

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

DISSERTATION

*Einflussfaktoren auf die Prestin-Expression im Cortischen Organ der
neugeborenen Ratte*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kerstin Stute

aus Malchin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. B. Mazurek
 2. Prof. Dr. med. H. Scholz
 3. Prof. Dr. med. M. Knipper

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Innenohr – Anatomie und Physiologie	1
1.2	Die Haarzellen und Neurotransmission	3
1.3	Äußere Haarzellen und Prestin	6
1.4	Funktion und Expression von Prestin unter physiologischen und pathologischen Bedingungen	9
1.5	Regulierung der Prestin-Expression	10
2.	Problemstellung.....	16
3.	Material und Methoden	18
3.1	Materialien und Substanzen.....	18
3.2	Präparation des Cortischen Organs.....	22
3.3	Die organotypische Kultur des Cortischen Organs	23
3.4	Darstellung der Haarzellen	23
3.5	Immunhistochemische Färbung von Prestin- und Gata-3-Protein.....	25
3.6	Isolierung und Quantifizierung der RNA	26
3.7	Quantifizierung der mRNA mittels Real-time-Polymerase-Kettenreaktion.....	27
3.8	Methodische Varianz	30
3.9	Statistik	31
4.	Ergebnisse	33
4.1	Charakterisierung der organotypischen Kultur der neonatalen Ratte	33
4.1.1	Zustand und Anzahl der Haarzellen	33
4.1.2	Verhalten des RNA-Gehaltes	36
4.1.3	Expression von Referenzgenen	37
4.1.4	Expression von Transkriptionsfaktoren	39
4.2	Verhalten der Expression von Prestin und Gata-Transkriptionsfaktoren in der organotypischen Kultur (<i>in vitro</i>) und <i>in vivo</i>	40
4.2.1	mRNA-Entwicklung von Prestin und Gata-3, -2, -1 <i>in vitro</i>	41
4.2.2	mRNA-Entwicklung von Prestin und Gata-3, -2, -1 <i>in vivo</i>	46
4.2.3	Prestin- und GATA-3-Protein	51
4.3	Einflussfaktoren auf die Prestin- und Gata-mRNA-Expression	56
4.3.1	Einfluss der Spiralganglien	56
4.3.2	Einfluss des Schilddrüsenhormons L-Thyroxin (T ₄)	59

4.3.3	Einfluss von Retinsäure.....	63
4.3.4	Einfluss von Gemfibrozil	68
4.3.5	Einfluss von ausgewählten Wachstumsfaktoren: IGF und TGF-β.....	70
4.3.6	Orientierende Untersuchungen zum Einfluss von Neurotransmittern	73
4.3.7	Einfluss depolarisierender Kaliumkonzentrationen	77
5.	Diskussion	82
5.1	Methodische Aspekte der Untersuchung	82
5.1.1	Die organotypische Kultur der Cochlea	82
5.1.2	Referenzgen.....	83
5.1.3	Qualitätskontrolle	84
5.2	Vergleich der <i>In-Vitro</i> - und <i>In-Vivo</i> -Entwicklung von Prestin und Gata- Transkriptionsfaktoren	84
5.3	Einflussfaktoren auf die Expression von Prestin und Gata-3	87
5.3.1	Liganden von nukleären Transkriptionsfaktoren	87
5.3.2	Wachstumsfaktoren	90
5.3.3	Neurotransmitter.....	90
5.3.4	Hohe Kaliumkonzentration	91
5.4	Schlußfolgerung und Bedeutung der Untersuchungen	93
6.	Zusammenfassung	95
	Literaturverzeichnis.....	97
	Abkürzungsverzeichnis	107
	Abbildungsverzeichnis	110
	Tabellenverzeichnis.....	113
	Lebenslauf	114
	Publikationen.....	115
	Poster.....	115
	Danksagung.....	116
	Erklärung an Eides Statt.....	117

