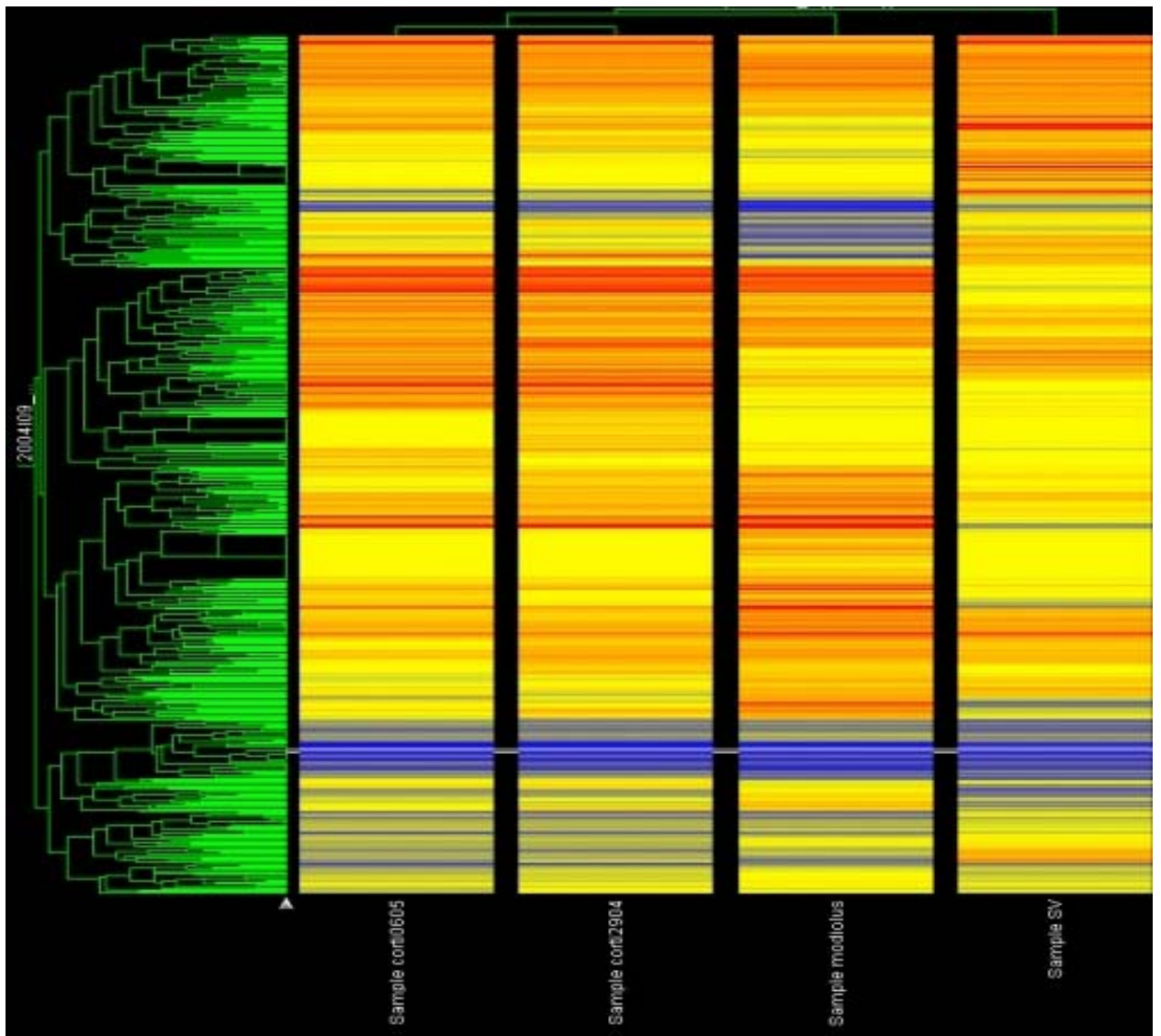


Abb. 29 Ergebnis der Berechnung von hierarchischen Clustern der neugeborenen Ratte in den Regionen Organ Corti, Stria vascularis und Modiolus. Rot = hohe Expression, blau = niedrige Expression, gelb = mittlere Expression.

3.6.2.1. Analyse der Gene mit einer hohen Expression im Organ Corti im Vergleich zu Modiolus und Stria vascularis

Das Ziel dieser Untersuchung war, die spezifische Genexpression in den einzelnen Cochlea-Regionen zu charakterisieren. Um diejenigen Gene zu identifizieren, welche im OC besonders hoch exprimiert werden, wurden die Gene ausgewählt, deren normiertes Signal über der 90. Perzentile lag (Abb. 30).

In die Gruppe Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1) können „*Calmodulin 1*“ (*Calm1*) und „*S100 calcium binding protein A1*“ (*S100a1*) eingeordnet werden. CALM1 ist eine Isoform von Calmodulin, einem Ca^{2+} -bindenden Protein. Bisher sind keine spezifischen Funktionen der drei vorkommenden Isoformen CALM1-3 bekannt (Toutenhoofd und Strehler, 2002). Das Vorkommen von S100a1 ist in den Deiterszellen und im Spiralganglion beschrieben (Coppens et al., 2001). Es kann Ca^{2+} -abhängige und -unabhängige Zielproteine binden (Zimmer et al., 2003). Nach neuesten Erkenntnissen wird S100a1 eine Chaperon Aktivität zugesprochen (Okada et al., 2004).

Wachstums- und Überlebensgene (2): Gene, die im OC dieser Gruppe angehören, sind „*Insulin-like growth factor 2*“ (*Igf2*) und „*Insulin-like growth factor binding protein 2*“ (*Igfbp2*). Weiterhin gehören in diese Gruppe „*Eukaryotic translation elongation factor 2*“ (*Eef2*) und „*Bcl2-associated X protein*“ (*Bax*).

IGF2 spielt während der Entwicklung der Cochlea eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktor (Staecker und Van De Water, 1998; Zheng et al., 1997). IGFBP2 reguliert die Aktivität von IGF1 und IGF2 (Chesik et al., 2004). EEF2 spielt beim Start und bei der Hemmung der Proteinbiosynthese, je nach Phosphorylierungszustand, eine Rolle (Campbell et al., 2005). Damit hat dieses Gen eine Bedeutung für die Regeneration der Zellen nach transienter Ischämie. Von besonderem Interesse ist das zur Bcl-2 Familie gehörende *Bax* (Guo et al., 2003). Dieses Genprodukt ist an der Steuerung der Apoptose während der Entwicklung des Ohres beteiligt (Wang et al., 2001).

Am Intermediärstoffwechsel beteiligte Wachstums- und Überlebensgene sind: „*Creatine kinase, brain*“ (*Ckb*) und „*Enolase 2, gamma*“ (*Eno2*). Die CKB spielt eine zentrale Rolle in der Regeneration von ATP im Gehirn für die Energiebereitstellung (Shen et al., 2003). Spicer und Schulte (1998) konnten immunhistochemisch den Nachweis für CKB im Innenohr erbringen. Die auch als Enolase gamma bezeichnete ENO2 kann ADP zu ATP phosphorylieren und damit ebenfalls Energie bereitstellen (Lehninger et al., 1994).

Im Innenohr ist ihr Vorkommen bereits während der Entwicklung im Spiralganglion und in den Haarzellen beschrieben worden (Dechesne und Pujol, 1986; Whitlon und Sobkowicz, 1988).

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

In die Gruppe der anderen Gene (4) wurden das „*Phosphatidylethanolamine binding Protein*“ (*Pbp*) und der „*Macrophage migration inhibitory factor*“ (*Mif*) eingeordnet. Das PBP-Protein ist Teil der Zellmembran und könnte eine Rolle in der Membranbiogenese spielen (Frayne et al., 1999). Im Innenohr ist *Pbp* bereits beschrieben worden (Maubaret et al., 2002). MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Sekretion von TNF/“Tumor necrosis factor“ alpha erhöht (Shimizu et al., 2003). Eine Beschreibung ist bisher nur im Zusammenhang mit der Otitis media, nicht jedoch mit dem Innenohr erfolgt (Kariya et al., 2003).

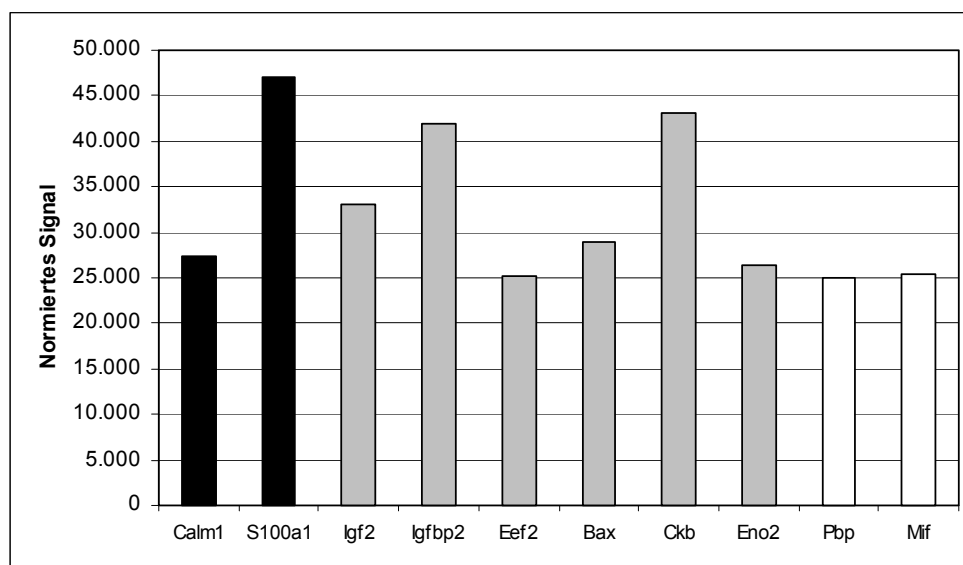


Abb. 30 Gene, die über der 90. Perzentile im Organ Corti exprimiert wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, andere Gene = weiß.

3.6.2.2. Analyse der Gene mit einer mehr als zweimal so hohen Expression im Organ Corti gegenüber Modiolus und Stria vascularis

Von weiterem Interesse für die spezifische Genexpression im OC ist die Expression der Gene, die in allen 3 Regionen exprimiert werden, aber deren Expressionshöhe (normiertes Signal) sich mindestens um den Faktor 2 vom MOD und von der SV unabhängig von der Expressionshöhe unterscheidet (Abb. 31).

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): Zu dieser Gruppe gehören das Ca^{2+} -bindende „*S100 calcium binding protein A1*“ (*S100a1*) und die „ATPase, Ca^{2+} transporting, plasma membrane 2“ (*Atp2b2*), auch als *Pmca2* bekannt. Die PMCA2 ist wichtig für die Signaltransduktion, denn es konnte gezeigt werden, dass Mutationen an ihr zur tauben, ataktischen Maus führen („deafwaddler“). Die PMCA2 ist u. a. lokalisiert in den Haarzellstereozilien der ÄHZ und sorgt in der Endolymphe für den hohen Ca^{2+} -Gradienten (Wood et al., 2004).

Wachstums- und Überlebensgene (2): Das „*Insulin-like growth factor binding protein 3*“ (*Igfbp3*) ist ein Wachstums- und Differenzierungsgen. Seine Funktion beschränkt sich nicht nur auf die Interaktion mit IGF-1 (Chesik et al., 2004) und die Regulierung mitogener und antiapoptotischer Effekte (Butt et al., 2004), sondern es aktiviert im ZNS auch Microglia und übernimmt dadurch neuroprotektive Aufgaben (Chesik et al., 2004).

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Die Gene „*RAB3A, member RAS oncogene family*“ (*Rab3a*) und „*Solute carrier family 1, member 3*“ (*Slc1a3*) spielen eine Rolle in der interzellulären und synaptischen Signaltransduktion und werden im OC niedrig, aber mehr als doppelt so hoch exprimiert wie im MOD und in der SV. RAB3a ist wesentlich verantwortlich für Transport, Andockung, Fusion und scheinbar auch für das Recycling von Vesikeln (Dechesne et al., 1997; Schluter et al., 2004). *Slc1a3* kodiert den Glutamattransporter GLAST (Hagiwara et al., 1996) und ist wichtig für den

Glutamatstoffwechsel. GLAST konnte in den an die IHZ angrenzenden Stützzellen, den Spiralganglien und den suprastrialen Fibrozyten des cochleären Lateralwalls nachgewiesen werden (Jin et al., 2003).

Andere Gene (4): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

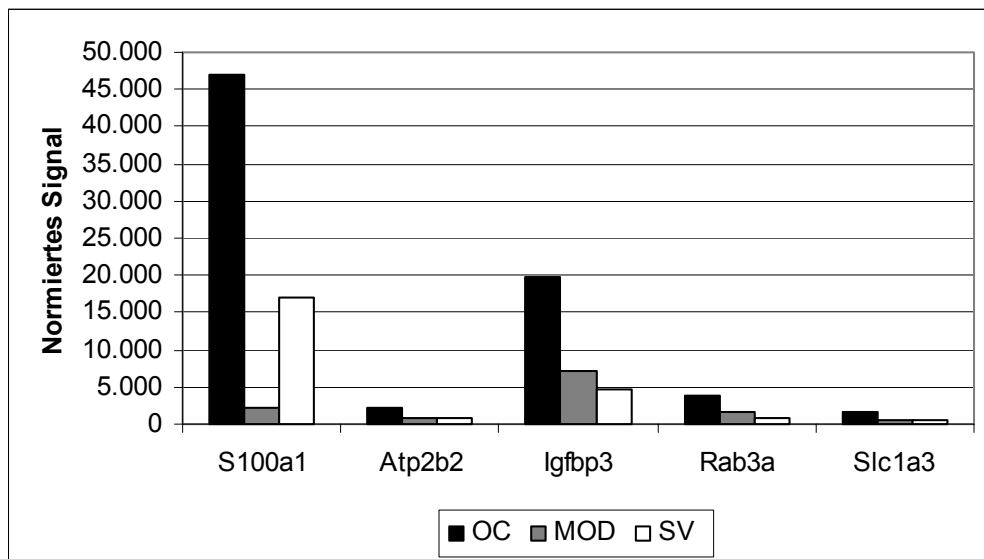


Abb. 31 Gene im Organ Corti (OC), deren normierte Signale mehr als doppelt so hoch exprimiert wurden wie in Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV). Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): *Atp2b2*, *S100a1*, Wachstums- und Überlebensgene (2): *Igfbp3*, Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): *Rab3a*, *Slc1a3*.

3.6.2.3. Analyse der nur im Organ Corti vorkommenden Gene

Es wurden die Gene erfasst, die nur in der Region OC als „present“ ($p < 0,04$) bewertet wurden (Abb. 32).

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): Dieser Gruppe wird „*Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16*“ (*Kcnj16*) zugeordnet. KCNJ16 wird auch als KIR5.1 bezeichnet (Derst et al., 2001) und dient im Innenohr der Kalium-Homeostase (Abraham et al., 1999).

Wachstums- und Überlebensgene (2): Zu dieser Gruppe zählen „*Brain derived neurotrophic factor*“ (*Bdnf*) und „*Neurotrophin-3*“ (*Ntf3*). Ebenfalls dieser Gruppe

zugehörig sind die Gene „*Purkinje cell protein 4*“ (*Pcp4*) und „*Protein kinase C, zeta*“ (*Prkcz*).

BDNF und NTF3 kontrollieren vor allem die Entwicklung der synaptischen Verknüpfung der sensorischen Zellen im Innenohr (Sobkowicz et al., 2002; Stankovic und Corfas, 2003). PCP4 hemmt die Calmodulin gesteuerte Kinase II, welche die Transduktion eines apoptotischen Signals vermittelt (Thomas et al., 2003). Die PRKCZ ist ein wichtiger Regulator für kritische intrazelluläre Signalsysteme (z.B. Mapkinase, Aktivierung des NFkappaB (Hirai und Chida, 2003). Bisher wurde die PRKCZ nur in der SV nachgewiesen (Agrup et al., 1997).

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Gene dieser Gruppe sind: „*Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 9*“ (*Chrna9*), „*Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1*“ (*Gabbr1*), „*Glutamate receptor, ionotropic, 4*“ (*Gria4*) und „*Synaptotagmin 3*“ (*Syt3*). Die Isoform CHRNA9 scheint wesentlich für die Frequenzselektivität und die Steuerung der Sensitivität des Innenohres zu sein (He et al., 2004; Popa et al., 2000). GABBR1 ist ein wichtiger Rezeptor für den inhibitorischen Neurotransmitter GABA (Lamp et al., 2001; Oestreicher et al., 2002). GRIA4 wird auch als GLUR4 bezeichnet und findet sich im unteren Teil der IHZ-Synapsen. Die Expression des Rezeptors ist wichtig für die Neurotransmission von den IHZ zu den afferenten Nervenfasern (Furness und Lawton, 2003). SYT3 scheint wichtig für die Signalübertragung an den synaptischen Endplatten zu sein. Synaptotagmin dient sowohl der Endo-, als auch der Exozytose von Vesikeln (Kee und Scheller, 1996; Safieddine und Wenthold, 1999; Schwarz, 2004).

Andere Gene (4): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

Insgesamt zeigt sich, dass im OC Gene vorherrschen, die für neurosensorische Zellen charakteristisch und bedeutungsvoll sind.

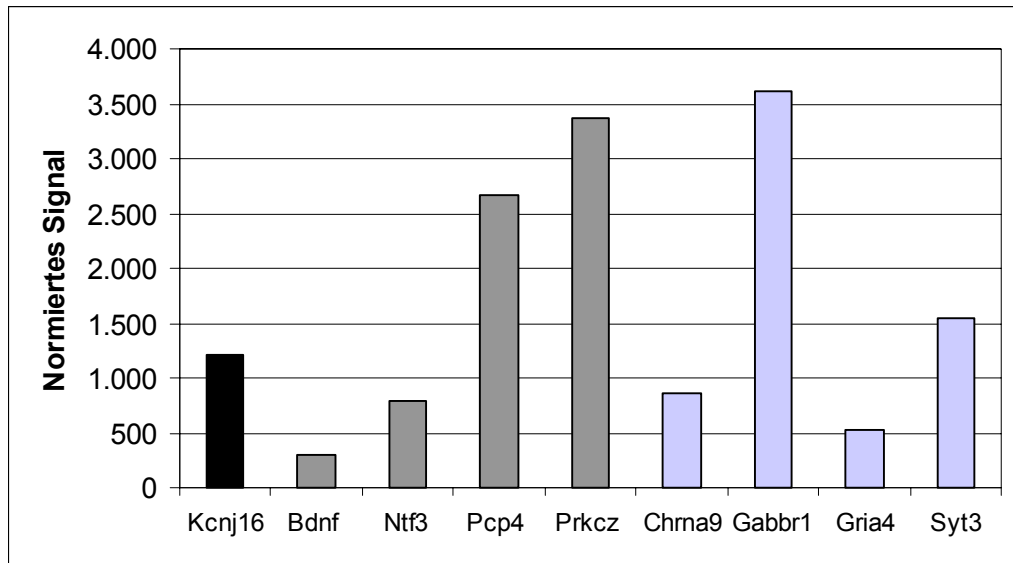


Abb. 32 Gene, die nur im Organ Corti als „present“ bewertet wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellblau.

3.6.2.4. Analyse der Gene mit einer hohen Expression im Modiolus im Vergleich zu Organ Corti und Stria vascularis

In Abb. 33 werden die Gene des Modiolus dargestellt, die hoch exprimiert werden, d. h. deren normierte Signale ebenfalls über der 90. Perzentile liegen. Im Unterschied zum OC und SV wurden im MOD nur Gene der Gruppe „Wachstum und Überleben“ gefunden.

Wachstums- und Überlebensgene (2): In diese Gruppe gehören: „*Insulin-like growth factor 2*“ (*Igf2*), „*Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1*“ (*Cnp1*), „*Early growth response 1*“ (*Egr1*), „*Myelin basic protein*“ (*Mbp*), „*Myelin Protein Zero*“ (*Mpz*), „*Platelet-derived growth factor, alpha*“ (*Pdgfa*), „*PDGF associated protein 1*“ (*Pdap1*), „*Eukaryotic translation elongation factor 2*“ (*Eef2*) sowie „*Rho interacting protein 3*“ (*Rhoip3*), „*Bcl2-associated X protein*“ (*Bax*), „*Prion protein*“ (*Prnp*) und „*Creatine Kinase, brain*“ (*Ckb*).

Der Wachstumsfaktor IGF2 wird ebenfalls, wie schon im OC beschrieben, über der 90. Perzentile exprimiert. Bei dem Gen *Cnp* werden 2 Isoformen, CNP1 und CNP2, unterschieden. Sie spielen eine Rolle in der Axongenese (Gravel et al., 2000). EGR1 (auch als NGFI-A bekannt) besitzt eine Nervenwachstumspotenz in der späten Pränatal- und

frühen Postnatal-Periode (Snyder-Keller et al., 2002). Das Vorkommen von EGR1 ist in verschiedenen Regionen der Cochlea bereits beschrieben worden (Cho et al., 2004). MBP und MPZ sind wesentlich für die Myelinbildung und damit für die Nervenleitung verantwortlich (Knipper et al., 1998). Für die Differenzierung von Neuronen aus Stammzellen im ZNS spielt PDGFA eine dominierende Rolle (Erlandsson et al., 2001). Da PDGFA in der Otocyste am 12.-14. pränatalen Tag besonders hoch exprimiert wird, scheint es eine bedeutende Rolle bei der Proliferation von Haarzellen in der Cochlea zu besitzen (Lee et al., 2004). PDAP1 moduliert die Aktivität von PDGFA (Fischer und Schubert, 1996). Das Vorkommen von *Pdap1* ist bisher im Innenohr nicht beschrieben worden. Das auf die Proteinbiosynthese Einfluss nehmende EEF2 wird ebenfalls, wie bereits im OC beschrieben, hoch exprimiert. RHOIP3 (auch RIP3 genannt) ist ein nukleozytoplasmatisches Enzym. Es ist eine wesentliche Komponente des TNF-1 Rezeptors. Das N-terminale Ende ist der Ansatzpunkt für Kinasen. Anders hingegen das C-terminale Ende, das Bedeutung für die Caspase-Aktivierung hat und damit an der Apoptose-Induktion beteiligt ist (Yang et al., 2004). Das Vorkommen im Innenohr ist bisher nicht beschrieben. Das die Apoptose steuernde BAX wird ebenfalls, wie bereits im OC beschrieben, hoch exprimiert. PRNP ist bisher nicht im Zusammenhang mit dem Innenohr erwähnt worden; es verhindert Fehlfaltungen der DNS und scheint in den oxidativen Stress involviert zu sein. Eine weitere wichtige Funktion ist die Hemmung der durch BAX induzierte Apoptose (Nishimura et al., 2004). Die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, die häufig mit frühzeitigem Hörverlust als erstes Krankheitssymptom auftritt, steht in Verbindung mit Störungen des PRNP (Krishna und Bauer, 2004). Die bereits beim OC beschriebene und hoch exprimierte „*Creatine kinase, brain*“ (*Ckb*), die den ATP-Pumpen Energie liefert, wird im MOD ebenfalls hoch exprimiert.

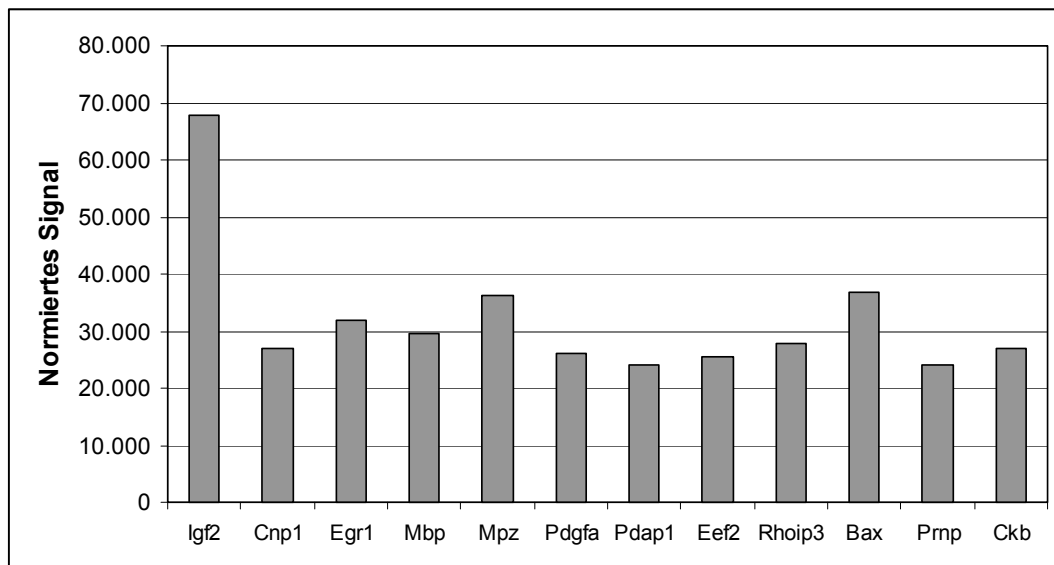


Abb. 33 Gene, die über der 90. Perzentile im Modiolus exprimiert wurden. Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau.

3.6.2.5. Analyse der Gene mit einer mehr als zweimal so hohen Expression im Modiolus gegenüber Organ Corti und Stria vascularis

Gene, die im MOD mindestens doppelt so hoch exprimiert werden wie im OC und der SV, sind in Abb. 34 dargestellt.

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

Wachstums- und Überlebensgene (2): Die in dieser Auswahl exprimierten Gene sind: „Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1“ (*Cnp1*), „Early growth response 1“ (*Egr1*), „Insulin-like growth factor 2“ (*Igf2*), „Myelin-associated glycoprotein“ (*Mag*), „Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1“ (*Nr4a1*) und „Proteolipid Protein“ (*Plp*). Weiterhin werden dieser Gruppe zugeordnet: „Mitogen-activated protein kinase 9“ (*Mapk9*), „Prion protein“ (*Prnp*), „Vascular cell adhesion molecule 1“ (*Vcam1*) und „Cathepsin K“ (*Ctsk*).

Das der Axongenese dienende CNP1, der eine Nervenwachstumspotenz besitzende EGR1 und der Wachstumsfaktor IGF2 wurden bereits beschrieben. MAG wurde u. a. in retinalen Ganglien nachgewiesen; es werden inhibierende Funktionen auf das Auswachsen

von Neuriten angenommen (Wong et al., 2003). Das für die Myelinisierung wichtige Strukturmolekül PLP (Knipper et al., 1998) und der in der Entwicklungsphase wichtige Wachstumsfaktor NR4a1 werden im MOD mindestens 2fach höher als im OC, und im OC mindestens doppelt so hoch exprimiert wie in der SV (MOD > OC > SV). MAPK9 wird Bedeutung für den Haarzelltod mit permanentem Haarzellverlust durch Noxen und akustische Traumata zugesprochen (Wang et al., 2003). Das Fehlfaltungen der DNS verhindernde PRNP wird im MOD sehr stark exprimiert und ist bereits bei den hoch exprimierten Genen des MOD beschrieben. Die Expression von *Prnp* ist außerdem im OC deutlich höher als in der SV (MOD > OC > SV). Das VCAM1 gehört zur Familie der Immunglobuline und ist für die Immunantwort im Innenohr wichtig. Über Fibrozyten des Spiralligaments hat VCAM1 Einfluss auf die Ionenhomeostase in der Cochlea (Ichimiya et al., 2003). Es wird im MOD in der Spiralvene beschrieben (Zhang et al., 2000). CTSK wird primär nur in Osteoklasten exprimiert (Lindeman et al., 2004). Beschrieben ist es auch beim Cholesteatom und bei der Otitis media (Hansen et al., 2001). Im Zusammenhang mit dem Innenohr wurde es bisher nicht erwähnt.

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): In diese Gruppe gehören „Synuclein, alpha“ (*Snca*) und „Endothelin receptor B“ (*Ednrb*). *Snca* ist an der Entstehung von synaptischen Vesikeln beteiligt (Sidhu et al., 2004). *Snca* wird im MOD deutlich höher exprimiert als im OC, und dort wiederum deutlich höher als in der SV (MOD > OC > SV). *Ednrb* ist ein intrazelluläres Signaltransduktion-Gen zur Regulation des Gefäßtonus. Mutationen des *Ednrb* können zum Wardenberg-Syndrom Typ IV, das mit Hörverlust und Pigmentveränderungen der Haut, Haare und Iris einhergeht, führen (Read und Newton, 1997). In der Arteria spiralis konnte nur der Endothelin Rezeptor Typ A nachgewiesen werden (Scherer et al., 2001). *Ednrb* war im MOD deutlich höher als im OC und dort deutlich höher als in der SV (MOD > OC > SV) exprimiert.

Andere Gene (4): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

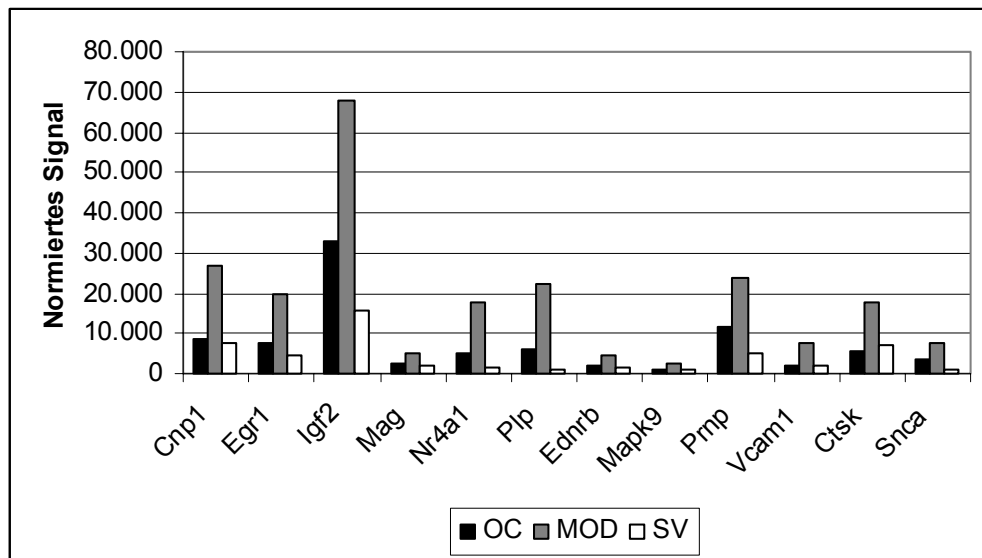


Abb. 34 Gene, die im Modiolus mindestens doppelt so hoch exprimiert wurden wie im Organ Corti und der Stria vascularis.

Wachstums- und Überlebensgene (2): *Cnp1*, *Egr1*, *Igf2*, *Mag*, *Nr4a1*, *Plp*, *Mapk9*, *Prnp*, *Vcam1*, *Ctsk*,

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): *Snca*, *Ednrb*.

3.6.2.6. Analyse der nur im Modiolus vorkommenden Gene

In diesem Abschnitt werden diejenigen Gene beschrieben, die nur im MOD exprimiert wurden (Abb. 35).

Ionenkanäle Ionenhomeostase regulierende Gene (1): Es wurden keine Gene dieser Gruppe zugeordnet.

Wachstums- und Überlebensgene (2): Gene, die dieser Gruppe zugeordnet werden, sind „*Neurofibromatosis 1*“ (*Nf1*), „*VGF nerve growth factor inducible*“ (*Vgf*) sowie „*Thyroid hormone receptor alpha*“ (*Thra*). Zu dieser Gruppe zählen weiterhin „*Chemokine (C-C motif) ligand 2*“ (*Ccl2*) und „*Sulfotransferase family 2A, member 2 (predicted)*“ (*Sult2a2 predicted*).

Mutationen von *Nf1* können neben einem Hörverlust (Poissant et al., 2003) auch zu Astrozytenteoplasien führen (Arun und Gutmann, 2004; Dasgupta et al., 2003). Das neuromodulatorisch wirkende VGF (Levi et al., 2004; Salton et al., 2000) wurde bisher

nicht im Innenohr beschrieben. Das Gen *Thra* wird in Verbindung mit der Entwicklung der Cochlea gebracht (Knipper et al., 1999; Knipper et al., 2000; Rusch et al., 2001). CCL2 verzögert die retrograde neuronale Degeneration in Neuronen und ist involviert in die Aktivierung von Microglia (Muessel et al., 2002). Es erfolgte bisher keine Beschreibung im Innenohr. Bei dem Gen *Sult2A2 predicted* ist zu vermuten, dass es ähnlich wie „*Sulfotransferase family, cytosolic, 2A*“ (*Sult2A1*) wirkt. SULT2A1 dient der Biotransformation von Verbindungen, z. B. Steroiden und Cholesterin (Saner et al., 2005; Shiraga et al., 1999). Die Expression wurde im Innenohr bisher nicht erwähnt.

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Im MOD werden die Gene „*Cholinergic receptor, nicotinic, alpha, polypeptide 7*“ (*Chrna7*), „*Dopamine receptor 1A*“ (*Drd1a*) und das „*GABA Transporter protein*“ (*Gabt1*) exprimiert. CHRNA7 wird auch als NACHRA7 bezeichnet und ist in den Ganglien im MOD beschrieben worden (Popa et al., 2000). Der Rezeptor dient der synaptischen Signaltransduktion (Severance et al., 2004). Das Vorkommen des Neurotransmitters Dopamin an der inneren Haarzellsynapse ist beschrieben worden, aber die Expression des *Drd1a* wurde bisher nicht im Zusammenhang mit dem Innenohr erwähnt (Drago et al., 1994; Karadaghy et al., 1997). *Gabt1* kodiert für den GABA Transporter, der auch als *SLC6a1* oder *GATI* bezeichnet wird. Er reguliert die inhibitorischen GABA-Ströme in Stärke und Länge (Zeit) in der Synapse (Yamanaka et al., 2000). GABT1 hat eine modulatorische Funktion auf die glutaminerge Neurotransmission der IHZ (Oestreicher et al., 2002).

Andere Gene (4): In diese Auswahl haben wir eingeordnet das „*Glia fibrillary acidic protein*“ (*Gfap*). Das entsprechende Protein ist ein hauptsächlich in Gliazellen exprimiertes Intermediärfilament, das bemerkenswerter Weise hoch exprimiert in den Stützzellen der Cochlea gefunden wurde (Rio et al., 2002).

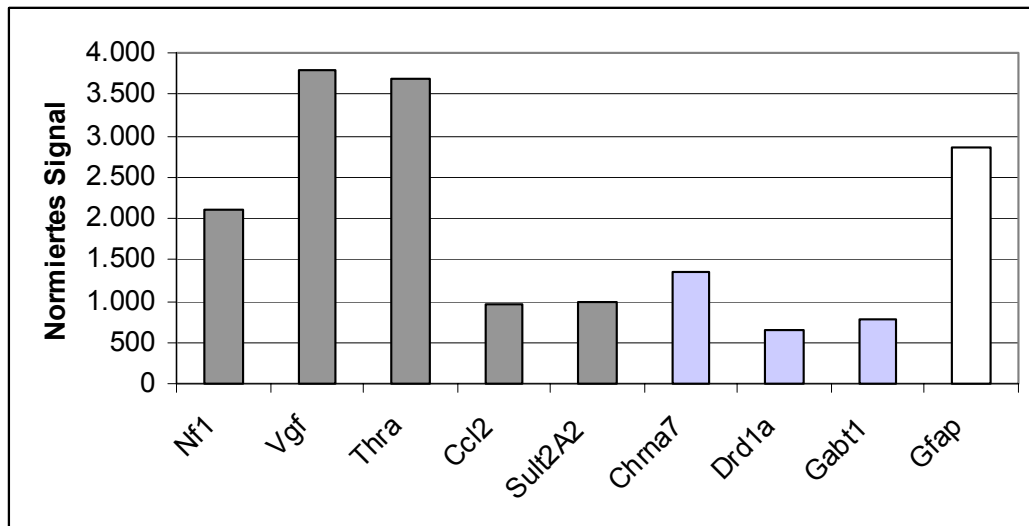


Abb. 35 Gene, die nur im Modiolus exprimiert wurden. Wachstums- und Überlebenssgene = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellblau, andere Gene = weiß.

3.6.2.7. Analyse der Gene mit einer hohen Expression in der Stria vascularis im Vergleich zu Organ Corti und Modiolus

Die Abb. 36 zeigt die in der SV über der 90. Perzentile hoch exprimierten Gene.

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): In dieser Gruppe werden die „ATPase, Na^+K^+ transporting, alpha 1 polypeptide“ (*Atp1a1*) und der „Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1“ (*Kcne1*) nachgewiesen. ATPasen und K^+ -Kanäle spielen in der SV besonders für die endolymphatische Homeostase eine entscheidende Rolle. Die alpha1 Untereinheit (ATP1a1) der ATPasen in nichtsensorischen Zellen sind für den K^+ -Transport (Peters et al., 2001) und KCNE1 für die K^+ -Rückgewinnung wichtig (Hibino et al., 2004; Melman et al., 2004).

Wachstums- und Überlebensgene (2): Zu dieser Gruppe zählen: „Insulin-like growth factor 1“ (*Igf1*), „Insulin-like growth factor binding protein 2“ (*Igfbp2*), „Neuronatin“ (*Nnat*) und „Phosphatidylethanolamine binding protein“ (*Pbp*). Weiterhin zählen zu dieser Gruppe der „Macrophage migration inhibitory factor“ (*Mif*) und die „Superoxide dismutase 3“ (*Sod3*).

IGF1 (= Somatomedin C) wirkt in Microglia neuroprotektiv. IGF1-Verlust ist assoziiert mit Apoptose der auditiven Neurone und sehr hohen Caspase-3-Aktivitäten. Homozygoter Verlust von IGF1 führt zur sensorineuralen Taubheit (Varela-Nieto et al., 2004). Das die Aktivität von IGF1 und IGF2 regulierende IGFBP2 und das möglicherweise eine Rolle in der Zellmembranbiogenese spielende PBP werden auch im OC hoch exprimiert. NNAT wird besonders während der Entwicklung im Innenohr exprimiert (Wijnholds et al., 1995) und ist an der Differenzierung von Neuronen beteiligt (Kikyo et al., 1997). Der die Sekretion von TNF alpha erhöhende MIF wird im OC ebenfalls sehr hoch exprimiert. Die SOD3 ist eine extrazelluläre Kupfer/Zink-Dismutase (Son et al., 2003), die in der Lymphe, im Plasma und in der Synovial-Flüssigkeit vorkommt. Sie spielt eine wichtige Rolle im NO-Stoffwechsel (Skrzycki und Cieczot, 2004). Die Abnahme der SOD3-Aktivität und damit die Reduzierung des antioxidativen Status könnte eine Ursache für die Altersschwerhörigkeit sein (Pickles, 2004).

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Betrachtet man die Gene dieser Gruppe, so fällt nur die „*Glutamine synthetase 1*“ (*Glul*) auf. Die GLUL findet sich im Zytoplasma (Gomez-Maldonado et al., 2004) und katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat und NH_3 unter Energie (ATP)-Verbrauch. Da Glutamat in hohen Konzentrationen toxisch wirkt, kann der Abbau durch die GLUL neuroprotektiv wirken (Kanai und Hediger, 2004). Glutamat ist der wesentliche afferente Neurotransmitter im Innenohr (Nordang et al., 2000). In der SV wurde das Vorkommen der GLUL bisher nicht beschrieben.

Andere Gene (4): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

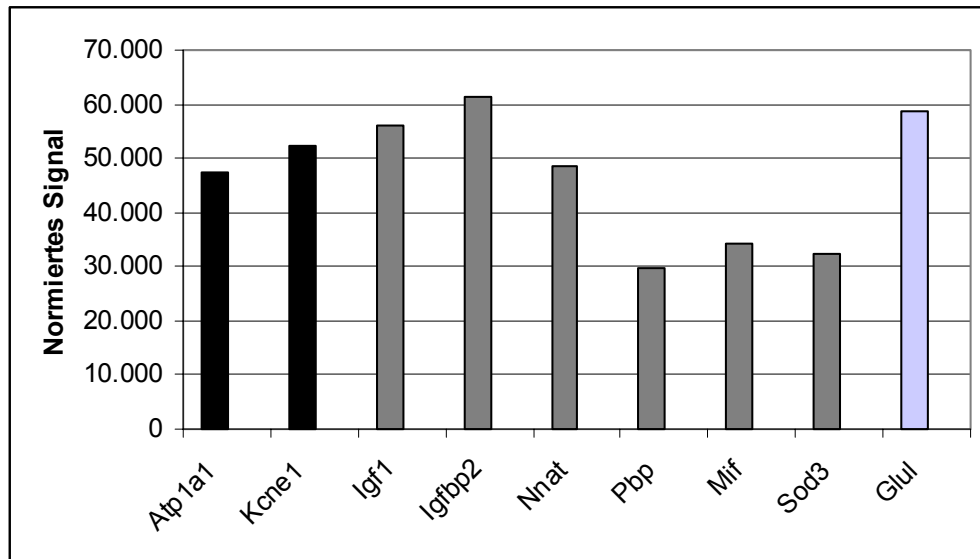


Abb. 36 Gene, die in der Stria vascularis hoch exprimiert wurden. Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebensgene = dunkelgrau, Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellblau.