1. Einleitung

1.1 Das Innenohr – Anatomie und Physiologie

Das Hörorgan der Säugetiere befindet sich im Temporalknochen des Schädels. Umweltgeräusche werden über die Ohrmuschel gesammelt, über den Gehörgang weitergeleitet und versetzen das Trommelfell in Schwingung. Diese Bewegungen werden über die Gehörknöchelchenkette, die sich im luftgefüllten Mittelohr befindet, weitergeleitet [1]. Das innerste Gehörknöchelchen, der Stapes, inseriert am ovalen Fenster und überträgt die Schallenergie an das Innenohr (Abbildung 1). Das Innenohr besteht aus einem auditorischen Teil, der Cochlea, und aus einem vestibulären Teil, dem Labyrinth. Die menschliche Cochlea hat die Form einer Schnecke, ist etwa 34 mm lang und mißt im Durchmesser etwa 2 mm. Sie ist spiralig 2,5mal um den konisch geformten Modiolus gewunden [2]. Die Cochlea ist an ihrer breiten Basis gegen das Mittelohr abgegrenzt. Hier befinden sich das ovale Fenster, direkt unter der Stapes-Platte, und das runde Fenster. Die Wände der Cochlea bestehen aus Knochengewebe. Der Querschnitt durch die Cochlea zeigt drei flüssigkeitsgefüllte Hohlräume: die Scala vestibuli, die Scala media auch Ductus cochlearis genannt und die Scala tympani. Die Scala media ist von der Scala vestibuli durch die Reißner-Membran getrennt und von der Scala tympani durch die Basilarmembran. Auf dieser sitzt das Cortische Organ (OC), welches die Sinneszellen des auditorischen Organs und verschiedene Stützzellen umfasst. Über dem Cortischen Organ liegt die Tektorialmembran [3]. Die Basilarmembran verbreitert sich zur Spitze hin und ist hier etwa fünfmal breiter als an der Basis, anders als die Cochlea, die sich zur Spitze hin verschmälert. Die Steife der Basilarmembran nimmt zur Spitze hin ab [1]. Während die Scala media an der Spitze der Cochlea blind endet, geht die Scala vestibuli über das Helicotrema, eine Öffnung in der Basilarmembran, in die Scala tympani über. An der Basis der Cochlea wird die Scala vestibuli durch das ovale Fenster, die Scala tympani durch das runde Fenster gegen das Mittelohr begrenzt. Die Flüssigkeit in der Scala vestibuli und Scala tympani, die Perilymphe, ist ähnlich wie Liquor Kalium-arm (7 mM) und Natrium-reich (140 mM). Die Flüssigkeit in der Scala media, die Endolymphe, ist dagegen ähnlich wie intrazelluläre Flüssigkeit Kalium-reich (150 mM) und Natrium-arm (1 mM). Die aktiven Transportprozesse, die diese Ionenverteilung aufrechterhalten, finden in der Stria vascularis statt. Die Stria vascularis ist das Endothel an der dem Cortischen Organ benachbarten Wand der Scala media. Natriumionen werden entgegen dem Konzentrationsgefälle resorbiert, Kaliumionen sezerniert. Die Endolymphe weist aufgrund der Permeabilität der Reißner Membran und der Konzentrationsunterschiede der Natrium- und Kaliumionen das sogenannte endocochleäre Potential

auf, ein um etwa 80 mV positiveres elektrisches Potential als das der Perilymphe [3].

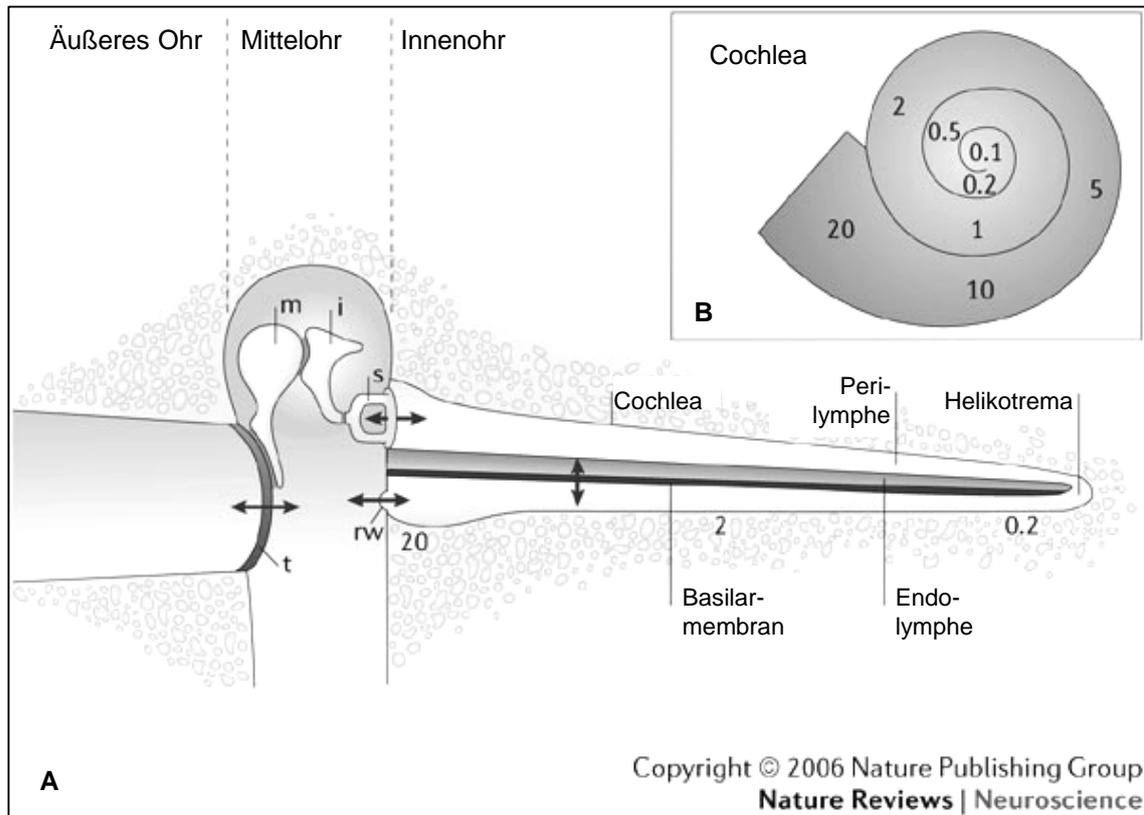


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Schallübertragung im menschlichen Ohr. A: Schnitt durch das Os temporale. B: Frequenzselektivität. Die Schwingungen des Trommelfells (t) werden über die drei Mittelohrknöchelchen, Malleus (m), Incus (i) und Stapes (s), weitergeleitet, über das ovale Fenster auf das Innenohr übertragen und schließlich über das runde Fenster (rw) wieder an das Mittelohr abgegeben. Zur besseren Übersicht der Skalen ist die Cochlea entrollt dargestellt. Die initiierten Druckwellen in der cochleären Flüssigkeit setzen die Basilarmembran, auf der das Cortische Organ mit den Haarzellen sitzt, in Schwingung. Die Wanderwelle bewegt sich von der Basis der Cochlea zur Spitze und erreicht abhängig von der jeweiligen Frequenz des Schallsignals ihr Amplitudenmaximum in einem bestimmten Bereich. Die Frequenzselektivität der menschlichen Cochlea ist in Kilohertz, von 0,1 – 20 kHz, angegeben. Die Frequenzen sind logarithmisch verteilt, so dass jede Zehnerpotenz einen gleichgroßen Bereich auf der Basilarmembran belegt (aus: [2]).