3.6.2.8. Analyse der Gene mit einer mehr als zweimal so hohen Expression in der Stria vascularis gegenüber Organ Corti und Modiolus

In Abb. 37 sind die Gene, die in der SV mehr als doppelt so hohe normierte Hybridisierungssignale zeigen wie im OC und MOD, dargestellt.

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): Zu dieser Gruppe zählen: „ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1“ (*Atp1a1*), „ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 2 polypeptide“ (*Atp1b2*) und „ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 3 polypeptide“ (*Atp1b3*). *Atp1a1* wird in der SV hoch und im OC deutlich höher als im MOD exprimiert (SV > OC > MOD). ATP1b2 und ATP1b3 bezeichnen die beta Untereinheiten 2 und 3 der ATPasen. In Übereinstimmung mit der Literatur (Wangemann, 2002) ist eine Kombination von alpha 1 und beta 2 Untereinheiten für die SV typisch. Beta 3 wurde bisher nur in bipolaren Neuronen beschrieben.

Wachstums- und Überlebensgene (2): In diese Gruppe gehören: „Apolipoprotein E“ (*ApoE*), „Fibroblast growth factor receptor 1“ (*Fgfr1*), „Fibroblast growth factor receptor 4“ (*Fgfr4*), „Insulin-like growth factor 1“ (*Igf1*), „Insulin-like growth factor binding

protein 2“ (*Igfbp2*), „*Neuronatin*“ (*Nnat*), „*POU domain, class 3, transcription factor 4*“ (*Pou3f4*), „*Serpine 2*“ (*Ser2*), „*Superoxide dismutase 3*“ (*Sod3*) und „*Transferrin*“ (*Tf*).

APOE ist ein Lipidtransporter und spielt eine wesentliche Rolle im Zellstoffwechsel und während der Entwicklung der Zelle (Aarnisalo et al., 2000). ApoE-Knockout Mäuse entwickeln einen Hörverlust mit zunehmendem Alter (Guo et al., 2005). *Fgfr1* ist wesentlich für die Bildung der auditiven Stütz- und Haarzellen, die sich aus gemeinsamen Vorläuferzellen differenzieren (Pirvola et al., 2002). Aus der Analyse von Mausmutanten ist bekannt, dass verschiedene *Fgf* und *Fgfr* eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung während der Gehirn- und Ohrentwicklung spielen (Carnicero et al., 2004; Miyake und Itoh, 1996). *Fgfr4* wurde bisher direkt in Geweben, die für die Innenohrentwicklung relevant sind, nachgewiesen (Wright et al., 2003). Er wurde zusätzlich im OC deutlich höher exprimiert als im MOD (SV > OC > MOD). Der Wachstumsfaktor IGF1 und sein Regulator IGFBP2 wurden schon vorangehend beschrieben. Das an der Differenzierung von Neuronen beteiligte NNAT (Neuronatin) ist in der SV zugleich über der 90. Perzentile exprimiert. Mutationen von *Pou3f4* können zur sensorineuralen Taubheit führen. *Pou3f4* wird auch als *Brn4* bezeichnet (Phippard et al., 1999). SER 2 hemmt Thrombin, Plasmin und den Plasminogenaktivator und wird auch im OC deutlich höher exprimiert als im MOD. Im Innenohr ist *Ser2* nicht beschrieben worden. Die extrazelluläre Kupfer/Zink-Dismutase SOD3 wurde bereits beschrieben. Das Vorkommen von TF ist in der Perilymphe beschrieben. Es bindet und transportiert Eisen. In dieser Funktion schützt es vor der Bildung von freien Radikalen (Buchman et al., 1999; Rauch, 2000; van Rensburg et al., 2004).

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Zu dieser Gruppe gehört die Glutamat abbauende *Glut*. Sie wurde bereits vorangehend beschrieben.

Andere Gene (4): Dieser Gruppe konnten keine Gene zugeordnet werden.

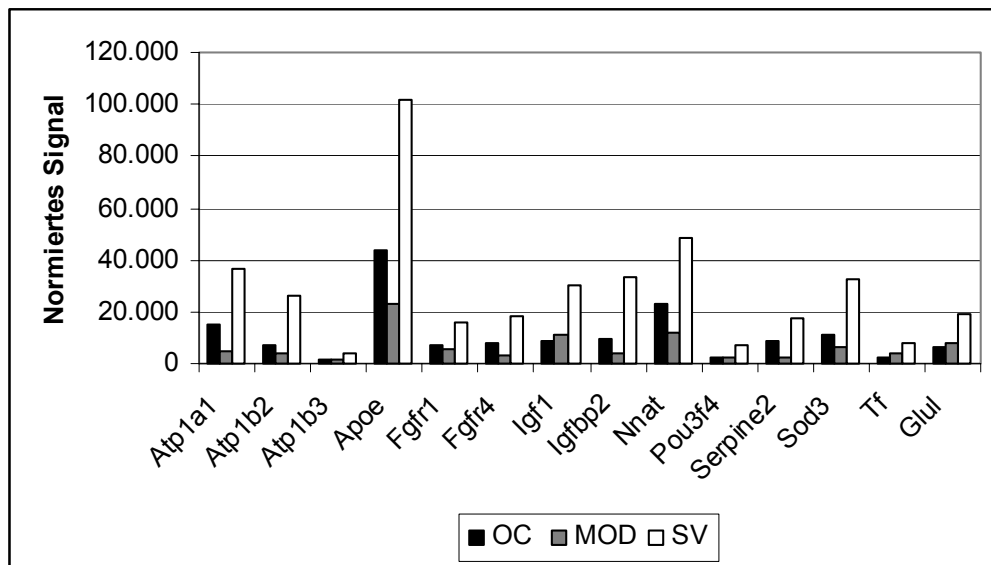


Abb. 37 Gene, die in der Stria vascularis signifikant höher exprimiert wurden als im Organ Corti und im Modiolus.

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): *Atp1a1*, *Atp1b2*, *Atp1b3*,
 Wachstums- und Überlebensgene (2): *Apoe*, *Fgfr1*, *Fgfr4*, *Igf1*, *Igfbp2*, *Nnat*, *Pou3f4*,
Serpine2, *Sod3*, *Tf*,
 Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): *Glul*.

3.6.2.9. Analyse der nur in der Stria vascularis vorkommenden Gene

Gene, die in der SV exprimiert werden, nicht jedoch im OC oder im MOD, sind in Abb. 38 dargestellt.

Ionenkanäle und Ionenhomeostase regulierende Gene (1): In dieser Gruppe werden die Ca^{2+} -Kanäle „*Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1E subunit*“ (*Cacna1e*) und der „*Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit*“ (*Cacnb2*) nachgewiesen. Weiterhin zeigt sich eine sehr starke Expression des „*Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1*“ (*Kcne1*). Die KCNE1-Expression hat eine entscheidende Bedeutung in der SV für die Zusammensetzung der Endolymphe (Hibino et al., 2004). CACNA1e und CACNB2 sind alpha und beta Untereinheiten von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen. Beide regulieren das intrazelluläre Ruhemembranpotential der Zellen. CACNA1e und CACNB2 sind an der schnellen synaptischen Signaltransduktion beteiligt (Waka et al., 2003). Ihr Vorkommen ist bisher nicht in der SV beschrieben worden.

CACN1e wurde bereits im Spiral-Bündel und in efferenten Fasern nachgewiesen (Waka et al., 2003).

Wachstums- und Überlebensgene (2): Dieser Gruppe gehören an: „*Transforming growth factor, beta 1*“ (*Tgfb1*), „*Fasciculation and elongation protein zeta 2*“ (*Fez2*) und „*Arrestin, beta 2*“ (*Arrb2*) und. Weiterhin gehören zu dieser Gruppe wichtige Gene wie, „*Heme oxygenase 1*“ (*Hmox1*), „*Intercellular adhesion molecule 1*“ (*Icam1*) und „*Nitric oxide synthase 2, inducible*“ (*Nos2*).

In Spiralganglienzellkulturen konnte gezeigt werden, dass TGFB1 neben anderen Wachstumsfaktoren eine protektive Wirkung auf Neuronalzellen nach einem Trauma hat (Lefebvre et al., 1992). In einer anderen Arbeit wurde ein protektiver Effekt von TGFB1 zusammen mit GDNF auf die Haarzellen und das Hören nach ototoxischem Trauma beschrieben (Kawamoto et al., 2003). Das bisher im Innenohr nicht beschriebene FEZ2 ist homolog zu FEZ1 (Fujita et al., 2004), welches in die Modulation der neuronalen Zytoskelettproteine während der neuronalen Entwicklung involviert ist (Whitehouse et al., 2002). ARRB2 ist ein Regulator der G-Protein gesteuerten Rezeptoren, das an das aktivierte G-Protein bindet und dieses desensibilisiert (Wei et al., 2004). Es ist auch in die Immunantwort, z. B. bei Apoptose eingebunden (Gao et al., 2004). Die HMOX1 ist eines von 3 Isoformen, die den Abbau von Häm katalysieren. Sie schützt vor oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen (Kubulus et al., 2004; Watanabe et al., 2003b). ICAM1 wird mit einer wichtigen Rolle bei antigeninduzierten Innenohrerkrankungen in Verbindung gebracht (Pawankar et al., 1998). NOS2 wird auch als iNOS bezeichnet und ist eine von 3 Isoformen (endotheliale, neuronale, induktive). Die in Endothelzellen induzierte NOS2 setzt NO frei (Brannan und Roberts, 2004). In den Kapillaren werden die Durchblutung und die vaskuläre Permeabilität durch NO geregelt. Des Weiteren kann NO die mitochondriale Atmung und somit die Entstehung von freien Radikalen hemmen. In der

SV konnte unter Stressbedingungen (Lärm) ein Anstieg der NO-Konzentration mit einhergehendem Hörverlust nachgewiesen werden (Shi und Nuttall, 2003).

Interzelluläre und synaptische Signaltransduktion (3): Zu dieser Gruppe zählen die bisher im Innenohr nicht erwähnten Gene: „*Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2*“ (*Slc1a2*) und „*Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3*“ (*Slc6a3*). SLC1a2 ist ein Glutamattransporter und wird auch als GLUT1 bezeichnet (Kanai und Hediger, 2003). *Slc6a3* codiert für den Dopamintransporter DAT1.

Andere Gene (4): Diesen Gruppen konnten keine Gene zugeordnet werden.

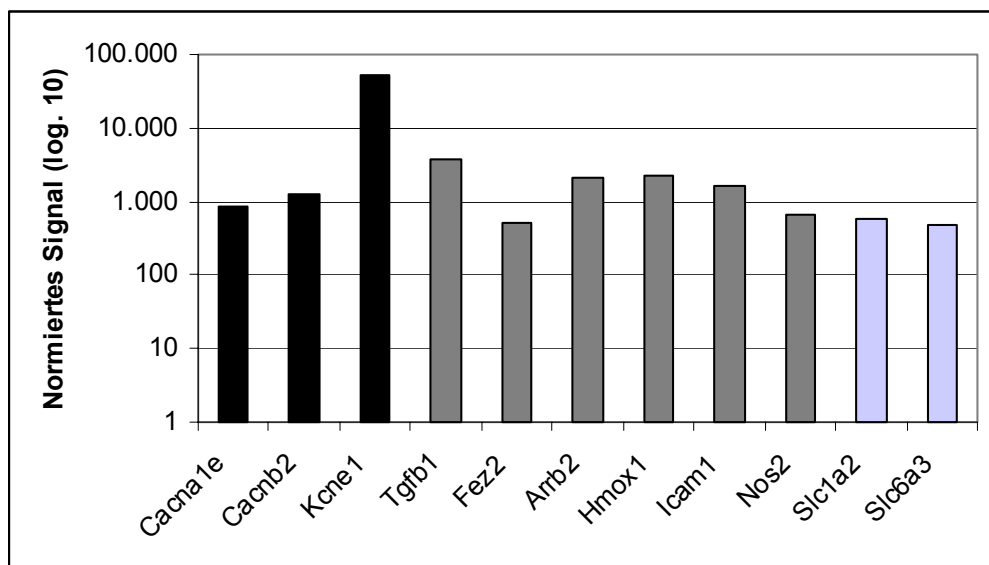


Abb. 38 Gene, die nur in der Stria vascularis exprimiert wurden. Ionenkanäle Ionenhomeostase regulierende Gene = schwarz, Wachstums- und Überlebenssgene = dunkelgrau, interzelluläre und synaptische Signaltransduktion = hellblau.

Zusammenfassend ergibt sich, dass 7-10% der auf dem Chip als „present“ bewerteten Gene regionspezifisch exprimiert werden (Tabelle 7).

Tabelle 7 Differentielle Genexpression in den Regionen Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV).

	OC	MOD	SV
Gene die als „present“ klassifiziert wurden (1323 Gene auf dem Chip)	321	370	267
Regionsspezifische Gene:			
> 90. Perzentile	10	12	9
> Faktor 2	4	10	8
Nur in der Region	9	9	11
Summe	23	31	28
Prozent	7,2	8,4	10,5

3.6.3. HIF-1 alpha mRNA

Da HIF-1 alpha ein wichtiger Regulator der Anpassungsprozesse an Hypoxie ist, ist die Analyse von HIF-1 alpha mRNA von besonderer Bedeutung. Die Analyse von HIF-1 alpha mRNA stützt sich auf die Microarray-Untersuchungen der Probe P1 und auf Untersuchungen mittels RT-PCR. Tabelle 8 stellt den mRNA-Gehalt in Form der normierten Signale (Microarray) und als quantitativer Wert in pg/ μ g nach RT-PCR dar. Es ist zu erkennen, dass die regionale Spezifik der Muster der HIF-1 alpha mRNA mit beiden Methoden annähernd gleich ist. In Normoxie war der HIF-1 alpha mRNA-Gehalt bei den Microarray-Untersuchungen in der SV etwas höher als im OC (1,7fach) und im MOD (3fach). Bei den Ergebnissen mittels RT-PCR war die höchste HIF-1 alpha-Expression im OC und SV. Im MOD war die Expression um den Faktor 2-3 geringer. Die Normierung auf die Expression des MOD (= 1,0) zeigt ein gleichartiges Muster der Microarray-Daten und der quantitativen RT-PCR in Normoxie. Die quantitative RT-PCR ist zugleich als Bestätigungsdiagnostik für die Microarray-Untersuchung anzusehen.

Der HIF-1 alpha mRNA-Gehalt änderte sich unter Hypoxie in den 3 cochleären Bereichen nicht.

Tabelle 8 HIF-1 alpha mRNA-Expression in Organ Corti (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) in Normoxie. Gegenübergestellt sind die Microarray-Daten (normierte Signale) und die Werte der quantitativen RT-PCR.

Region	OC	MOD	SV
Normierte Signale Normoxie	2450 (1,8)	1399 (1,0)	4236 (3,0)
mRNA (pg/μg) Normoxie	3,2 (2,5)	1,3 (1,0)	2,7 (2,1)
mRNA (pg/μg) Hypoxie	3,1 (2,4)	1,3 (1,0)	2,9 (2,2)

in Klammern bezogen auf MOD-Expression

3.6.4. Charakterisierung der Genexpression unter besonderer Berücksichtigung HIF-1-abhängiger Gene

Unter dem Aspekt des unterschiedlichen HIF-1 alpha mRNA-Gehaltes und der unterschiedlichen HIF-1-Aktivierung in den Regionen der Cochlea haben wir im Folgenden das Expressionsmuster der HIF-1-abhängigen Gene analysiert. Die Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die HIF-1-abhängigen Gene, die auf dem RN U34-Chip enthalten sind. Für den Eisentransport sind „*Transferrin*“ (*Tf*) und der „*Transferrin receptor*“ (*Tfrc*) von Bedeutung. In die Gruppe der Gene, die den Glukose-Transport und die Glykolyse beeinflussen, gehören „*Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1*“ (*Slc2a1*), „*carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 3*“ (*Slc2a3*) und „*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*“ (*Gapdh*). Für das Zellwachstum und -überleben sind auf dem Chip die Gene „*Insulin-like growth factor II*“ (*Igf2*), „*Insulin-like growth factor binding protein1*“ (*Igfbp1*), „*Insulin-like growth factor binding protein2*“ (*Igfbp2*), „*Insulin-like growth factor binding protein3*“ (*Igfbp3*), „*Platelet-derived growth factor, alpha*“ (*Pdgfa*) und „*Platelet-derived growth factor, B polypeptide*“ (*Pdgfb*) vertreten. In die Gruppe der die Angiogenese beeinflussenden Gene gehören „*Transforming growth factor, beta 2*“ (*Tgfb2*), „*Vascular endothelial growth factor B*“

(*Vegfb*) und „*Vascular cell adhesion molecule 1*“ (*Vcam1*). Für die Kontrolle des Vasotonus sind die Gene „*Nitric oxide synthase 2*“ (*Nos2*), „*Endothelin-1*“ (*Et-1*) und „*Heme oxygenase-1*“ (*Hmox1*) bedeutend.

Tabelle 9 HIF-1-abhängige Zielgene, die auf dem RN U34-Chip enthalten sind.

Endothelin-1 (<i>Et-1</i>)
Heme oxygenase-1 (<i>Hmox1</i>)
Enolase 2, gamma (<i>Eno2</i>)
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (<i>Slc2a1</i>)
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (<i>Slc2a3</i>)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)
Hexokinase 1 (<i>Hk1</i>)
Insulin-like growth factor binding protein 1 (<i>Igfbp1</i>)
Insulin-like growth factor binding protein 2 (<i>Igfbp2</i>)
Insulin-like growth factor binding protein 3 (<i>Igfbp3</i>)
Insulin-like growth factor II (<i>Igf2</i>)
Nitric oxide synthase 2, inducible (<i>Nos2</i>)
Platelet-derived growth factor, alpha (<i>Pdgfa</i>)
Platelet-derived growth factor, B polypeptide (<i>Pdgfb</i>)
Transformin growth factor, beta3 (<i>Tgfb3</i>)
Transferrin (<i>Tf</i>)
Transferrin receptor (<i>Tfrc</i>)
Vascular cell adhesion molecule 1 (<i>Vcam1</i>)
Vascular endothelial growth factor B (<i>Vegfb</i>)

Der eingesetzte RN U34-Chip enthält insgesamt 19 HIF-1-abhängige Gene, wovon neun Gene in allen Regionen und fünf Gene nur in der SV eine statistisch signifikante Expression zeigten. Fünf Gene („*Endothelin-1*“, „*Enolase 2, gamma*“, „*Hexokinase 1*“, „*Insulin-like growth factor binding protein 1*“, „*Platelet-derived growth factor, B polypeptide*“) zeigten keine statistisch signifikante Expression und wurden daher nicht in die weitere Auswertung aufgenommen. Abb. 39 zeigt die Expression der Gene der

Normoxiegruppe (S1), eingeteilt nach ihrer Funktion: Glukosestoffwechsel, Wachstum und Differenzierung sowie Redoxstoffwechsel. Die mRNA-Expression dieser Gene war regional sehr unterschiedlich. Die *Gadph* („*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*“), ein Glykolyse-Enzym und typischer Vertreter der „housekeeping“ Gene, war in allen Regionen am höchsten nachweisbar. Hoch exprimiert waren ferner Gene, die im Zusammenhang mit dem Glukosetransport (*Slc2a1* / „*Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1*“) und der Regulation des Wachstumsfaktors IGF („*Insulin-like growth factor*“) (*Igfbp2* / „*Insulin-like growth factor binding protein 2*“, *Igfbp3* / „*Insulin-like growth factor binding protein 3*“) stehen. Während die Isoform *Slc2a1* des Glukosetransporters hoch exprimiert war, zeigte die Isoform *Slc2a3* („*Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3*“) als neuronaler Glukosetransporter eine deutlich niedrigere Expression. Die Expression der Isoform *Igfbp2* war in der SV deutlich höher als im OC und MOD, hingegen war die Expression der Isoform *Igfbp3* im OC am höchsten. Die Expression von *Igf2* („*Insulin-like growth factor 2*“) selbst sowie von Genen, die im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Wachstum stehen (*Vegfb* / „*Vascular endothelial growth factor B*“), in den Eisentransport involviert sind (*Tf* / „*Transferrin*“, *Tfrc* / „*Transferrin receptor*“) oder an der Regulation der Durchblutung bzw. Signaltransduktion beteiligt sind (*Nos2* / „*Nitric oxide synthase 2, inducible*“, *Hmox1* / „*Heme oxygenase 1*“), zeigten eine relativ niedrige Expression.