Die Bewegungen des Stapes bewirken Bewegungen der Perilymphe der Scala vestibuli und, aufgrund der Flexibilität der Reißner-Membran, der Endolymphe in der Scala media. Es entsteht eine Wanderwelle auf der Basilarmembran. Wie weit die Welle wandert und wo auf der Basilarmembran sie somit ihr Maximum erreicht, hängt von der Schallfrequenz ab. Hohe Frequenzen haben ihr Maximum Basis-nah, da die steifere basale Basilarmembran relativ stark schwingt und somit einen großen Teil der Energie verbraucht. Niedrige Frequenzen haben ihr Maximum Apex-nah. Töne einer bestimmten Frequenz bringen demnach einen eng umschriebe-

nen Bereich der Basilarmembran zum Schwingen (Abbildung 1). Die Auslenkung der Basilarmembran führt zu einer Biegung der Stereozilien auf den Haarzellen in diesem eng definierten Bereich, die Frequenz des Tons ist in eine Ortsinformation übersetzt (Tonotopie). Das mechanische Schallsignal wird in ein neuronales Signal umgewandelt.

1.2 Die Haarzellen und Neurotransmission

Innere und äußere Haarzellen: Die Cochlea von Säugetieren enthält zwei Typen von Sinneszellen, die inneren und die äußeren Haarzellen. Sie sind entlang des Cortischen Organs in Reihen angeordnet: eine Reihe innerer und drei Reihen äußerer Haarzellen. Die inneren Haarzellen (IHZ, Abbildung 2A), von denen in der menschlichen Cochlea etwa 3500 vorhanden sind, leiten die Informationen über den Hörnerven an das ZNS. Die äußeren Haarzellen (ÄHZ, Abbildung 2B), etwa 12000 in der menschlichen Cochlea, erhöhen die Leistungsfähigkeit der Cochlea sowohl qualitativ (Erhöhung der Selektivität) als auch quantitativ (Erhöhung der Sensitivität). Auch sie erhalten Informationen vom ZNS. Am apikalen Pol der Haarzelle befinden sich die sensorischen Strukturen, die Stereozilien, und am basalen Pol befinden sich Synapsen zu den Neuronen. Die inneren Haarzellen werden vorwiegend afferent und die äußeren Haarzellen vorwiegend efferent innerviert [4].

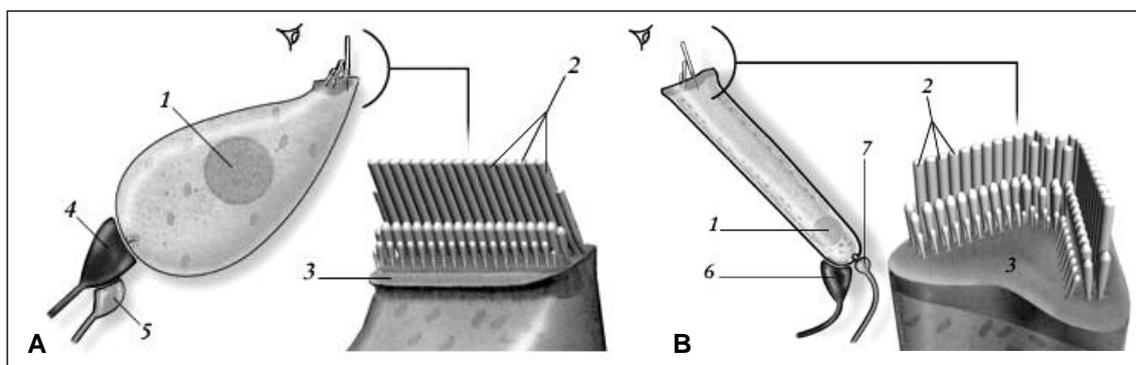


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Haarzell-Typen. A: Innere Haarzelle. B: Äußere Haarzelle. 1...Nucleus; 2...Stereozilien; 3...Kutikularplatte; 4...Afferente Nervenendigung (Typ-I-Neuron); 5...Laterale olivo-cochleäre efferente Nervenendigung; 6...Mediale olivo-cochleäre efferente Nervenendigung; 7...Afferente Nervenendigung (Typ-II-Neuron); (aus: http://www.neuroreille.com/promenade/english/corti/hcells/generalite_ihc.jpg).

Innervation der Cochlea: Die Cochlea der Ratte (*Rattus norvegicus*) wird von über 19000 Fasern innerviert, wovon 79 Prozent afferente und 21 Prozent efferente Fasern sind. Die inneren Haarzellen werden über 14000 Afferenzen und 2000 Efferenzen innerviert. Die äußeren Haarzel-

len werden über 1000 Afferenzen und 2000 Efferenzen innerviert [4]. Die Ganglienzellen der Afferenzen (4 und 7 in Abbildung 2) der inneren und äußeren Haarzellen liegen gemeinsam im Spiralganglion. Von dort projizieren sie peripher zum Cortischen Organ und zentral zum Nucleus cochlearis. Im Spiralganglion werden zwei Arten von Ganglienzellen unterschieden: die großen Typ-I-Ganglienzellen, die mit 90 – 95 Prozent den größten Anteil haben, und die Typ-II-Ganglienzellen. Die Typ-I-Nervenfasern sind myelinisiert, die vom Typ II nicht. Jede innere Haarzelle wird von mehreren Typ-I-Nervenfasern innerviert, jede Typ-II-Nervenfasern innerviert mehrere äußere Haarzellen. Die Ganglienzellen der Efferenzen sind im oberen Olivenkomplex lokalisiert. Die inneren Haarzellen werden über das laterale olivo-cochleäre System innerviert, die äußeren Haarzellen über das mediale olivo-cochleäre System (5 und 6 in Abbildung 2). Die lateralen Efferenzen kontaktieren die Dendriten der Typ-I-Nervenfasern, die medialen Efferenzen kontaktieren die Zellkörper der äußeren Haarzellen [5;6].

Mechanoelektrische Transduktion und Neurotransmission: Die Haarzellen haben an der Spitze im Bereich der Kutikularplatte haarähnliche Stereozilien, welche über die Lamina reticularis bis in die Endolymphe ragen. Die Stereozilien der inneren Haarzellen enden unterhalb der Tektorialmembran, die der äußeren sind mit der gallertigen Tektorialmembran verbunden. Basilarmembran, Lamina reticularis, Stützzellen und Haarzellen bewegen sich aufgrund ihrer starren Verbindung gemeinsam auf die Tektorialmembran zu und nach innen oder von ihr fort und nach außen. Aufgrund der Lateralbewegung der Lamina reticularis gegenüber der Tektorialmembran kommt es zu einer Biegung der mit der Tektorialmembran verbundenen Stereozilien der äußeren Haarzellen. Die Stereozilien der inneren Haarzellen biegen sich gleichsinnig, wahrscheinlich durch die Endolymphbewegung. Die mechanosensorischen Stereozilien sind Ausstülpungen der Haarzelle und aus Aktinfilamenten aufgebaut, wodurch sie sehr steif sind. Die Biegung erfolgt lediglich an der Basis, am Übergang zum Haarzellkörper, und aller Stereozilien einer Haarzelle als Einheit. Benachbarte Stereozilien sind über feine extrazelluläre Filamente, die Tip-Links (Quervernetzungsfilamente), miteinander verbunden. Die Auslenkung der Stereozilien bewirkt eine Änderung der Leitfähigkeit der Zellmembran durch das Öffnen von Ionenkanälen. Dadurch wird eine Potentialänderung der Haarzelle hervorgerufen. Dieser Vorgang wird als mechanoelektrische Transduktion bezeichnet. Der zugrunde liegende Mechanismus der elektromechanischen Transduktion ist in seinen Feinheiten bisher noch unbekannt. Derzeit wird angenommen, dass die Tip-Links direkt mechanosensitive Ionenkanäle, die Transduktionskanäle, in den Spitzen der Stereozilien öffnen und schließen. Befinden sich die Stereozilien in aufrechter Lage (Ruhelage), haben die Kanäle eine Öffnungswahrscheinlichkeit von etwa 10 Prozent, so