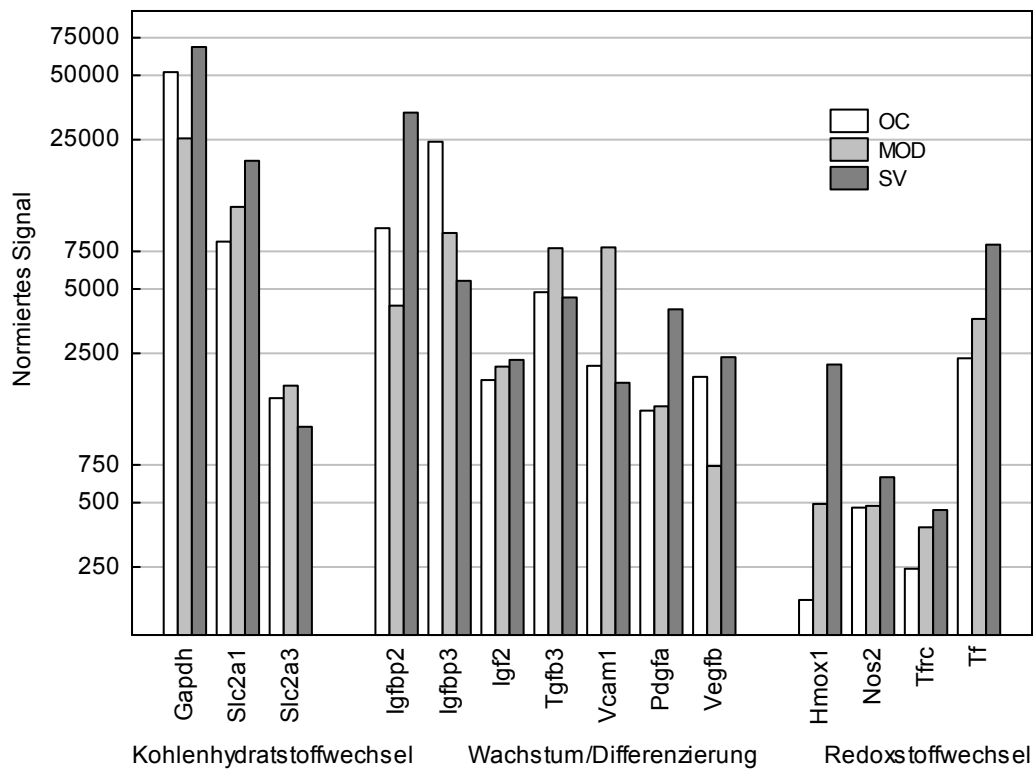


Abb. 39 Expression von HIF-1-abhängigen Genen in der organotypischen Kultur von Cortischem Organ (OC), Modiolus (MOD) und Stria vascularis (SV) unter Normoxie. Die Analyse erfolgte mittels Microarray (Affymetrix). Dargestellt sind die normierten Signale in logarithmischer Form. Folgende Gene erreichen im OC und MOD nicht die statistische Signifikanz von $p < 0,04$: *Pdgfa*, *Vegfb*, *Hmox1*, *Nos2*, *Trfc*. In der SV ist *Trfc* „marginal“ ($p = 0,054$).

3.6.5. Charakterisierung der Genexpression unter Kultivierung (S2)

Da das hier eingesetzte Hypoxiemodell der organotypischen Kultur grundsätzlich zwei verschiedene Prozesse beinhaltet, nämlich die Kultivierung einerseits (d. h. den Übergang von *in vivo* zu *in vitro*) und die Hypoxie andererseits, haben wir den Einfluss der Kultivierung und Hypoxie getrennt analysiert. Die Tabelle 10 gibt eine Übersicht der Veränderungen in der Genexpression in den Regionen OC, MOD und SV durch Kultivierung an. Wie man erkennt, zeigten sich Veränderungen bei einer großen Anzahl von Genen. Aus Gründen der Begrenzung und der Betonung von wesentlichen Veränderungen wurden nur Gene analysiert, die mindestens in einer Region deutlich hochreguliert (≥ 4 fach) bzw. runterreguliert ($\leq 0,25$ fach) wurden. (Zum Vergleich wurden

Veränderungen der Genexpression ≥ 2 fach und $\leq 0,5$ fach mit genannt.) Die Tabelle 10 zeigt die Anzahl der Gene, die in ihrer Expression verändert sind.

Tabelle 10 Anzahl der hoch- und runterregulierten Gene unter Kultivierung.		
Cochlear-Region	≥ 4 fach	$\leq 0,25$ fach
OC	34	8
MOD	44	21
SV	35	9

Für die funktionelle Betrachtung wurden die hochregulierten Gene in folgende Gruppen eingeteilt:

- Kohlenhydratstoffwechsel, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Kinasen, Redoxstoffwechsel, Apoptose, Proteinsynthese und Transkriptionsfaktoren, Stress-Proteine und -Peptide, Phosphodiesterasen, andere.

Bei der Bewertung der Gene, die unter Kultivierung runterreguliert wurden, haben wir uns für folgende funktionelle Gruppen entschieden:

- Wachstum/Zytosklett, Ionenkanäle, Neurotransmission, Signaltransduktion, Apoptose, Transportproteine, Proteinsynthese

3.6.5.1. Analyse der Gene, die unter Kultivierung hochreguliert wurden

1. Kohlenhydratstoffwechsel

Unter Kultivierung zeigen sich Veränderungen in der „*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*“ (*Gapdh*), „*Solute carrier family 2, (facilitated glucose transporter) member 1*“ (*Slc2a1*), „*Hexokinase 1*“ (*Hk1*) und „*Enolase2, gamma*“ (*Eno2*). Alle Gene gehören zu den HIF-1-Zielgenen. Tabelle 11 zeigt, dass der größte Teil dieser Gene im OC nachzuweisen war. Die *Gapdh* als „housekeeping“ wurde in allen 3 Regionen hochreguliert.

Tabelle 11 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Kohlenhydratstoffwechsel.

Gen	OC	MOD	SV
<i>Gapdh</i>	5,7	7,1	4,5
<i>Slc2a1</i>	8,1	(n.s.)	(3,4)
<i>Hkl</i>	4,3	(n.s.)	(n.s.)
<i>Eno2</i>	(n.s.)	(n.s.)	4,3

n.s. = nicht signifikant

Glukose ist Hauptsubstrat für neuronale Zellen. Die Hochregulation dieser Gene ist Ausdruck für den Glukoseverbrauch neurosensorischer Zellen der Cochlea.

„*Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1*“ (*Slc2a1*) wird auch als *Glukosetransporter1 (Glut1)* bezeichnet. Der initiale und limitierende Schritt im Stoffwechsel der Glukose ist ihr Transport über die Zellmembran mittels Glukosetransportproteinen (GLUT) (Gross, 2005). Die Bereitstellung der Glukose in der Cochlea erfolgt über das vaskuläre System und den Glukosetransporter 1, der bei der Überwindung der Blut-Perilymph-Schranke eine bedeutende Rolle spielt (Ito et al., 1993). Die Erhöhung des Glukosetransporters als Reaktion auf Hypoxie erfolgt zeitlich gestaffelt. Während die akute Reaktion posttranslational über Aktivierung und Translokation von GLUT1 erfolgt, gestaltet sich die späte Reaktion über Transkription und Erhöhung der Stabilität der mRNA (Gross, 2005). GLUT1 ist vorwiegend in den Marginalzellen der SV nachgewiesen, wo er den Glukosetransport in das intrastriale Kompartiment und damit an die Haarzellen vermittelt. Während GLUT1 immunhistochemisch am höchsten in der SV nachgewiesen (Yoshihara et al., 1999) wurde, zeigen die vorliegenden Untersuchungen unter Kultivierung die stärkste Hochregulation im OC.

„*Hexokinase 1*“ (*Hkl*) wandelt Glukose in Glukose-6-Phosphat um. Glukose-6-Phosphat kann sowohl in die Glykolyse einmünden, in den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel oder zu Glykogen umgesetzt werden. Untersuchungen zur *Hkl* liegen besonders in

Astrozyten vor. Astrozytenzellen exprimieren Hexokinase 1, die primäre Isoform der Hexokinase (Wiesinger et al., 1997). Insgesamt ist der Glukosemetabolismus in Astrozytenzellen über den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel im Vergleich zur Glykolyse gering, kann aber um ein Vielfaches unter oxidativem Stress aktiviert werden.

Die verstärkte Expression von „*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*“ (*Gapdh*) ist Ausdruck für eine Aktivierung des Glukosestoffwechsels.

Die auch als „*Enolase gamma*“ bezeichnete ENO2 kann ADP zu ATP phosphorylieren und damit Energie bereitstellen (Lehninger et al., 1994). Im Innenohr ist ihr Vorkommen bereits während der Entwicklung im Spiralganglion und in den Haarzellen beschrieben worden (Dechesne und Pujol, 1986; Whitlon und Sobkowicz, 1988). Interessant ist, dass dieses Gen unter Kultivierung nur in der SV $\geq 4,0$ fach hochreguliert wurde, da die *Eno2* bisher nur in neurosensorischen Zellen nachgewiesen wurde.

Insgesamt erkennt man an der Expression, dass der Kohlenhydratstoffwechsel eine große Rolle in der Cochlea spielt, wobei unter Kultivierung besonders im OC eine starke Aktivierung erfolgt.

2. Wachstumsfaktoren

Bei den Wachstumsfaktoren zeigten sich nach Kultivierung der „*Insulin-like growth factor binding protein 2*“ (*Igfbp2*), „*Insulin-like growth factor binding protein 3*“ (*Igfbp3*), „*Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide*“ (*Pdgfra*) und „*Fibroblast growth factor 5*“ (*Fgf5*) stärker exprimiert (Tabelle 12).

Tabelle 12 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Wachstumsfaktoren.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Igfbp2</i>	5,0	(2,7)	(2,2)
<i>Igfbp3</i>	(3,2)	(n.s.)	7,1
<i>Pdgfra</i>	7,9	(n.s.)	5,5
<i>Fgf5</i>	(n.s.)	61,9	(n.s.)

n.s. = nicht signifikant

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide. Sie wirken als Signalmoleküle, die über die Bindung und Aktivierung an spezifische membrangebundene Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Dies führt schließlich zur Regulation der Genexpression und Zellzyklusprogression. Abhängig vom jeweiligen Rezeptor und dem zellulären Kontext wirken Wachstumsfaktoren entweder mitogen und trophisch oder anti-mitogen und antiproliferativ. Interessanterweise wirken Wachstumsfaktoren nur in der G0- und in der G1-Phase, also vor der DNA-Synthese, auf den Zellzyklus (Guntinas-Lichius, 2002).

IGF2 spielt während der Entwicklung der Cochlea eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktor und besitzt u. a. eine Funktion in der Haarzellreparatur (Staecker und Van De Water, 1998; Zheng et al., 1997). Bemerkenswert ist, dass nicht *Igf2* hochreguliert wird, sondern „*Insulin-like growth factor binding protein 2*“ (*Igfbp2*) (OC) und „*Insulin-like growth factor binding protein 3*“ (*Igfbp3*) (SV). *Igfbp2* reguliert die Aktivität von IGF1 und IGF2 (Chesik et al., 2004). Die Isoform *Igfbp2* ist unter Kultivierung nur im OC deutlich höher exprimiert. Abe et al. (Abe et al., 2003) fanden die stärkste Expression von *Igfbp2* ebenfalls im OC.

Die Funktion von *Igfbp3* beschränkt sich nicht nur auf die Interaktion mit IGF-1 (Chesik et al., 2004), sondern auch auf die Regulierung mitogener und antiapoptotischer Faktoren (Butt et al., 2004). *Igfbp3* aktiviert Microglia und übernimmt dadurch neuroprotektive Aufgaben (Chesik et al., 2004). *Igfbp3* spielt eine wesentliche Rolle für

die Entwicklung des Innenohres (Li et al., 2005). Es hat die höchste Bindungsaffinität aller IGFbp zu IGF (Ricort und Binoux, 2002) und scheint besonders eine Rolle in der Regulation unter Hypoxie zu spielen. Die hohe Expression von *Igfbp3* in der SV weist auf eine besondere Bedeutung von IGF als Wachstums- und Überlebensfaktor in der Cochlea hin.

Insgesamt bietet die Steuerung über IGF-Bindungsprotein die Möglichkeit, bei Störungen (z. B. oxidativem Stress, Sauerstoffmangel) eine relativ optimale Entwicklung zu gewährleisten.

„Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide“ (*Pdgfra*) reguliert als Rezeptor für *Pdgfa* die Entwicklung kraniofazialer Strukturen (Ding et al., 2004) und ist wichtig für die Differenzierung von Neuronen aus Stammzellen (Erlandsson et al., 2001). Der *Pdgfra* wird in der Cochlea bereits in der Otocyste ab 12.-14. embryonalen Tag exprimiert (Lee et al., 2004). Während andere Autoren (Malgrange et al., 1998) in der postnatalen Ratte *Pdgfra* in OC, MOD, SV nachwiesen, war in unseren Untersuchungen unter Kultivierung eine Expressionserhöhung im OC und SV nachweisbar.

„Fibroblast growth factor 5“ (*Fgf5*) wurde bisher nicht im Ohr beschrieben; es ist aber interessant, dass gerade dieser „Fibroblast growth factor“ (FGF) so stark allein im MOD anstieg. FGF spielen eine Rolle bei der Entwicklung und dem Wachstum des Innenohres. Mitglieder der FGF-Genfamilie, einschließlich *Fgf2*, *Fgf3*, *Fgf8*, *Fgf9*, *Fgf10* und *Fgf15/19* sind bereits zu unterschiedlichen Entwicklungszeiten und in unterschiedlichen Spezies im Innenohr nachgewiesen worden (Ohuchi et al., 2005). FGF sind bereits bei der Induktion des embryonalen Ohrvesikels beteiligt. *Fgf* werden unter oxidativem Stress in der Cochlea hochreguliert (Altschuler et al., 1999).

Insgesamt liegt die Bedeutung der Wachstumsfaktoren darin, dass sie nicht nur Einfluss auf die Entwicklung des Hörorgans haben, sondern auch für die Erhaltung der Sinneszellen wichtig sind. Die Hochregulation von Wachstumsfaktoren im OC ist auch

von Bedeutung für die Entwicklung von Spiralganglienzellen, die ständig mit nutritiven Wachstumsfaktoren versorgt werden müssen (Guntinas-Lichius, 2002).

3. Cytokine

Eine auffällig starke Expression während der Kultivierung ist für die Gruppe der Cytokine nachweisbar (Tabelle 13). Zur Gruppe der Cytokine gehören „Chemokine“, „Interleukine“, die „Interferone“, die „Macrophage migrations factors“ (MIF) und die „Komplementfaktoren“. Cytokine haben eine Vielzahl von Funktionen im Zusammenhang mit Entzündung, Immunreaktion, Reparaturmechanismen und Gewebeschädigung.

Tabelle 13 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Cytokine.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Ccl2</i>	36,3	58,9	76,1
<i>Ccl3</i>	66,7	137,6	47,5
<i>Ccl20</i>	15,1	20,1	16,5
<i>Cxcl2</i>	38,6	(n.s.)	(n.s.)
<i>Il1b</i>	15,7	33,9	31,2
<i>Il6</i>	(n.s.)	46,6	19,6
<i>Mif</i>	5,1	4,3	(3,0)
<i>C3</i>	26,6	29,8	676,9
<i>C4a</i>	(n.s.)	(n.s.)	6,8
<i>Icam1</i>	5,0	(2,9)	5,2

n.s. = nicht signifikant

Die Tabelle 13 zeigt einen z. T. dramatischen Anstieg verschiedener „Chemokine“ (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl20*, *Cxcl2*) sowie von „Interleukin 1b“ (*Il1b*), „Interleukin 6“ (*Il6*), des „Macrophage migrations factor“ (*Mif*), von „Complementfaktoren 3 und 4 a“ (*C3*, *C4a*) und von „Intercellular adhesion molecule 1“ (*Icam1*).

„Chemokine“ (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl20*, *Cxcl2*) (eine Kurzform von *chemoattraktant cytokine*) gehören zu einer großen Familie von kleinen Proteinen (8-14 kD), die ursprünglich im Zusammenhang mit der Leukozyten-Migration während

Entzündungsprozessen identifiziert wurden (Cartier et al., 2005). Chemokine aktivieren verschiedene Chemokin-Rezeptoren und wirken auf das Zell-Überleben, die Zell-Proliferation und auf die synaptische Transmission. Sie aktivieren verschiedene Mitogen aktivierte Proteinkinasen, vor allem ERK 1/2 und Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen. Darüber hinaus haben sie Funktionen im Zusammenhang mit der Zelladhäsion, der Phagozytose, der Zytokinsekretion, der Zellproliferation und der Apoptose. Chemokine entfalten ihre Wirkung über die an G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Insgesamt sind mehr als 40 Chemokine identifiziert worden; sie werden klassifiziert in CC-, SXC- und CX3-Chemokine, die neuere Chemokin-Nomenklatur umfasst auch die Liganden. Während der Kultivierung ist ein starker Anstieg der Chemokine von *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl20* und *Cx12* nachweisbar. Diese gehören zu den inflammatorischen Chemokinen, deren Aktivierung offensichtlich Ausdruck der Stress-, Schädigungs- und Reparaturprozesse während der Kultivierung ist. Die Tatsache, dass mehrere Typen von Chemokinen aktiviert werden, zeigt den komplexen und redundanten Charakter des Chemokin-Systems.

Über das Vorkommen und die Funktionen der einzelnen Chemokine im Innenohr ist nichts bekannt. Untersuchungen an anderen Geweben lassen gewisse Schlussfolgerungen zur Bedeutung der einzelnen Formen im vorliegenden Modell zu. CXCL2 und CCL2-Erhöhungen wurden z. B. nach einer Ischämie in Kardiomyozyten nachgewiesen (Tarzami et al., 2002). CCL2 („Monocyte chemoattractant protein“/MCP-1) scheint Bedeutung für das Überleben von Kardiomyozyten nach Ischämie zu haben. CCL3 („Macrophage inflammatory Protein 1alpha“/MIP-1 alpha) ist ein gut charakterisiertes Chemokin im Hinblick auf die Chemotaxis von Monozyten. Cowell et al. (2002) fanden eine verstärkte Expression von MIP-1 alpha nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung des Neugeborenen. MIP-1 alpha und MIP-1 beta Erhöhungen sind im Mittelohr nach Virusinfektionen nachweisbar (Tong et al., 2003). CCL20 (MIP-3 alpha) bindet als einziges Chemokin an den CC-Chemokin Rezeptor 6. Dieses System scheint

verantwortlich für die Chemotaxis von unreifen dendritischen Zellen sowie T- und B-Lymphozyten (Schutyser et al., 2003) zu sein. Von Laurens et al. (2005) wurde nachgewiesen, dass nach einer Hypoxie im Hepatozyten eine erhöhte Expression von CCL2 (MCP-1) und CXCL2 (MIP-2) erfolgt.

Aus der Gruppe der Interleukine war eine Hochregulation von „*Interleukin 1b*“ (*IL1b*) und „*Interleukin 6*“ (*IL6*) nachzuweisen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das Innenohr sehr rasch mit der Expression von *Il1b* und *Il6* reagieren kann. Beide sind proinflammatorische Cytokine und im vorliegenden Untersuchungsmodell Ausdruck von Schädigungs- und Reparaturprozessen. Die Expression von *Il1b* wurde in Fibrozyten des Innenohres beobachtet (Sato et al., 2002; Sato et al., 2003). Viel genauer wurde die Expression von *IL6* im ZNS untersucht; die Expression erfolgt in Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen (Saliba und Henrot, 2001). Beide Cytokine reagieren nach einer Ischämie mit einem Anstieg. Es wird spekuliert, ob die Unterbrechung dieser proinflammatorischen Kaskade das Ausmaß der irreversiblen ZNS-Schädigungen begrenzen kann (Saliba und Henrot, 2001).