dass ein geringer Kaliumstrom aus der Endolymphe in die Haarzelle besteht. Die Auslenkung der Stereozilien in Richtung der längsten Reihe Stereozilien (exzitatorische Richtung) erhöht den Zug bzw. die Spannung an den Tip-Links und dadurch den Kalium-Einstrom. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle ist dann nahezu 100 Prozent. Die Auslenkung der Stereozilien in entgegengesetzte (inhibitorische) Richtung entlastet die Tip-Links; dies bewirkt eine Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeit auf nahezu null Prozent. Kalium-Einstrom in die Haarzelle depolarisiert diese, wodurch spannungsgesteuerte Calciumkanäle geöffnet werden. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt an der Basis der inneren Haarzelle die Freisetzung von Glutamat durch Entleerung von Transmittervesikeln in den synaptischen Spalt [1;2]. Jede innere Haarzelle besitzt an ihrem basalen Pol etwa 10 – 30 hochspezialisierte Bändersynapsen (im englischen: ribbon synapses), die eine äquivalente Anzahl von afferenten Spiralganglienneurone ansteuern [7;8]. Glutamat bindet an den Glutamat-Rezeptoren, unter physiologischen Bedingungen vorrangig an den AMPA-Rezeptoren [9], der afferenten Synapse, wodurch ein postsynaptisches Generatorpotential aufgebaut wird und schließlich werden in der afferenten Nervenfasern, den Spiralganglienneuronen, Aktionspotentiale generiert, die zum auditorischen Kortex weitergeleitet werden. Die Depolarisation der äußeren Haarzelle bewirkt eine Konformationsänderung des Membranproteins Prestin und eine Längenänderung der äußeren Haarzelle, womit es zu einer aktiven Verstärkung der Wanderwelle kommt. Die Repolarisation der Haarzellen erfolgt über einen energieverbrauchenden Rücktransport der Ionen.

Zerstörung der Tip-Links: Neuere Studien zeigen, dass eine Lärm-induzierte Zerstörung der Tip-Links der Stereozilien innerer und äußerer Haarzellen, anders als erwartet, zum Öffnen der Transduktionskanäle führt. Es resultiert der Einstrom von Kalium- und Calciumionen in die Haarzellen. Sowohl die Dauerdepolarisation als auch die dauerhaft erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration wirken exzitotoxisch. In den äußeren Haarzellen folgen eine Dauerkontraktion mit Abnahme bzw. Ausfall der cochleären Verstärkerfunktion und eine Verformung des Cortischen Organs. Diese Prozesse haben negative Auswirkungen auf das Frequenzdiskriminations- und somit das Sprachdiskriminationsvermögen. Letztlich resultiert eine dauerhafte Hörstörung. In den inneren Haarzellen führt die resultierende vermehrte Transmitterfreisetzung einerseits zur dauerhaften Depolarisation afferenter Neurone, klinisch möglicherweise als Tinnitus verifizierbar, andererseits zu einer Degeneration der Neurone, wahrscheinlich durch die exzitotoxische Wirkung von Glutamat auf die afferenten Neurone bedingt [10].

1.3 Äußere Haarzellen und Prestin

Elektromechanische Transduktion oder Cochleärer Verstärker: Es wird allgemein angenommen, dass die bemerkenswerte Sensitivität und Frequenzselektivität des Gehörsinns von Säugetieren einem lokalen elektromechanischen Rückkopplungsmechanismus geschuldet ist. Dieser wird als cochleärer Verstärker bezeichnet und beschreibt die zyklische Längenänderung der äußeren Haarzellen der Cochlea während des Transduktionsprozesses. Die elektromechanische Energie wird von den äußeren Haarzellen auf das Cortische Organ übertragen, infolge dessen wird die Bewegungsamplitude der Basilarmembran bei niedrigen Schalldruckpegeln verstärkt. Diese Verstärkung ist im tieffrequenten, d.h. apikalen Bereich der Cochlea ausgeprägter als im hochfrequenten, d.h. basalen Bereich. Wahrscheinlich sind darüber hinaus aktive Bewegungen der Stereozilien an der cochleären Verstärkung beteiligt. Der Ausfall des cochleären Verstärkers hat einen Sensitivitätsverlust von 40 – 60 dB, sowie eine eingeschränkte oder sogar fehlende Frequenzselektivität zur Folge [11;12].