Interessant ist die Wechselwirkung von *IL1b* und *IL6*. Unter normoxischen Bedingungen besteht eine direkte Korrelation zwischen beiden; die Korrelation ist umgekehrt bei Hypoxie (Di Loreto et al., 2003). *IL6* und *IL1b* modulieren in sehr spezifischer Art und Weise die Reaktion der Cochlea-Regionen während der Kultivierung.

„*Macrophage migration inhibitory factor*“ (*Mif*)-Genprodukt ist ein pleiotropes Cytokin, das von Leukozyten und von verschiedenen Zellen außerhalb des Immunsystems gebildet wird. MIF ist ein Redox-sensitives Zytokin und ein Regulator der Zelldifferenzierung und Proliferation in normalen und Tumorzellen (Bacher et al., 2003; Takahashi et al., 2001). Hypoxie und Hypoglykämie führen in Glioblastomazellen zu einer deutlichen Hochregulation von MIF mRNA. Die Funktion außerhalb des immunologischen

Systems ist nicht bekannt. Es wird eine Beteiligung an der Regulation der Neovaskularisation angenommen (Bacher et al., 2003).

Die Expression von „Komplementfaktoren 3 und 4a“ (C3, C4a) im Rahmen von immunologischen und Entzündungsreaktionen des Innen- und Mittelohres sind gut bekannt (Harris et al., 1997; Narkio-Makela et al., 2000). Hierzu gehört auch die Expression von „Intercellular adhesion molecule 1“ (Icam1) im Organ Corti (Harris et al., 1997). Icam1 könnte eine wichtige Rolle bei antigeninduzierten Innenohrerkrankungen spielen (Pawankar et al., 1998).

4. Kinasen

Zu den Genen, die während der Kultivierung ≥ 4 fach hochreguliert wurden, gehören auch zwei Kinasen: Die mitogen aktivierte „Proteinkinase 9“ (Mapk9) im OC und die „Januskinase 2“ (Jak2) im MOD (Tabelle 14).

Tabelle 14 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der Kinasen.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Mapk9</i>	7,1	(n.s.)	(3,7)
<i>Jak2</i>	(3,6)	11,6	(2,5)

n.s. = nicht signifikant

Das „Proteinkinase 9“ (Mapk9)-Genprodukt gehört zur Familie der Kinasen, die verschiedene Signale von der Zellmembran zum Zellkern übertragen. MAPKs phosphorylieren verschiedene Substrate an den Serin- oder Threoninresten. Auf diese Weise modulieren MAPKs Signalwege, die Mitose, Proliferation und Zellmotilität, den Stoffwechsel und den programmierten Zelltod betreffen. Die MAPK9 gehört zur Gruppe der Stresskinasen vom Typ c-jun NH2-terminal kinase (JNK; MAPK9 = JNK2). Die JNKs werden ubiquitär exprimiert. Die verstärkte Expression im vorliegenden Modell hängt am

ehesten mit dem veränderten Wachstum nach Kultivierung zusammen und ist Resultat der IL6-Produktion (Jeong et al., 2005). JNKs aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren wie c-jun, ATF2, p53, c-myc, aber auch Nicht-Transkriptionsfaktoren wie bcl-2 und bclxl. In Bezug auf den Zelltod hat JNK2 eher pro-apoptotische Wirkungen (Wada und Penninger, 2004).

Die „Januskinase 2“ (*Jak2*) war besonders stark erhöht im MOD, aber auch im OC und in der SV. Die Januskinase 2 gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase, die eine große Bedeutung für Wachstumsprozesse haben (Verma et al., 2003). Diese Enzyme phosphorylieren Substrate an ihren Tyrosinresten. Die Jak-Familie („just another kinase“; oder Januskinasen, nach dem römischen Gott mit den zwei Gesichtern, Reflektion der beiden Domänen JH1 und JH2) gehört zu jener Gruppe, die sich ausschließlich im Zytoplasma befinden und dort mit Proteinen, die an der Zellmembran haften, reagieren. Die Januskinasen regulieren Signalwege, die durch verschiedene Cytokine aktiviert werden, z. B. Interleukine und EPO. Die Bindung von Liganden an den Rezeptor (z.B. EPO) kann eine Dimerisierung der Rezeptoren bewirken, die mit einer Konformationsänderung verbunden ist. Die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors sind Andockungsorte für Signalmoleküle und Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT1) (Terui et al., 2004). In Bezug auf den Zelltod wirken Jak2 eher neuroprotektiv (Liu et al., 2005).

5. Redoxstoffwechsel

In der Gruppe der Gene, die für den Redoxstoffwechsel verantwortlich sind, zeigten sich unter Kultivierung Veränderungen in der Expression bei folgenden Genen: „*Heme oxygenase 1*“ (*Hmox1*), „*Nitric oxide synthase 2, inducible*“ (*Nos2*), „*Transferrin receptor*“ (*Tfrc*), „*Metallothionein*“ (*Mt1a*), „*Glutathion-S-Transferase*“ (*Gsta5*).

Es fällt die besonders starke Erhöhung der Expression der Hmox in allen 3 Regionen auf. NOS2, Tfrc und Gsta5 wurden besonders im MOD und in der SV hochreguliert (Tabelle 15).

Tabelle 15 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Redoxstoffwechsel.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Hmox1</i>	144,6	94,5	27,3
<i>Nos2</i>	(2,9)	6,5	5,2
<i>Tfrc</i>	(n.s.)	4,8	4,7
<i>Mt1a</i>	7,9	6,3	10,5
<i>Gsta5</i>	(2,9)	5,9	11,3

n.s. = nicht signifikant

„Heme oxygenase 1“ (*Hmox1*, auch bekannt als „heat-shock protein 32“/*hsp32*) katalysiert den Abbau von Häm, wobei Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid und Eisen freigesetzt werden. Es sind drei Isoenzyme bekannt: die induzierbare HMOX1 sowie die konstitutiv exprimierten HMOX2 und HMOX3. Das Enzym HMOX1 wirkt generell protektiv gegenüber oxidativem Stress und spielt eine wichtige Rolle für den Abbau von Sauerstoffradikalen. *Hmox1* und *Hmox2* wurden immunhistochemisch in den Stützzellen des OC und in Zellen des Spiralganglions nachgewiesen (Watanabe et al., 2003b). Die hohe Expression der *Hmox1* in allen drei Regionen der Cochlea unterstreicht deren Wirkung als Schutzmechanismus gegen die Sauerstoffradikal-Bildung.

NO ist ein kurzlebiger intrazellulärer Botenstoff, der durch die NOS gebildet wird. NO wird in vaskulären endothelialen Zellen aus L-Arginin durch die endotheliale Isoform der NOS synthetisiert. NO bewirkt die Relaxation der glatten Muskelfasern sowie die Regulation des Vasotonus. „Nitric oxide synthase 2, inducible“ (*Nos2*) wird auch als *iNos* bezeichnet und ist eine von 3 Isoformen (endotheliale, neuronale, induzierte). Unter Hypoxie kommt es über die induzierte Isoform der NOS zum einen zur Überproduktion von Peroxiden, die eine direkte toxische Wirkung auf die Gefäße haben und damit das

endocochleäre Potenzial beeinflussen. Ein weiterer NO-Wirkungsmechanismus ist der synaptische Komplex. Unter normoxischen Bedingungen wirkt NO im Sinne einer Rückkopplung hemmend auf die Glutamatrezeptoren. Hypoxie, die z. B. bei akustischer Überstimulation entsteht, bewirkt eine vermehrte Glutamatausschüttung und führt an den Glutamatrezeptoren zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom und letztendlich zur Zerstörung und Degeneration der afferenten Fasern an den Haarzellen (Fessenden und Schacht, 1998). Verschiedene Studien haben die Expression der neuronalen und endothelialen NOS in der Cochlea einschließlich der IHZ gezeigt (Shen et al., 2005). Beide NOS-Formen produzieren unter normalen Bedingungen eine Basismenge an NO. Diese Basismenge von NO konnte in der Cochlea gemessen werden, und dieses endogene NO spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des cochleären Blutflusses und den O_2 -Transport zum Gewebe. Die iNOS kann unter pathologischen Bedingungen die Menge an NO dramatisch steigern. Lange Zeit wurde postuliert, dass iNOS unter normalen Bedingungen in jungen Tieren nicht nachzuweisen ist, jedoch in älteren Tieren (Shi und Nuttall, 2003). Neuere Arbeiten zeigen, dass iNOS unter normalen Bedingungen im vaskulären Endothel, in Marginalzellen, Nervenfasern, Stereozilien der Haarzellen und Stützzellen vorkommt (Shi und Nuttall, 2003). Es wird berichtet, dass die iNOS in die initiale neuronale Differenzierung während der Innenohrentwicklung involviert ist (Arnhold et al., 1999).

In der SV konnte unter Stressbedingungen (Lärm) ein Anstieg der NO-Konzentration mit einhergehendem Hörverlust nachgewiesen werden (Shi und Nuttall, 2003). Da dieses Gen normalerweise unter Stressbedingungen verstärkt exprimiert wird, ist die Hochregulation der *Nos2* im MOD und SV unter Kultivierung durchaus plausibel.

Transferrin hat wahrscheinlich zwei Funktionen: 1. Es ist ein wichtiger Faktor für die Zelldifferenzierung (Chauhan et al., 2004), 2. Transferrin bindet das freie Eisen und schützt damit vor eiseninduziertem oxidativem Stress (Chauhan et al., 2004; Moos und Morgan, 2002). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass nach Schädigung von

Neuronen eine Hochregulation des „*Transferrin receptors*“ (*Tfrc*) stattfindet. Die vermehrte Eisenaufnahme und Eisenbindung im neuronalen Gewebe führt zu einer verstärkten neuronalen metabolischen Aktivierung und damit zum neuronalen Reparaturmechanismus (Graeber et al., 1989). Interessanterweise wurde unter Kultivierung der Transferrin-Rezeptor in MOD und SV hochreguliert mit der wahrscheinlichen Aufgabe, vermehrt Transferrin zu binden. Extrazelluläres und freies Eisen ist schädlich für Zellen, insbesondere für Neurone. Durch die Expression von *Tf* und *Tfrc* wird freies Eisen gebunden und in die Zellen aufgenommen. Die Expression des *Tfrc* erfolgt wahrscheinlich eher in Stützzellen als in Haarzellen. Damit werden Haarzellen vor der eiseninduzierten Radikalbildung geschützt.

Methallothionine (MT) sind Zink-Bindungsproteine, die aus 25-35 % Cysteinen bestehen. Zink ist für eine optimale Funktion von mehr als 300 Enzymen und Transkriptionsfaktoren sowie als intrazellulärer Mediator wichtig. Die Rolle von Zink und deren Metalloenzyme besteht in einer katalytischen und regulatorischen Funktion sowie in der Aufrechterhaltung der Strukturstabilität. Prinzipiell ist Zink in normaler Konzentration ein Inhibitor der Apoptose. Das Gehirn wie auch die Retina besitzen einen hohen Zinkgehalt, und die 4 Isoformen der MT werden kontinuierlich synthetisiert. Die Isoformen I und II sind in allen Zelltypen präsent. „*Methallothionein*“ (*Mt1a*) ist von der ersten bekannten Isoform (MT1a-c) dasjenige, welches z. B. in Retinazellen am höchsten exprimiert wird (Tate et al., 2002). Die Isoform MT III wird am stärksten in Neuronen exprimiert, während die Isoform MT IV in epithelialen Zellen gefunden wird. MT puffert unter pathologischen Bedingungen exzessive synaptische Zink-Ausschüttung ab und reduziert damit die freie Zink-Konzentration (Ebadi et al., 1995). Es ist bekannt, dass Regionen des Gehirns, die eine geringere Aktivität von MT besitzen, auf oxidativen Stress vulnerabler reagieren. Die Runterregulation von MT und damit als Konsequenz ein zelluläres Zink-Überangebot führen zur Veränderung des Redoxstatus und zu metall-

induzierter Exzitotoxizität (Aschner et al., 1997). Dies bedeutet eine Zunahme der ROS-Produktion, Verlust des mitochondrialen Potenzials und die Reduzierung des zellulären ATP-Gehaltes (Dineley et al., 2003). Interessanterweise zeigte sich unter Kultivierung die Hochregulation von *Mt1a* in allen drei Regionen. Dies kann als Anpassungsmechanismus an oxidativen Stress gewertet werden.

„*Glutathion-S-Transferase*“ (*Gsta5*) katalysiert die Konjugation von Toxinen und deren Abbauprodukten mit Glutathion und spielt eine bedeutende Rolle in der antioxidativen Protektion. Die Zugabe von Glutathion *in vitro* und *in vivo* schützt die Cochlea und Haarzellen vor Schäden durch Aminoglykoside, Cisplatin und Lärm (Whitlon et al., 1999). Interessanterweise zeigt sich unter physiologischen Bedingungen in der Cochlea basal eine niedrigere Glutathionaktivität als apikal. Dieser Basal-Apikal-Gradient wird als Ursache für die unterschiedliche Vulnerabilität der Cochlea unter pathologischen Bedingungen diskutiert (Sha et al., 2001). Es wird postuliert, dass jedes Organ eine eigene Ausstattung mit *Gsta*-Isoformen besitzt. Im ZNS ist *Gsta* besonders konzentriert im Blut-Hirn- und Hirn-Liquor-Zwischenraum zu finden. In der Cochlea sind bis jetzt 3 Isoformen immunhistochemisch nachgewiesen worden. Besondere Immunreaktivität zeigte sich dabei in den Intermediär- und Basal-Zellen der SV und in verschiedenen Typen von Fibrozyten im Spiralligament (Takumi et al., 2001). *Gsta5* wurde bisher in der Literatur in der Cochlea nicht nachgewiesen. In unseren Untersuchungen zeigte sich unter Kultivierung eine Hochregulation der Expression im MOD und in der SV.

Insgesamt haben Gene des Redoxstoffwechsels eine große Bedeutung für die Vulnerabilität der Cochlea. Interessanterweise weisen MOD und SV eine stärkere Expression auf als das OC.

6. Apoptose

In der Gruppe der Apoptose-Gene wurden unter Kultivierung folgende Gene hochreguliert: „*Bcl2-associated X protein*“ (*Bax*) und „*Caspase 3*“ (*Casp3*). Bemerkenswerterweise war diese Gruppe nur im MOD stärker exprimiert (Tabelle 16).

Tabelle 16 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Apoptose.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Bax</i>	(n.s.)	4,5	(n.s.)
<i>Casp3</i>	(n.s.)	14,7	(3,9)

n.s. = nicht signifikant

Apoptose ist ein normaler Prozess in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der *Bcl-2*-Familie den Zelltod über Apoptose modulieren.

Das zur *Bcl-2* Familie gehörende „*Bcl2-associated X protein*“ (*Bax*) (Guo et al., 2003) ist beteiligt an der Steuerung der Apoptose während der Entwicklung des Ohres (Wang et al., 2001). *Bax* ist ein Gen, das pro-apoptotisch wirkt und sich als Gegenspieler des anti-apoptotisch wirkenden „B-cell leukemia/lymphoma 2“ (*Bcl2*) darstellt (Roth und D'Sa, 2001). Pränatal (E13-19) wird *Bax* im Gegensatz zu *Bcl2* im sensorischen Epithel der Cochlea nicht exprimiert, hingegen in der SV wird *Bax*, *Bcl2* und *Bcl-x* während der gesamten Entwicklung exprimiert (Ishii et al., 1996). Insgesamt werden in der Entwicklung des Nervensystems und auch der Cochlea Veränderungen in der *Bax*, *Bclx* und *Bcl2* Expression beobachtet, und das Zellüberleben wird über die Balance dieser Expression gewährleistet. Interessanterweise wurde unter Kultivierung *Bax* nur im MOD hochreguliert. Dieses Ergebnis wird von der Arbeitsgruppe Wang et al. (2001) unterstützt, die feststellten, dass der Prozentsatz der BAX-Protein-haltigen Zellen im Spiralganglion

signifikant höher war in der Postnatalperiode (P1, P3, P5 und P7) im Vergleich zum adulten Tier.

Die Proteolyse während der Apoptose erfolgt durch Caspasen. „*Caspase 3*“ (*Casp3*) gehört in die Gruppe II der Caspasen, in die auch Caspase 2, 7 und CED-3 einzuordnen sind. Die Caspase 3 wird durch Caspase 8 und 9 aktiviert und leitet den endgültigen apoptotischen Zelltod ein (Lefebvre et al., 2002). Caspase 3 ist die bedeutendste Caspase sowohl während der normalen Zellentwicklung als auch nach Zellschaden. Die Untersuchungsergebnisse an Gen-Knockout Mäusen (Null Mutation) zeigten klar, dass das Vorkommen einer funktionierenden Caspase 3 für die Entwicklung einer normalen Hörfunktion notwendig ist (Van De Water et al., 2004). Die histologische Analyse von 2 Wochen alten Caspase 3 (-/-) Knockout-Mäusen zeigten unreife Cochlea-Gänge, Hyperplasie der Stützzellen, eine progressive Degeneration der sensorischen Zellen und der auditorischen Neurone. Im ZNS kommt es unter Hypoxie zur Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 (Delivoria-Papadopoulos und Mishra, 2004). Unter anderen pathologischen Bedingungen (endolymphatischer Hydrops, Cisplatin) konnte eine Caspase 3 Aktivierung in der Cochlea nachgewiesen werden (Labbe et al., 2005; Ladrech et al., 2004; Watanabe et al., 2003a). Interessanterweise zeigte sich auch in der Cochlea von älteren Tieren im Vergleich zu jüngeren Tieren eine Zunahme der Caspase 3 (Van De Water et al., 2004).

7. Proteinsynthese und Transkriptionsfaktoren

Zu jenen Genen, die mehr als 4fach hochreguliert werden, gehören 8 Transkriptionsfaktoren (Tabelle 17). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die auf ein entsprechendes Signal hin aus dem Zytosol in den Zellkern transportiert werden und dort an nicht-kodierende regulatorische Regionen der DNA gebunden werden.

Folgende Transkriptionsfaktoren wurden beobachtet: „*Hypoxia inducible factor 1 alpha*“ (*Hif-1 alpha*) (s. S. 63-70), „*Jun-B-oncogene*“ (*Junb*), „*V-jun sarcoma virus 17 oncogene homologe, avian*“ (*Jun*), „*Fos-like antigenel*“ (*Fosl1*), „*Interferon regulatory factor 1*“ (*Irf-1*), „*Brain expressed myelocytomatosis oncogene*“ (*Bmyc*), „*cAMP response element modulator*“ (*Crem*) und „*CCAAT/Enhancer binding protein (c/EBP), beta*“ (*Cebpb*). Es ist auffällig, dass diese Gene besonders stark im MOD exprimiert wurden. Da ihre Expression vor allem im ZNS beschrieben ist, sind diese Transkriptionsfaktoren am ehesten der Entwicklung des Spiralganglions zuzuordnen.

Tabelle 17 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der Transkriptionsfaktoren.

Gen	OC	MOD	SV
<i>Hif 1a</i>	(2,5)	6,5	(n.s.)
<i>Junb</i>	4,1	6,1	(2,6)
<i>Fosl1</i>	(n.s.)	29,9	(n.s.)
<i>Jun</i>	(3,6)	19,9	(n.s.)
<i>Irf1</i>	(n.s.)	7,0	5,0
<i>Bmyc</i>	(n.s.)	5,6	(n.s.)
<i>Crem</i>	(n.s.)	14,2	(n.s.)
<i>Cebpb</i>	9,7	16,8	27,5

n.s. = nicht signifikant

Die Aktivierung der Transkription erfordert einen Multiproteinkomplex, der zugleich zur Regulation der Transkription dient. Allgemein werden Gene, die durch Stress aktiviert werden, in zwei Klassen eingeteilt: Früh induzierbare Gene („immediate early genes“, IEG), die innerhalb von Minuten nach dem Stressereignis induziert werden, und später induzierbare Gene („late response genes“), die innerhalb von Stunden induziert werden (Herdegen und Leah, 1998).

Die Expression von „*Jun-B-oncogene*“ (*Junb*), „*V-jun sarcoma virus 17 oncogene homologe, avian*“ (*Jun*) und „*Fos-like antigenel*“ (*Fosl1*) zeigt die Spezifik dieser Transkriptionsfaktoren im Innenohr. Diese Transkriptionsfaktoren gehören zur Gruppe der

„immediate early genes“. Ein wichtiger Vertreter der „immediate early genes“ ist der AP-1-Komplex; er besteht aus einem Heterodimer von jun- und fos-Proteinen (Kawakami et al., 1992; Sakai et al., 1989). Die verstärkte Expression nach Hypoxie ist gut bekannt (Webster et al., 1993).

Das Vorkommen der Transkriptionsfaktoren *Junb* und *Fosll* im Innenohr ist beschrieben (Zine und Van De Water, 2004). Es werden bereits Überlegungen zur therapeutischen Modulation dieser Transkriptionsfaktoren angestellt. Es wurde auch über die erhöhte AP-1 Expression bei akustischer Überstimulation berichtet (Matsunobu et al., 2004).

Der „*Interferon regulatory factor 1*“ (IRF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der viele Funktionen ausübt und u. a. die Expression von Interferonen reguliert (Yu-Lee et al., 1990). Interferon wurde erstmals im Jahre 1957 beschrieben; das Protein schützt vor allem gegen virale Infektionen. Darüber hinaus haben Interferone antiproliferative und stimulierende zytotoxische Wirkungen (Pestka et al., 2004). Es sind 9 verschiedene *IRF* beschrieben; sie gehören zu den „immediate early genes“ (Cohen und Curran, 1988). Über die Expression von IRF-1 im Innenohr oder bei Hypoxie ist nichts bekannt.

Die myc-Familie von Transkriptionsfaktoren spielt eine fundamentale Rolle bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Gregory et al., 2000). Die myc-Familie umfasst verschiedene Gene; am besten untersucht ist die c-myc-Gruppe. Das Genprodukt von c-myc fördert die Zellproliferation und hemmt die Differenzierung (Gregory et al., 2000). „*Brain expressed myelocytomatosis oncogene*“ (*Bmyc*) gehört zu einer weniger gut untersuchten Gruppe der myc-Familie. Die Expression wurde bisher nur in speziellen Geweben nachgewiesen, deren Entwicklung hormonell gesteuert wird. Ähnlich wie c-Myc gehört auch *B-myc* zu den kurzlebigen Phosphoproteinen. Während c-myc im Innenohr nachgewiesen wurde, sind uns entsprechende Untersuchungen für *B-myc* nicht bekannt (Li und Wang, 1999). Die Expression von c-myc soll an der

Haarzellregeneration beteiligt sein. Interessant sind die Wechselwirkungen zwischen c-Myc und HIF-1 alpha. Dieser so genannte HIF-1 alpha Myc-Mechanismus scheint für die Runterregulation von Genen bei Hypoxie verantwortlich zu sein (To et al., 2005).

Interessant ist die hohe Expression von „*cAMP response element modulator*“ (*Crem*) im MOD. CREM gehört zu Familie der cAMP „response element binding proteins“. CREM ist strukturell homolog zu CREP (CRE = cAMP „response element“ = Teil des Promoters eines Gens, das eine Bindungsstelle für cAMP phosphorylierte Proteine hat; CREP = CRE „binding protein“, Protein, das an CRE binden kann; CREM = CRE „modulator protein“) (Meyer und Habener, 1992). CREP und wahrscheinlich auch CREM haben die Fähigkeit, Gene zu aktivieren, die zur Optimierung des Überlebens der Zelle, des Stoffwechsels und der Plastizität des Nervensystems beitragen (Ratan, 2004). Über das Vorkommen von *Crem* im Innenohr ist unseres Wissens nach nichts bekannt. Kürzlich wurde über eine erhöhte Expression von CREP im Innenohr nach Hypergravidität berichtet (Iijima et al., 2004).

„*CCAAT-enhancer binding Protein Beta*“ (*CEBPB*) ist ein Transkriptionsfaktor, der an die Sequenz *ccaat* bindet. Dieser Transkriptionsfaktor hat eine Funktion in der zellulären Differenzierung (Maytin und Habener, 1998).

8. Stress-Proteine und -Peptide

In diese Gruppe der zellspezifischen Stressreaktion von Proteinen haben wir Chaperone „*Heat shock protein 70*“ (HSP70) und „*Proenkephalin*“ eingeordnet. Verschiedene Isoformen von HSP70 werden in allen drei Regionen erhöht exprimiert (Tabelle 18).

Tabelle 18 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe Stress-Proteine und Peptide.

Gen	OC	MOD	SV
<i>Hsp1a/b</i>	32,1	33,7	19,1
<i>Hspa1a</i>	8,3	(n.s.)	4,5
<i>penk-rs</i>	(2,6)	7,8	(n.s.)

n.s. = nicht signifikant

„Heat shock protein 70“ (*Hspa 1a/b*, *Hspa1a*) sind Chaperone, d. h., das Protein ist involviert in die Proteinfaltung, Translokation und Herstellung der richtigen räumlichen Struktur von neusynthetisierten Proteinen (Giffard et al., 2004). Ein wichtiges Merkmal der Proteinsynthese bei Hypoxie/Ischämie ist die Fehlfaltung von Proteinen und damit die Möglichkeit der Entstehung von degenerativen Erkrankungen (Paschen, 2003). Indem HSP70 die Fehlfaltung von Proteinen hemmt, übt es zugleich eine protektive Wirkung im Sinne der Apoptose-Hemmung aus. Der Mechanismus der protektiven Wirkung ist bisher nicht eindeutig geklärt. Man hat vermutet, dass Antikörper gegen HSP70 eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielen, die zum Hörverlust führen. Das konnte nicht bestätigt werden (Yeom et al., 2003).

Das Genprodukt „*Preproenkephalin, related sequence*“ (PENK-RS) gehört als Enkephalin zur Gruppe der Opioid Peptide, die in verschiedenen neuronalen Systemen exprimiert werden (Stefano et al., 2005). Enkephaline stimulieren die Freisetzung von Chemokinen und die Chemotaxis und sind damit direkt in die immunologische Reaktion involviert. Endogene Enkephaline üben zugleich positive Wirkungen auf die Aktivität neuronaler Gewebe aus, indem sie die Exzitation begrenzen (Stefano et al., 2005). Die Stimulation der Genexpression im vorliegenden Modell erfolgt offensichtlich durch Sauerstoff-Radikale (Rosenberger et al., 2001). Das Vorkommen von Proenkephalinen im efferenten olivocochleären System hat Anlass zu der Vermutung gegeben, dass Proenkephaline in die Entstehung des peripheren Tinnitus involviert sind (Sahley et al., 1999).

9. Phosphodiesterasen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass zwei Phosphodiesterasen von besonderer Bedeutung bei der Kultivierung sind: „*Phosphodiesterase 4B*“ (*Pde4b*) und „*Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase2*“ (*Enpp2*) (Kawagoe et al., 1995; Swinnen et al., 1989) (Tabelle 19).

Tabelle 19 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der Phosphodiesterasen.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Pde4b</i>	(2,0)	6,6	(3,3)
<i>Enpp2</i>	(n.s.)	(n.s.)	5,4

n.s. = nicht signifikant

Zyklisches AMP (cAMP) ist ein bedeutender intrazellulärer Messenger für zahlreiche intrazelluläre Signale, z. B. über die Aktivierung von Proteinkinasen. cAMP entsteht aus ATP unter Einwirkung der Adenylatzyklase. Der Regulation des cAMP-Gehaltes der Zelle kommt eine wichtige Rolle zu. Die Regulation der zyklischen AMP-Konzentration steht unter dem Einfluss von Phosphodiesterasen, die c-AMP in 5`-AMP umwandeln.

Es wird angenommen, dass dem zyklischen AMP wichtige anti-inflammatorische Wirkungen zukommen (Lipworth, 2005). Die erhöhte Expression von „*Phosphodiesterase 4B*“ (*Pde4b*) in unseren Untersuchungen kann daher am ehesten als Ausdruck einer Gewebereaktion während der Kultivierung angesehen werden. Hemmer der PDE4 (Rolipram) stimulieren die Toleranz gegenüber neonataler Ischämie (Ratan, 2004). Der *Pde4* scheint eine besondere Bedeutung für die Neuroplastizität zuzukommen (Ahmed und Frey, 2005). Von den Phosphodiesterasen sind 4 Isoformen bekannt (PDE1, PDE2, PDE3, PDE4) (Swinnen et al., 1989).

„*Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2*“ (*Enpp2*) entspricht einer Unterform der Phosphodiesterase des ZNS (PD-Ialpha) (Kawagoe et al., 1995).

10. Andere

Zu der Gruppe der „anderen“ Gene, die unter Kultivierung hochreguliert wurden, haben wir eingeordnet: „*Glutamine synthetase 1*“ (*Glul*), „*Endothelin receptor type B*“ (*Ednrb*), „*Selectin, platelet*“ (*Selp*), „*Neuropeptide y*“ (*Npy*), „*Serine proteinase inhibitor, clade E, member 2*“ (*Serpine2*), „*Syntaxin 12*“ (*Stx12*), „*SMAD, mothers against DPP homolog 1*“ (*Smad1*) (Tabelle 20).

Tabelle 20 Unter Kultivierung hochregulierte Gene der Gruppe der „anderen“ Gene.			
Gen	OC	MOD	SV
<i>Glul</i>	4,4	6,4	5,9
<i>Ednrb</i>	(2,1)	(2,7)	4,2
<i>Selp</i>	(n.s.)	5,1	(n.s.)
<i>Npy</i>	(n.s.)	7,6	(n.s.)
<i>Serpine2</i>	4,2	28,1	(2,3)
<i>Stx12</i>	15,0	15,8	10,8
<i>Smad1</i>	(2,7)	5,8	(3,9)

n.s. = nicht signifikant

Unter Kultivierung wurde in allen drei Regionen OC, MOD und SV die *Glul* hochreguliert.

Das Genprodukt der „*Glutamine synthetase 1*“ (GLUL), auch als GS1 abgekürzt, findet sich im Zytoplasma (Gomez-Maldonado et al., 2004). Es katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat und NH₃ unter Energieverbrauch (ATP). *Glul* spielt eine zentrale Rolle bei der Entgiftung des Gewebes von NH₃ und in der metabolischen Regulation des Neurotransmitters Glutamat (Suarez et al., 2002). Da Glutamat in hohen Konzentrationen toxisch wirkt, kann der Abbau durch die *Glul* neuroprotektiv wirken (Kanai und Hediger, 2004). Glutamat ist der wesentliche afferente Neurotransmitter im Innenohr und stimuliert

ionotrope und metabotrope Rezeptoren (Nordang et al., 2000). Immunozytochemisch konnte *Glul* in Stützzellen, Schwannschen Zellen und Fibroblasten der Cochlea nachgewiesen werden (Ottersen et al., 1998; Takumi et al., 1997). Von speziellem Interesse ist, dass die Zugabe von Methioninsulfoximin, welches *Glul* inhibiert, zum Haarzellverlust führt (Ottersen et al., 1998). Die Expression von *Glul* nahm unter Ischämie *in vivo* (Petito et al., 1989; Petito et al., 1992) oder unter Hypoxie in Kultur zu (Sher, 1990). Im ZNS konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der *Glul*-Astrozyten gegen eine hypoxische Schädigung schützt (Kelleher et al., 1994). Die Bedeutung der *Glul* wird durch unsere Ergebnisse unterstützt.

„*Endothelin receptor type B*“ (*Ednrb*) ist eine Rezeptor-Untereinheit für Endothelin. Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, das in vaskulären Endothelzellen synthetisiert wird. Es ist der stärkste endogen gebildete Vasokonstriktor. Endothelin bindet an EDNRA, der an vaskulären glatten Muskelzellen lokalisiert ist, und ruft darüber eine Vasokonstriktion hervor. Endothelin-Rezeptoren sind aber auch in die Vasodilatation involviert. Über die Bindung von Endothelin an den EDNRB, der an vaskulären Endothelzellen exprimiert wird, kommt es zur Modulation von NO und Prostaglandin-Freisetzung und zu einer Vasodilatation (Kiel, 2000). Alternativ exprimieren einige Gefäße *Ednrb* auch in den glatten Muskelzellen und führen dort zur Vasokonstriktion. Interessanterweise führen *Ednrb*-Mutationen unter anderem zur sensoneuralen Taubheit mit Haarzellverlust (Waardenburg-Hirschsprung Erkrankung) (Matsushima et al., 2002; Syrris et al., 1999). In der Spiralarterie des MOD konnte bis jetzt nur der *Ednra* nachgewiesen werden (Scherer et al., 2001). Unter Kultivierung zeigte sich, dass der *Ednrb* nur in SV hochreguliert wird.

„*Selectin, platelet*“ (*Selp*) ist ein initialer Mediator der Zell-Zell-Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel-Zellen (Schnaar, 2004). Unter Kultivierung wurde dieses Gen nur im MOD hochreguliert. Die Infiltration von Entzündungszellen in das Innenohr ist

essentiell für eine immunologische Antwort auf ein Antigen. Die Hochregulation von E-Selectin wurde bei Mittelohrentzündungen beschrieben (Russo et al., 2004).

„*Neuropeptide y*“ (NPY) induziert eine Vasokonstriktion über sympathische Kontrollmechanismen. In der Cochlea wurde *Npy* entlang der Blutgefäße, des Spiralligamentes und des cochleären Nervs, aber nicht im OC gefunden (Itou et al., 2001). Unter Kultivierung wurde *Npy* nur im MOD hochreguliert. Verschiedene Stresssituationen führen zur Ausschüttung von NPY und/oder Noradrenalin aus den vaskulären sympathischen Nerven und zur Vasokonstriktion der Cochlea-Gefäße. Experimentell konnte eine kontinuierliche Reduktion des cochleären Blutflusses (CBF) durch systemische und perilymphatische Gabe von NPY gezeigt werden (Itou et al., 2001). Ein anderer interessanter Aspekt ist, dass *Npy* eine generelle neuroprotektive Rolle im Striatum hat (Thiriet et al., 2005).

Die Mitglieder der Serpine-Genfamilie spielen eine wichtige Rolle in der Blutgerinnungskaskade, bei Entzündungsreaktionen und der Komplement-Aktivierung. Die Expression von „*Serine proteinase inhibitor, clade E, member 2*“ (*Serpine2*) ist bis jetzt nicht im Ohr beschrieben worden. Auffällig ist, dass dieses Gen besonders im MOD hochreguliert wird.

Die potenzielle Bedeutung von „*Syntaxin 12*“ (*Stx12*) spiegelt sich darin wider, dass es unter Kultivierung in allen 3 Regionen der Cochlea zur Hochregulation des Gens kam. *Stx12* ist ein Bestandteil des SNARE („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“). SNARE spielt die bedeutendste Rolle beim Andocken und der Fusion von diversen Vesikeln gestützten Transportprozessen (Hong, 2005). Weiterhin ist *Stx12* Bestandteil im intrazellulären Aquaporin2-Vesikel (Barile et al., 2005). Kürzlich wurde über eine erhöhte Expression von Syntaxin im Innenohr nach Hypergravidität berichtet (Iijima et al., 2004). Die erhöhte Expression von Syntaxin wird mit der synaptischen Plastizität des peripheren vestibulären Systems in Verbindung gebracht.

Syntaxin ist ein neural-spezifisches Protein, das in der Plasmamembran lokalisiert ist und mit synaptischen Proteinen und Ca^{2+} -Kanälen zusammenwirkt.

Die Genprodukte der Signalkaskade der „*SMAD, mothers against DPP homolog*“ (*Smad1*) regulieren die Zelldifferenzierung im embryonalen Nervensystem (Anglely et al., 2003). Im Zebrafisch konnte *Smad1* in den statoakustischen und lateralen Ganglien nachgewiesen werden, während im Ohrepithel *Smad5* exprimiert wird (Mowbray et al., 2001). Unter Kultivierung zeigte sich nur im MOD eine Hochregulation dieses Gens, wahrscheinlich als Ausdruck der Differenzierung.

3.6.5.2. Analyse der Gene, die unter Kultivierung runterreguliert wurden

Die Tabellen 21-27 zeigen die Gene, die unter Kultivierung runterreguliert wurden. In den Tabellen werden jeweils die allgemeine Funktion, eine evtl. bekannte spezielle Funktion im Innenohr, das Ausmaß der Runterregulation und Literaturnachweise aufgeführt.

Die Tabelle 21 stellt die runterregulierten Gene der Gruppe Wachstum und Zytoskelett dar. In dieser Gruppe erfolgten die meisten Veränderungen im MOD.

In der Tabelle 22 sind die Gene der Gruppe Ionenkanäle zusammengefasst. Auch hier zeigte sich die stärkste Runterregulation im MOD.

Die Tabelle 23 zeigt die Gene der Gruppe Neurotransmission, die unter Kultivierung runterreguliert wurden. Sowohl im OC als auch im MOD zeigten sich hier verstärkte Veränderungen.

Die Tabelle 24 zeigt die Genveränderungen der Gruppe Signaltransduktion unter Kultivierung. Im OC zeigten sich die stärksten Veränderungen.

In die Gruppe Apoptose konnte nur die Caspase 2 eingeordnet werden. Weitere runterregulierte Apoptose-Gene ließen sich nicht nachweisen (Tabelle 25).

In der Tabelle 26 sind die Gene der Gruppe Transportproteine dargestellt, die unter Kultivierung runterreguliert wurden.

In die Gruppe der Proteinsynthese konnte nur das Gen *Fez1*/*“Fasciculation and elongation protein zeta 1“* eingeordnet werden (Tabelle 27).