Prestin: Die molekulare Grundlage dieses Verstärkerprozesses der ÄHZ ist das Protein Prestin (SLC26A5), dessen Name sich von der Fähigkeit Prestin-haltiger Zellen zu Bewegungen im Mikrosekundenbereich ableitet. Prestin verändert seinen Konformationszustand beeindruckend schneller als konventionelle molekulare Motor-Proteine. Das Gen, welches Prestin kodiert, enthält beim Menschen 20 Exons und ist auf dem Chromosom 7 an der Position q22 lokalisiert. Das Prestin-Gen der Ratte liegt auf Chromosom 4 an der Position q11. Prestin ist das fünfte Mitglied in der Familie der Anionentransporter, der Familie der solute carrier proteins 26 (SCL26). Es sind vier Protein-Varianten, resultierend aus vier Transkriptions-Varianten, bekannt, welche mit dem Zusatz der Buchstaben a bis d gekennzeichnet werden [111]. Das Prestin-Protein (SCL26A5a) hat eine molekulare Masse von etwa 80 kDa und ist aus 744 Aminosäuren aufgebaut. Prestin ist ein hoch konserviertes Protein. Zwischen den bisher untersuchten Säugetierspezies sind mehr als 90 Prozent der Aminosäuren identisch (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ähnlichkeit von Prestin zwischen dem Menschen und ausgewählten Säugetierspezies.

	Rattus norvegicus	Mus musculus	Canis familiaris	Bos taurus
mRNA	87,1	87,9	91,9	92,2
Protein	94,5	95,0	96,8	96,2

Ähnlichkeit der Prestin-Sequenzen zwischen dem Menschen (*Homo sapiens*) und Ratte, Maus, Hund und Kuh in Prozent auf mRNA- und Protein-Ebene (aus: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human; [111, 118]).

Die Protein-Sequenz von Prestin besitzt 10 bis 12 putative Transmembrandomänen und zwei komplexe zytoplasmatisch lokalisierte Enden: N- und C-Terminus. Prestin enthält das für

die Mitglieder der SCL26-Familie typische STAS-Motiv (sulphate transporters and antisigmafactor antagonists) in der Aminosäuresequenz. Obwohl die Grundfunktion der Mitglieder der SCL26-Familie der Transport von Anionen ist, ist die Hauptfunktion von Prestin eine andere. Es ist als einziger Vertreter der SCL26-Familie zur Elektromotilität befähigt [13;12]. Die Charakterisierung der dreidimensionalen Protein-Struktur von Prestin, um schließlich die Funktionsweise und Grundlage der Elektromotilität besser zu verstehen, ist Bestandteil gegenwärtiger Untersuchungen [14;15].

Prestin – Elektromotilität: Die molekulare Basis der Elektromotilität ist eine spannungsabhängige Konformationsänderung des Prestin-Proteins mit verschiedenen Konformationen in verschiedenen Membranbereichen. Durch die Gesamtheit der Veränderungen der dichtgepackten Prestin-Moleküle ist die Veränderung der Gesamtlänge der äußeren Haarzelle möglich. Die Spannungsempfindlichkeit des Übergangs zwischen den Konformationszuständen erfordert eine Bewegung von elektrisch geladenen Partikeln durch das elektrisch geladene Feld der Membran. Derzeit behauptet sich die Hypothese, dass die Ladungsverschiebungen aus einem inkompletten Anionen-Austausch-Zyklus resultieren, einem inkompletten Transport der Anionen. Es scheint, dass intrazelluläre Chloridionen eine entscheidende Rolle für die Funktion des Prestins spielen, entweder als extrinsischer Spannungssensor oder für die allosterische Modifikation, die für die Ladungsverschiebung erforderlich ist, oder für einen Anionenaustausch, bei dem Chloridionen oder andere Ladungsteilchen als Antwort auf die Änderung der transmembranen Spannung teilweise über die Membran transloziert werden. Es wird angenommen, dass diese Translokation die Konformationsänderung in dem Molekül auslöst und damit die somatische Verlängerung und Kontraktion der äußeren Haarzellen. Es existieren zwei Modelle für die spannungsabhängige Prestin-Steuerung mittels Chloridionen (Abbildung 3).