Tabelle 21 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Wachstum und Zytoskelett.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Mbp</i>	Myelin basic protein	Hauptkomponente der Myelinscheide im ZNS	Immunhistochemischer Nachweis im N. cochlearis und N. vestibularis	0,2	0,1	(n.s.)	(Harauz et al., 2004; Toesca, 1996)
<i>Mbz</i>	Myelin protein zero	Komponente der Myelinscheide im peripheren NS	Mutation führt zur Surditas	(0,3)	0,25	(n.s.)	(Quarles, 2002; Starr et al., 2003)
<i>RG: 621458</i>	Neurofilament light polypeptide	Teil des Zytoskeletts, neuronal	Nachweis im Spiralligament	(0,4)	0,1	(n.s.)	(Grant und Pant, 2000; Hsu et al., 1997)
<i>Nefh</i>	Neurofilament heavy polypeptide	Teil des Zytoskeletts, neuronal	Nachweis im Spiralligament	(0,3)	0,03	(n.s.)	(Grant und Pant, 2000; Hsu et al., 1997)
<i>Thra</i>	Thyroid hormone receptor alpha	Notwendig für die normale Entwicklung des ZNS	Notwendig für die normale Entwicklung des auditorischen Systems	(0,4)	0,2	(0,4)	(Flamant und Samarut, 2003; Knipper et al., 2000)
<i>Vcam1</i>	Vascular cell adhesion molecule 1	Verantwortlich für die Adhäsion und Verankerung von Entzündungszellen	Nachweis in Fibrozyten-Kulturen im Spiralligament	(0,5)	0,2	(n.s.)	(Black und Garbutt, 2002; Ichimiya et al., 2003)
<i>Mapt</i>	Microtubule associated protein tau	Unbekannte Funktion, wahrscheinlich Neuritenwachstum und axonaler Transport	Nachweis in der Cochlea des menschlichen Feten in intraganglionären Spiralfasern	(0,4)	0,1	(n.s.)	(Despres et al., 1994; King, 2005)
<i>Mtap2</i>	Microtubule associated protein 2	Spielt eine wichtige Rolle während post-traumatischer regenerativer Prozesse im ZNS und in der Cochlea	Spielt eine wichtige Rolle während posttraumatischer regenerativer Prozesse in der Cochlea	(n.s.)	0,2	(n.s.)	(Ladrech et al., 2003)
<i>Fgfr4</i>	Fibroblast growth factor receptor 4	Bindungsstelle für FGF, verantwortlich für autokrines Wachstum (Replikation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen)	Nachweis im OC und SV über RT-PCR	(n.s.)	(n.s.)	0,25	(Guntinas-Lichius, 2002; Malgrange et al., 1998; Wright et al., 2003)

n.s. = nicht signifikant

Tabelle 22 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Ionenkanäle.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>RGD: 61922</i>	Sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide	Wichtig für Generierung des Aktionspotentials	Nachweis in OC, cochleären Ganglien und N. cochlearis	0,25	0,04	(n.s.)	(Hossain et al., 2005)
<i>RGD: 628710</i>	Voltage-gated channel like 1	Struktur-Domäne von voltage-gated Ca ²⁺ - und Na ⁺ -Kanälen, Funktion nicht näher charakterisiert	Vorkommen im Ohr nicht beschrieben	(0,3)	0,1	0,2	(Lee et al., 1999)
<i>Cln3</i>	Chloride channel 3	Wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der elektrischen Erregbarkeit und den transepithelialen Transport	Nachweis in der Plasmamembran der ÄHZ und in der cochleären lateralen Wand	(0,5)	0,2	(n.s.)	(Kasper et al., 2005; Kawasaki et al., 1999; Oshima et al., 1997)
<i>Kcnj11</i>	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	Kontrollieren den K ⁺ -Transport über die Zellmembran in verschiedenen Zelltypen, bei Mutation permanenter neonataler Diabetes mellitus	Vorkommen im Ohr nicht beschrieben	(n.s.)	0,1	(n.s.)	(Proks et al., 2005)
<i>Kcnel</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	Verantwortlich für Stabilität von KCNQ1	Involviert in die K ⁺ -Sekretion in die Endolymphe der Cochlea, Mutationen führen zur Surditas und zum Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom	(n.s.)	(n.s.)	0,2	(Embark et al., 2003; Nicolas et al., 2001)

n.s. = nicht signifikant

Tabelle 23 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Neurotransmission.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Tacl1</i>	Tachykinin 1	Kodiert Preprotachykinin A, der biologisch synthetisierte Vorläufer der Substanz P, Neurokinin A und B, Neuropeptid y, involviert in die Neuroimmunomodulation	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	0,2	(n.s.)	(n.s.)	(Conlon und Larhammar, 2005; Pennefather et al., 2004)
<i>Stxbp1</i>	Syntaxin binding protein 1	Reguliert den Gehalt des freien Syntaxins	Vorkommen im OC beschrieben	0,25	(0,3)	(n.s.)	(Safieddine et al., 2002)
<i>Snca</i>	Synuclein alpha	Präsynaptisches Protein, in Neuronen vorkommend und Teil des Zytoskeletts, Rolle bei der Regeneration von Neuronen und Axonen	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	(0,25)	(n.s.)	(n.s.)	(Adamczyk et al., 2005; Quilty et al., 2003)
<i>Sncg</i>	Synuclein gamma	Hochregulation in verschiedenen Tumoren, Rolle für Integrität des Neurofilament-Netzwerkes	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	(n.s.)	0,1	(n.s.)	(Surguchov et al., 2001)
<i>Nrxn2</i>	Neurexin 2	Neuronales Zell-Oberflächen-Protein, wahrscheinlich Rezeptorfunktion für die Bindung von Signalmolekülen z.B. Zell-Adhäsionsmoleküle, Interaktion mit der extrazellulären Matrix	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	(0,5)	0,2	(n.s.)	(Missler und Sudhof, 1998)
<i>Nnat</i>	Neuronatin	Funktion unbekannt, Expression in neuronalen Zellen, wahrscheinlich Protektion während Entwicklung	Expression im Innenohr während Entwicklung	(n.s.)	0,2	(n.s.)	(Wijnholds et al., 1995; Zheng et al., 2002)
<i>Oprk1</i>	Opioid receptor kappa 1	Opiode sind analgetisch wirkende Substanzen, die GABAerge Interneurone und GABA-Freisetzung hemmen	Nachweis in IHZ, ÄHZ und Spiralganglien, Rolle in der Entwicklung des Innenohres	(n.s.)	0,2	(n.s.)	(Christie et al., 2000; Jongkamonwiwat et al., 2003; Phansuwan-Pujito et al., 2003)
<i>Gabbr1</i>	GABA B receptor 1	Bindungsstelle für GABA, überwiegend inhibitorisch wirkend, GABA A und B Rezeptoren wirken aber auch exzitatorisch in einigen Modellen	Expression pränatal in Neuronen des Spiralganglion, ändert nicht Expression während Entwicklung	(0,3)	(n.s.)	0,2	(Lin et al., 2000; Schousboe, 1999)
<i>Maob</i>	Monoamine oxidase B	Abbau von Monaminen, wie Serotonin, NA und Dopamin, bevorzugt Serotonin als Substrat	Nachweis in Blutgefäßen der Cochlea	(0,3)	(0,3)	0,25	(Caramona, 1983; Ikemoto et al., 1997)

n.s. = nicht signifikant

Tabelle 24 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Signaltransduktion.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Ntrk2</i>	Neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2	Rezeptor mit spezifischer Proteinkinaseaktivität, zusammen mit Gpr (s.u.) Beeinflussung von Proliferation, Differenzierung und Überleben	Vorkommen im Innenohr	0,2	(n.s.)	(n.s.)	(Guitton et al., 2004; Middlemas et al., 1991; Piiper und Zeuzem, 2004)
<i>S100b</i>	S 100 protein, beta polypeptide	Ca ²⁺ -bindendes Protein, Bedeutung für neuronale Entwicklung, insbesondere des serotonergen Systems, Überexpression führt zu neurodegenerativen Veränderungen (Down-Syndrom)	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	0,2	(0,3)	0,1	(Borella et al., 2003; Mrak und Griffin, 2004; Piiper und Zeuzem, 2004)
<i>Gnao</i>	Guanine nucleotide binding protein, alpha o	Übermittelt Signale von Hormonen, Neurotransmittern und sensorischen Reizen, GTP-Bindung aktiviert G-Protein, in Zellmembran lokalisiert	Im Vestibulum nachgewiesen	(0,4)	0,1	(n.s.)	(Cioffi et al., 2003; Jones und Reed, 1987; Piiper und Zeuzem, 2004; Waters et al., 2004; Watson et al., 1996)
<i>Gpr51</i>	G protein-coupled receptor 51	Nach Bindung der Liganden (Serotonin, Adrenalin) wird ein G-Protein aktiviert, das weitere Effektormoleküle aktiviert	Im Innenohr nachgewiesen	(n.s.)	0,1	(n.s.)	(Guitton et al., 2004; Waters et al., 2004; Watson et al., 1996)

Tabelle 25 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Apoptose.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Casp2</i>	Caspase 2	Cystein-Protease, Beteiligung an Apoptose in neuronalen Geweben	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	(n.s.)	(n.s.)	0,2	(Biebl et al., 2005)

n.s. = nicht signifikant

Tabelle 26 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Transportproteine.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Atp1b1</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ -transporting, beta1 polypeptide	ATP-abhängiges Transportprotein für K ⁺ und Ca ²⁺ , fundamental für Innenohrhomeostase	Im Innenohr gut untersucht	(n.s.)	0,1	(n.s.)	(Dallos, 1996)
<i>Slc1a3</i>	Solute carrier family 1, member 3	Transportprotein der Familie SLC, vermittelt den Transport von Glutamat	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	(0,5)	0,2	(0,5)	(Hediger et al., 2004; Kanai und Hediger, 2004)
<i>Slc1a4</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1a4	Transportprotein der Familie SLC, vermittelt den Transport von neutralen Aminosäuren	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	(n.s.)	(0,3)	0,2	(Hediger et al., 2004; Kanai und Hediger, 2004)

Tabelle 27 Unter Kultivierung runterregulierte Gene der Gruppe Proteinsynthese.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Fez1</i>	Fasciculation and elongation protein zeta 1	Involviert in das Neuriten- und Axonwachstum	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben	0,2	(n.s.)	(n.s.)	(Honda et al., 2004)

n.s. = nicht signifikant

3.6.6. Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression (S3)

Um den Haarzell-Schaden zu begrenzen, wurde bewusst eine milde Hypoxie gewählt (5 h). Der Grad der Hypoxieschädigung wurde mit der Erstellung von Cochleogrammen der normoxischen und hypoxischen Kultur ermittelt. Bei Kultivierung unter normoxischen Bedingungen erhielten wir ein normales Cochleogramm (nicht gezeigt). Das hypoxische Cochleogramm zeigte dagegen einen deutlichen Haarzellverlust besonders im medialen und basalen Cochlea-Segment, wobei die IHZ sind signifikant stärker geschädigt als die ÄHZ ($p = 0,00$) (Abb. 40).

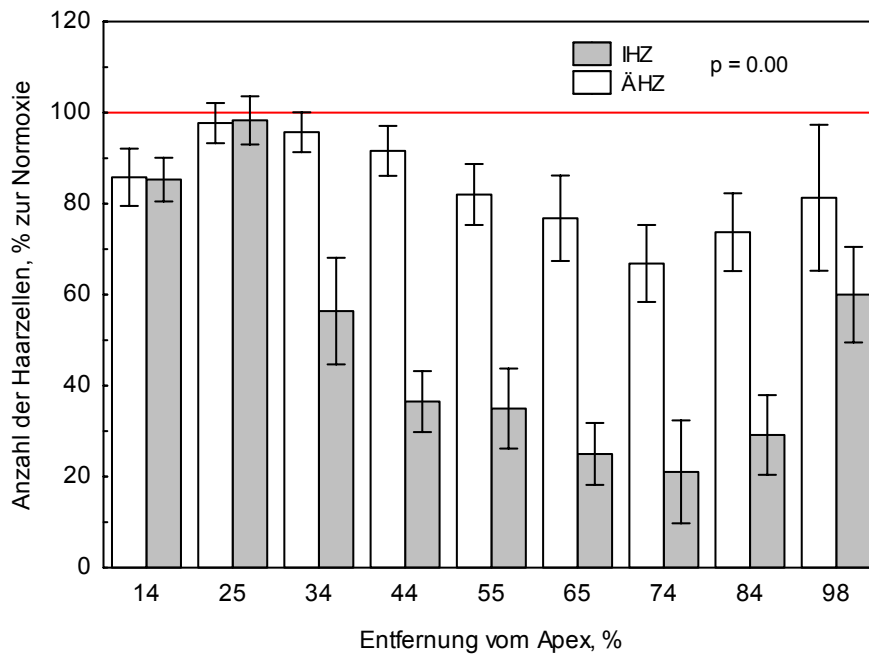


Abb. 40 Cochleogramm für die inneren (grau) und äußeren (weiß) Haarzellen (IHZ/ÄHZ) nach 5 h Hypoxie (% zur Normoxie). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (n = 9-13).

Die Veränderung der Genexpression durch 5 h Hypoxie war verglichen mit jener der Kultivierung gering. Als Kriterium für eine Hochregulation der Gene wählten wir daher den Faktor 1,6 und für die Runterregulation den Faktor 0,5. Sowohl die Anzahl der Gene als auch das Ausmaß der Expressionshöhe war gegenüber der Kultivierung deutlich vermindert (Tabelle 28). Da wir allen Veränderungen einen VK von $\leq 30\%$ zu Grunde legen, ist anzunehmen, dass die folgenden beschriebenen Gen-Veränderungen als statistisch signifikant zu werten sind, wobei die statistische Sicherheit geringer ist als bei jenen Genen, die eine Veränderung um den Faktor $\geq 2,0$ zeigen. Daher sind die nicht besetzten Felder der Tabellen 29-39 als nicht signifikant (n.s.) anzusehen.

Tabelle 28 Anzahl der unter Hypoxie (5 h) hoch- und runterregulierten Gene.		
Cochlea Region	> 1,6fach	< 0,5fach
OC	1	1
MOD	9	2
SV	8	9

Für die funktionelle Betrachtung wurden die hochregulierten Gene in folgende Gruppen eingeteilt:

- Wachstumsfaktoren, Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren, Neurotransmission, Apoptose

Bei der Bewertung der Gene, die unter Hypoxie runterreguliert wurden, haben wir uns für folgende Gruppen entschieden:

- Wachstum/Zytoskelett, Apoptose, Cytokine, Redoxstoffwechsel, Signaltransduktion, Transkriptionsfaktoren

3.6.6.1. Gene, die unter Hypoxie hochreguliert wurden

Die Tabellen 29-33 zeigen die Gene, die unter 5 h Hypoxie hochreguliert wurden. In den Tabellen sind jeweils die allgemeine Funktion, eine evtl. bekannte spezielle Funktion im Innenohr, das Ausmaß der Hochregulation und Literaturnachweise aufgeführt.

Die Tabelle 29 zeigt die Gene der Gruppe der Wachstumsfaktoren, die unter Hypoxie hochreguliert wurden.

In der Tabelle 30 sind die hypoxischen Veränderungen in der Gengruppe Transkriptionsfaktoren dargestellt. Interessanterweise zeigten sich in dieser Gruppe Hochregulationen nur in der SV.

In der Gruppe der Ionenkanäle zeigten sich unter Hypoxie nur Veränderungen im MOD und SV. Dies wird in der Tabelle 31 dargestellt.

In der Tabelle 32 sind die hochregulierten Gene der Gruppe Neurotransmission enthalten.

Die Tabelle 33 zeigt die hochregulierten Apoptosegene unter Hypoxie. Im OC war keine Hochregulation zu verzeichnen.

Tabelle 29 Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Wachstumsfaktoren.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Igf1r</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	Rezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität, stimuliert das Wachstum, entscheidender Rezeptor für IGF 1 und IGF2	Im Innenohr beschrieben	1,6			(Camirand et al., 2005; Saffer et al., 1996)
<i>Igf2</i>	Insulin-like growth factor	Wichtiger Wachstumsfaktor in der fetalen Entwicklung, Regulation der Expression über IGFbp, zu 70% identisch mit IGF 1	Im Innenohr beschrieben		1,8		(Tisi et al., 2005; Varela-Nieto et al., 2004)
<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor	Beeinflusst Entwicklungs- und Reparatur-Prozesse, im ZNS im Astrozyten beschrieben	Rolle bei Regeneration im Innenohr		1,6		(Reuss und Bohlen und, 2003; Walshe et al., 2003)

Tabelle 30 Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Transkriptionsfaktoren.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Cited2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator	Kernprotein, das mit den Transaktivatoren der Transkription CBE/p300 zusammenwirkt und die Genexpression in Hypoxie zugunsten HIF1 reguliert, Störung der Entwicklung des ZNS und der Sinnesorgane bei Knockout-Mäusen	Vorkommen im Ohr nicht beschrieben			1,6	(Mazure et al., 2004; Schneider et al., 2003)
<i>Neud4</i>	Neuronal d4 domain family member	Neurospezifisch, Modulation der Transkription	Vorkommen im Ohr nicht beschrieben			1,6	(Buchman et al., 1999; Chestkov et al., 1996; Ninkina et al., 2001)
<i>Junb</i>	Jun-B oncogen	Gehört zur Gruppe der immediate early genes	Im Innenohr beschrieben			1,7	(Zine und Van De Water, 2004)

Tabelle 31 Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Ionenkanäle.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Scn3a</i>	Sodium channel, voltage-gated, type III, alpha polypeptide	Prädominanter embryonaler Kanal, aber auch im adulten Gewebe (besonders ZNS)	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben		2,0		(Chen et al., 2000)
<i>RGD: 61922</i>	Sodium channel, voltage-gated, type VI, alpha polypeptide	Wichtig für Generierung des Aktionspotenzials	Nachweis in OC, cochleären Ganglien und N. cochlearis		1,6		(Hossain et al., 2005)
<i>Kcnj1</i>	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 1	Für die K ⁺ -Rückresorption wesentlicher Kanal	Mutationen führen zum Barttersyndrom, gekennzeichnet durch Nierenfunktionsstörung und Taubheit		1,8		(Hebert, 2003)
<i>Atp2a3</i>	ATPase, Ca ²⁺ transporting	Plasma-Membran-Protein, essentiell für Na ⁺ - und K ⁺ -Gradienten	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben		1,7		(Moseley et al., 2003)
<i>Atp1a2</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	Plasma-Membran-Protein, essentiell für den Na ⁺ - und K ⁺ -Gradienten, Mutationen führen zur hemiplegischen Migräne	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben			1,6	(Cannon, 2004; Ikeda et al., 2004)
<i>Vdac1</i>	Voltage-dependent anion channel 1	Essentielle Rolle für den Zellstoffwechsel und interagiert mit Bcl-2, Einfluss auf die Feinmodulation zwischen Pro- und Anti-Apoptose	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben			1,7	(Liberatori et al., 2004)
<i>RGD: 628710</i>	Voltage-gated channel like 1	Struktur-Domäne von Voltage-gated Ca ²⁺ - und Na ⁺ -Kanälen, Funktion nicht näher charakterisiert	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben			1,6	(Lee et al., 1999)

Tabelle 32 Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Neurotransmission.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Chrm2</i>	Cholinergic receptor, muscarinic 2	ACH-Rezeptor, Aktivierung des Rezeptors führt zur erhöhten Expression von HIF-1 alpha	Moduliert efferente Signale von Haarzellen, besonders in Deiterszellen exprimiert		1,7		(Guth und Norris, 1996; Khan et al., 2002)
<i>Grm6</i>	Glutamate receptor, metabotropic 6	Wirken über G-Protein, Mutationen sind mit Nachtblindheit verbunden	Typ I und II im Innenohr beschrieben		1,7		(Dryja et al., 2005; Kuramoto et al., 1994; Oestreicher et al., 2002; Simeone et al., 2004)
<i>Nxph4</i>	Neurexophilin 4	Wichtig für die Neurotransmitter-Freisetzung	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben			1,9	(Beglopoulos et al., 2005; Clarris et al., 2002)

Tabelle 33 Unter Hypoxie hochregulierte Gene der Gruppe Apoptose.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Capn3</i>	Calpain 3	Eine für die Aktivität wesentliche Untereinheit des Calpains, kann über Caspasen Apoptose steuern	Calpain-Blocker mindern lärminduzierten Hörverlust		1,9		(Chan und Mattson, 1999; Stracher, 1999)
<i>Birc2</i>	Baculoviral IAP repeat containing 2	Endogener Caspase-Inhibitor, neuroprotektive Wirkung, durch <i>Epo</i> hochreguliert	Vorkommen nicht im Ohr beschrieben			1,9	(Emamaullee et al., 2005; McKinnon et al., 2002)

3.6.6.2. Gene, die unter Hypoxie runterreguliert wurden

Die Tabellen 34-39 zeigen die Gene, die unter 5 h Hypoxie runterreguliert wurden. In den Tabellen sind jeweils die allgemeine Funktion, eine evtl. bekannte spezielle Funktion im Innenohr, das Ausmaß der Runterregulation und Literaturnachweise aufgeführt.

In der Gruppe Wachstum/Zytoskelett und in der Gruppe Apoptose zeigten sich nur geringe Veränderungen der Genexpression (Tabellen 34 und 35)

In der Gruppe Cytokine fand sich unter Hypoxie eine Vielzahl von runterregulierten Genen. Interessanterweise zeigten sich die Genveränderungen überwiegend in der SV (Tabelle 36).

Die Gruppe Redoxstoffwechsel, die ja für hypoxische Veränderungen eine wesentliche Bedeutung haben, ist in der Tabelle 37 dargestellt. Bemerkenswerterweise zeigten sich Runterregulationen dieser Gengruppe nur in der SV.

In den Gruppen Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren zeigten sich unter Hypoxie nur geringe Genveränderungen. Die Tabellen 38 und 39 zeigen die runterregulierten Gene.

Tabelle 34 Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Wachstum/Zytoskelett.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>RGD: 621458</i>	Neurofilament, light polypeptide	Teil des Zytoskeletts neuronal	Nachweis im Spiralligament	0,5			(Grant und Pant, 2000; Hsu et al., 1997)

Tabelle 35 Gene der Gruppe Apoptose, die unter Hypoxie runterreguliert werden.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Prnp</i>	Prion protein	Kupferbindendes Protein, verhindert Fehlfaltung der DNA, involviert in oxidativen Stress, hemmt die Bax-induzierte Apoptose	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung geht mit Hörstörungen einher			0,5	(Krishna und Bauer, 2004; McLennan et al., 2004; Nishimura et al., 2004)

Tabelle 36 Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Cytokine.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	Proinflammatorische Cytokine	In Fibrozyten des Innenohres beobachtet		0,5	0,4	(Satoh et al., 2002; Satoh et al., 2003)
<i>Il8</i>	Interleukin 8	Interaktion mit Leukozyten unter Entzündung	Enthalten im Mittelohrerguss			0,5	(Iguchi und Anniko, 1998)
<i>Il15</i>	Interleukin 15	Induziert entzündliche Prozesse, wird konstitutiv exprimiert, hat anti-apoptotische Fähigkeit	Vorkommen nicht im Innenohr bekannt			0,5	(Beck, Jr. et al., 2005)
<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	Aktivieren verschiedene Chemokin-Rezeptoren und wirken auf das Zell-Überleben, die Zell-Proliferation und auf die synaptische Transmission, beteiligt an der Chemotaxis von Monocytentransmission	Vorkommen nicht im Innenohr bekannt			0,4	(Cartier et al., 2005)
<i>C9</i>	Complement component 9	Mitbeteiligung an immunologischen und Entzündungsreaktionen	Complement im Rahmen von immunologischen und Entzündungsreaktionen des Innen- und Mittelohres sind gut bekannt			0,4	(Harris et al., 1997; Narkio-Makela et al., 2000)

Tabelle 37 Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Redoxstoffwechsel.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase 1	Katalysiert den Abbau von Häm, wobei Billiverdin, Kohlenstoffmonoxid und Eisen freigesetzt werden	Hmox1 und Hmox2 wurden bereits immunhistochemisch in den Stützzellen des OC und in Zellen des Spiralganglions nachgewiesen			0,5	(Watanabe et al., 2003b)
<i>Gsta5</i>	Glutathion-S-transferase A5	Glutathion-S-Transferase katalysiert die Konjugation von Toxinen und deren Abbauprodukten mit Glutathion und spielt bedeutende Rolle in der antioxidativen Protektion	In der Cochlea sind bis jetzt 3 Isoformen immunhistochemisch nachgewiesen worden			0,4	(Takumi et al., 2001; Whitlon et al., 1999)

Tabelle 38 Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Signaltransduktion.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Adora2b</i>	Adenosine A2B receptor	Wirkt protektiv bei Ischämie	Im Innenohr auch unter Ischämie nachgewiesen			0,5	(Ashton et al., 2003; Ford et al., 1997; Ramkumar et al., 2004; Stracher, 1999; Tabuchi et al., 1999)

Tabelle 39 Unter Hypoxie runterregulierte Gene der Gruppe Transkriptionsfaktoren.							
Gen	Name	Funktion	Funktion Cochlea	OC	MOD	SV	Literatur
<i>Crem</i>	cAMP responsive element modulator	Gehört zu Familie der cAMP response element binding proteins, Fähigkeit, Gene zu aktivieren, für Optimierung des Überlebens der Zelle, des Stoffwechsels und der Plastizität des Nervensystems	Vorkommen nicht im Innenohr nachgewiesen		0,5		(Ratan, 2004)

3.6.7. Veränderung von „Prestin“ als Schlüsselgen der äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur der Cochlea

Wenn die ÄHZ geschädigt werden, senkt sich die Hörschwelle auf 40-50 dB ab (Ryan und Dallos, 1975). Für die Funktion der ÄHZ ist das Protein Prestin von entscheidender Bedeutung. Da das Prestin-Gen (verständlicherweise) auf dem neurobiologischen Chip nicht enthalten ist und aufgrund der bereits in der Einleitung beschriebenen bedeutenden Rolle von Prestin für die Haarzellfunktion, ist es wichtig, die Veränderungen der Prestin mRNA-Expression durch schädigende Faktoren zu untersuchen, um damit die Regulation auf Transkriptionsebene besser zu verstehen. Demzufolge haben wir Prestin mRNA mittels RT-PCR qualitativ und quantitativ nachgewiesen (Gross et al., 2005).

Prestin mRNA *in vitro*

Für diese Untersuchungen wurde die organotypische Kultur der Cochlea, wie bereits im Methodenteil beschrieben, verwendet. Der Prestin mRNA-Gehalt wurde über kompetitive RT-PCR mit einem synthetischen internen Standard gleicher Länge wie die Target mRNA bestimmt.

Da Prestin nur in den ÄHZ vorkommt ist es gut möglich, die mRNA-Menge als Indikator für die Beurteilung des Haarzellverlustes zu nutzen. Die Hypothese kann man über die Korrelation der Länge des OC, die eine definierte Zahl von ÄHZ reflektiert, zu

der ermittelten Prestin mRNA-Menge nachprüfen. Zunächst wurden 5, 8, 11, 16 und 20 Fragmente des OC von verschiedenen Tieren präpariert, die Fragment-Länge gemessen und die gepoolte totale RNA und Prestin mRNA ermittelt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit unserer Prestin mRNA-Bestimmung wurden zwei unabhängige experimentelle Serien durchgeführt. In beiden Serien zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen totaler RNA und Prestin mRNA-Menge ($p < 0,05$). Quantitativ bestand ein geringer Unterschied zwischen den Serien im Prestin-Gehalt (70 und 80 fg/ μ g total RNA), der wahrscheinlich mit geringen Unterschieden in der Reife der Tiere zu erklären ist.

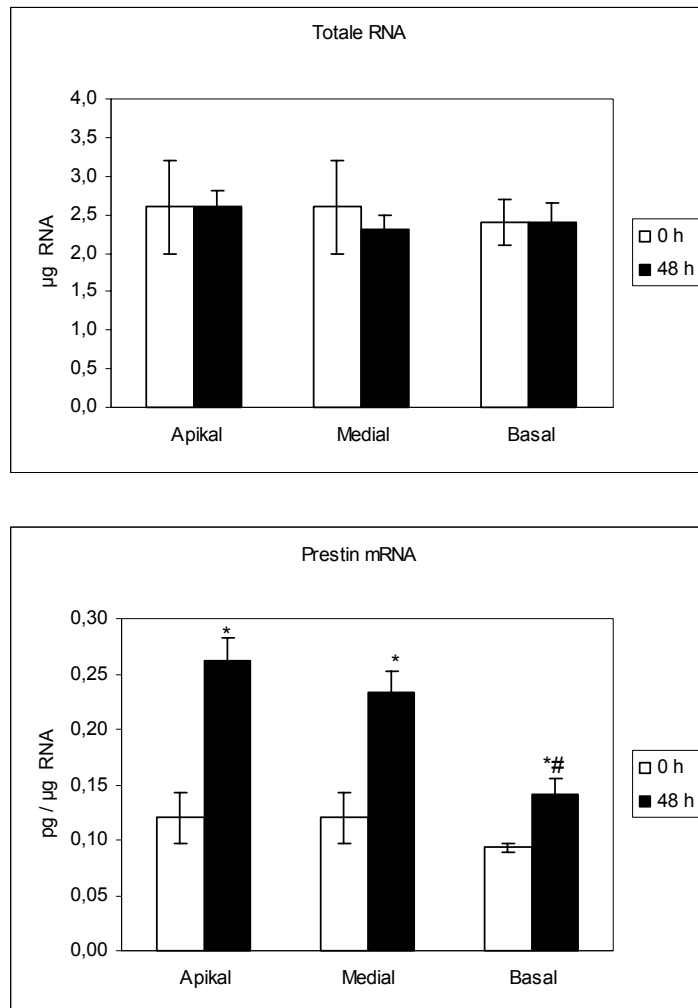


Abb. 41 Totale RNA (oben) und Prestin mRNA (unten) in den 3 cochleären Segmenten während der Kultivierung *in vitro*. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 6$). * $p < 0,001$ vs. sofort; # $p < 0,01$ vs. apikal bzw. medial.

Um den Prestin mRNA-Gehalt *in vitro* während der Entwicklung in den Cochlea-Segmenten apikal, medial und basal zu bestimmen, definierten wir zwei Gruppen: a) Bestimmung des Prestin mRNA-Gehaltes der Fragmente direkt nach Präparation am 3.-5. postnatalen Tag (0 h, Abb. 41), b) Kultivierung der Fragmente für 2 Tage und im Anschluss Bestimmung des Prestin mRNA-Gehaltes (48 h, Abb. 41). Der totale RNA-Gehalt war am 3.-5. postnatalen Tag und zwei Tage später identisch. Im Gegensatz dazu stieg der Prestin mRNA-Gehalt während der *in vitro* Entwicklung mit dem Faktor zwei im apikalen und medialen Segment und um ca. 30 % im basalen Segment an. Der Prestin mRNA-Gehalt war im apikalen und medialen Segment höher als der im basalen Segment.

Prestin mRNA *in vivo*

Zum Vergleich der *in vitro* Entwicklung mit *in vivo* Prozessen präparierten wir frische apikale, mediale und basale Segmente des OC von 3, 5 und 7 Tage alten Ratten und bestimmten die Prestin mRNA-Expression. Die Ergebnisse bestätigen die *in vitro* Beobachtungen. *In vivo* zeigte sich ebenfalls ein Anstieg des Prestin mRNA-Gehaltes während der Entwicklung und ein apikal-basaler Gradient der Prestin mRNA Verteilung (Abb. 42).

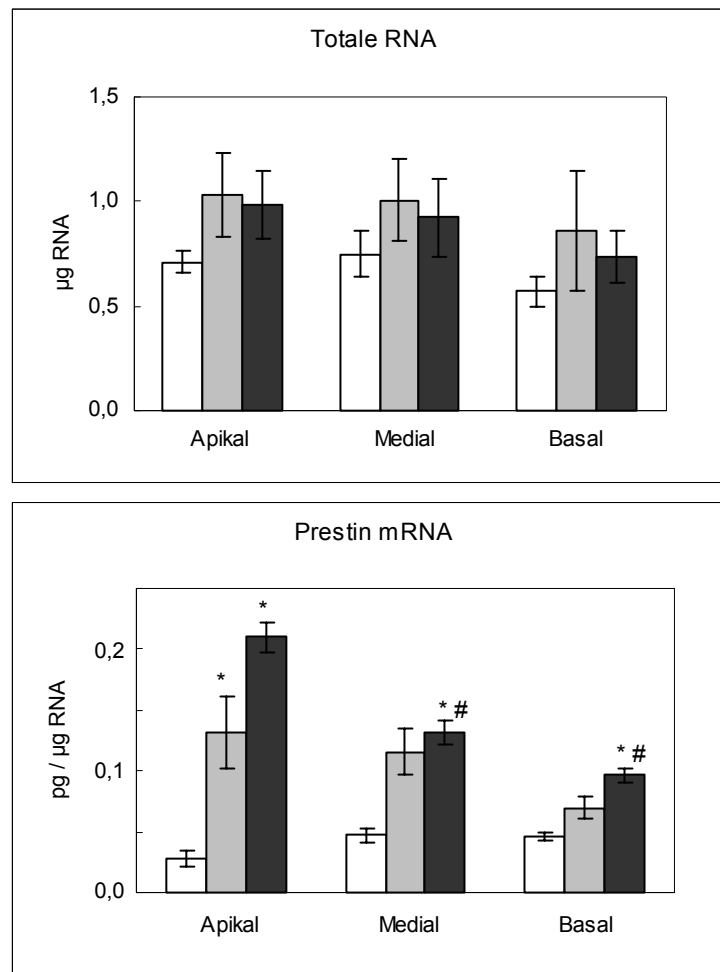


Abb. 42 Totale RNA (oben) und Prestin mRNA (unten) in den 3 cochleären Segmenten während der Entwicklung *in vivo* am 3. (weiß), 5. (grau) und 7. (schwarz) postnatalen Tag. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$). * $p < 0,05$ vs. 3. Tag; # $p < 0,01$ vs. apikal.

3.6.7.1. Veränderung von „Prestin“ in der organotypischen Kultur unter Hypoxie und Ischämie

Um die Veränderung des Prestin mRNA-Gehaltes nach Haarzell-Schädigungen zu untersuchen, exponierten wir die Explant-Kulturen jeweils vom ipsilateralen Ohr einer Normoxie und vom kontralateralen Ohr einer Ischämie von 6 h Dauer und bestimmten deren totale RNA und den Prestin mRNA-Gehalt. In einem parallelen Experiment wurde unter denselben ischämischen Bedingungen die Anzahl der ÄHZ gezählt, die unter diesen Bedingungen um ca. 20 % im Vergleich zur Normoxie sank. Der Gehalt der totalen RNA zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Normoxie und Ischämie. Im Gegensatz

dazu war der Prestin mRNA-Gehalt im apikalen, medialen und basalen Segment um ca. 35 % niedriger vs. Normoxie.

Um den Schaden zu verstärken und die Abnahme des Prestin mRNA-Gehaltes zu prüfen, wählten wir eine lang anhaltende Hypoxie von 38 h. Es zeigte sich ein geringer Abfall der totalen RNA in den hypoxischen Kulturen der medialen und basalen Segmente. Hypoxie reduzierte den Prestin mRNA-Gehalt um den Faktor 5-7 in allen Fragmenten (Tabelle 40).

Tabelle 40 Effekt der Hypoxie (38 h) auf den Prestin mRNA Gehalt des Organ Corti.

Region	Totale RNA (μg)		Prestin mRNA ($\text{pg}/\mu\text{g}$)	
	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie
Apikal	$3,1 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,4$	$0,39 \pm 0,07$	$0,05 \pm 0,01^*$
Medial	$2,6 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,1^*$	$0,32 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01^*$
Basal	$2,9 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2^*$	$0,17 \pm 0,02^\#$	$0,02 \pm 0,01^*$

* $p < 0,05$ für totale RNA und $p < 0,001$ für Prestin mRNA vs. Normoxie, $^\#p < 0,01$ vs. apikal oder medial (Scheffé's post-hoc Test; Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 4$).

3.6.8. Veränderung der HIF-1-abhängigen Gene unter Kultivierung und Hypoxie

Die Kultivierung der organotypischen Kultur (24 h) führte zu einer deutlichen Veränderung der Expression der HIF-1-abhängigen Gene in den einzelnen cochleären Regionen, wobei die Expression der Mehrzahl der Gene erhöht wurde (Abb. 43). Hochreguliert (≥ 2 fach) werden die Gene, die im Zusammenhang mit dem Umsatz der Glukose (*Gapdh*), dem Glukosetransport (*Slc2a1*), der Aktivität des Wachstumshormons IGF, mit dem Eisentransport (*Tf*, *Tfrc*), der Durchblutung bzw. der Elimination von Sauerstoffradikalen stehen. Es gibt aber auch Gene, deren Expression unverändert blieb

bzw. runterreguliert wurde. Nur gering verändert (≤ 2 fach) bzw. runterreguliert wurden Gene, die im Zusammenhang mit dem direkten Wachstum der Cochlea stehen (*Igf2*, *Tgfb3*/"Transforming growth factor, beta 3", *Vcam1*/"Vascular cell adhesion molecule 1", *Pdgfa*/"Platelet-derived growth factor, alpha"). Interessanterweise erfolgte in SV, MOD und OC eine besonders hohe Zunahme der Expression von *Hmox1*, *Nos2* und *Tfrc*.

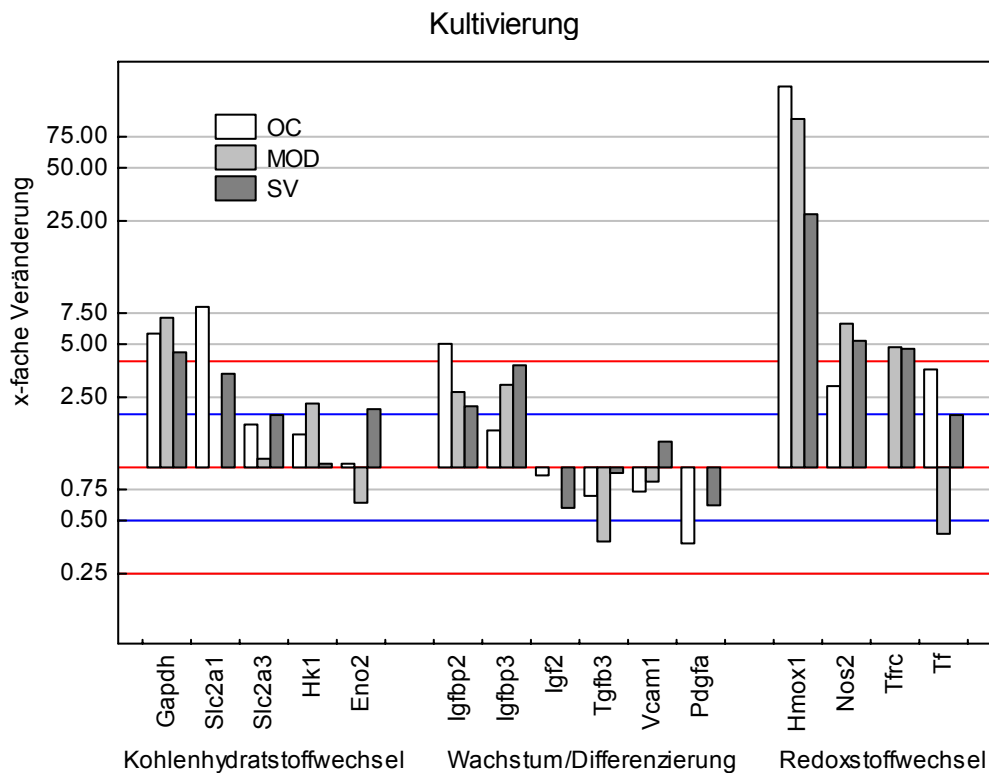


Abb. 43 Veränderung der HIF-abhängigen Gene in der organotypischen Kultur von Organ Corti (OC), Stria vascularis (SV) und Modiolus (MOD) unter Kultivierung.

Die Hypoxieexposition der organotypischen Kultur (5 h) führte nur zu einer geringen Veränderung der Genexpression (Abb. 44). Eine mehr als 1,6fache Erhöhung war bei *Igf2* im MOD nachweisbar. In der SV zeigt sich eine verstärkte Runterregulation der *Hmox1*.

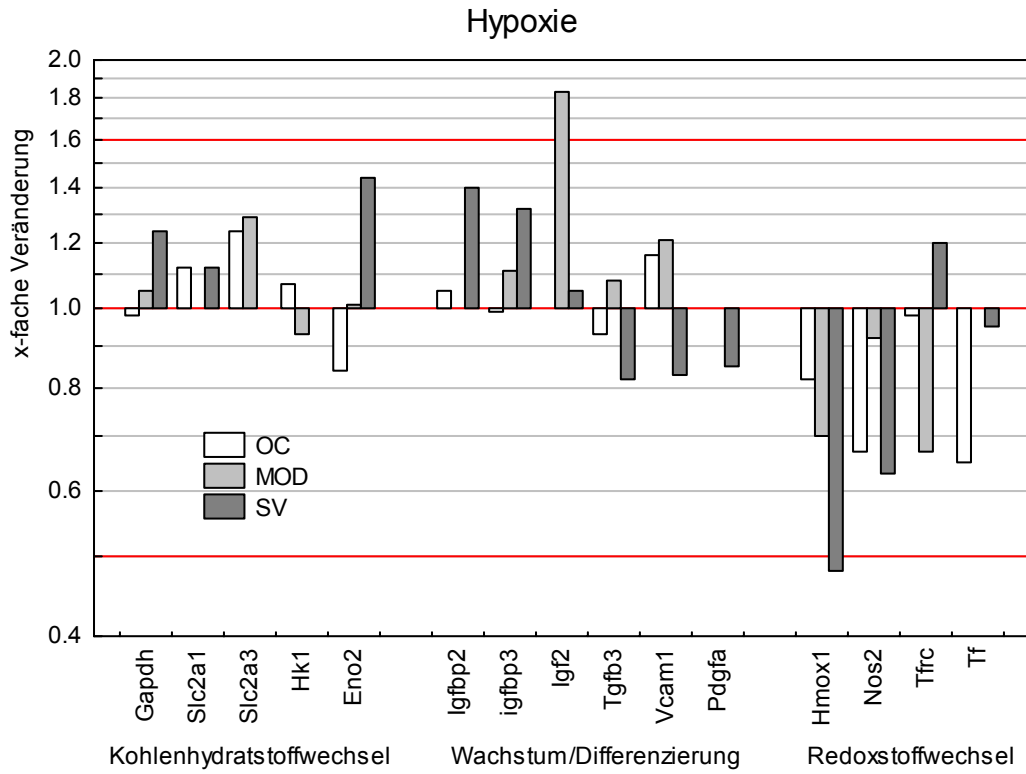


Abb. 44 Veränderung der HIF-abhängigen Gene in der organotypischen Kultur von Organ Corti (OC), Stria vascularis (SV) und Modiolus (MOD) unter Hypoxie.