Zum einen ist es möglich, dass intrazelluläres Chlorid, gebunden an einer Bindungsstelle innerhalb der Membran, transloziert und dadurch eine Formänderung bewirkt. Zum anderen ist es denkbar, dass die Bindung von Chlorid eine allosterische Änderung ermöglicht, wodurch eine positive Ladung über die Membran wandert [12]. Die Elektromotilität der äußeren Haarzellen ist unabhängig von ATP, Calcium und dem Mikrotubuli- oder Aktin-System [16;17].

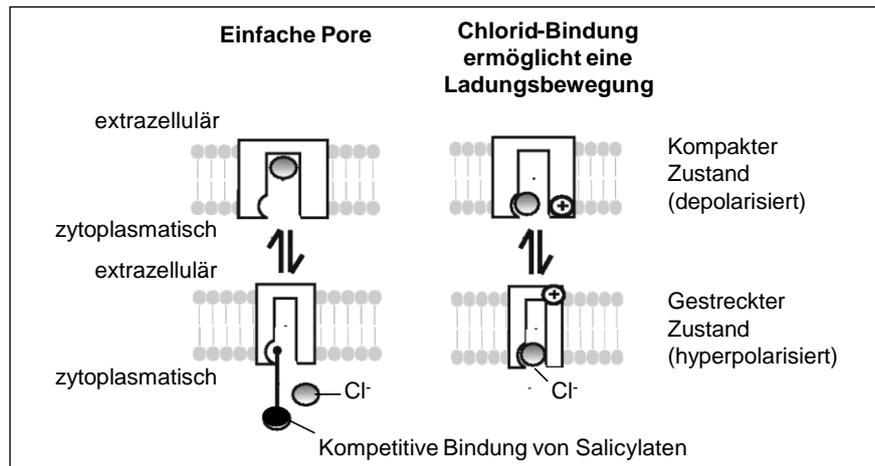


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwei Modelle der spannungsabhängigen Prestin-Steuerung.

Links: Intrazelluläre Chloridionen werden über das Membranpotential in eine zytoplasmawärts gerichtete Pore gelenkt. Die Bindung innerhalb des Moleküls führt zur Formänderung. Möglicherweise existiert eine zytoplasmatische Bindungsstelle für Salicylate, die als kompetitiver Inhibitor der Chloridbindung fungiert. Rechts: Mit der Chloridbindung allosterisch verbundene Ladungsverschiebung. Die Kinetik der Ladungsverschiebung wäre in diesen Modellen durch die Diffusionszeit des Ionentransits bzw. die Kinetik der Konformationsänderung des Proteins limitiert. Cl⁻...Chloridionen (aus: [12]).

Efferente Innervation der äußeren Haarzellen: Die Efferenzen aus dem oberen Olivenkomplex bilden bevorzugt Synapsen mit den äußeren Haarzellen der Cochlea [18]. Ein bedeutender efferenter Neurotransmitter der ÄHZ in der Cochlea ist Acetylcholin (ACh). Die Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) der Haarzellen zeigen eine ungewöhnliche Pharmakologie, die weder den nikotinergen noch den muskarinergen AChR entspricht, jedoch Eigenschaften von beiden aufweist. Es wird angenommen, dass die efferente Modulation der Haarzellfunktion zumindest teilweise über einen heteromeren nikotinergen AChR (nAChR), bestehend aus $\alpha 9$ und $\alpha 10$ Untereinheit der nAChR-Familie, erfolgt. ACh bindet an Rezeptoren am synaptischen Zellpol, es folgt ein schneller Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) in die Zelle über unspezifische Ligandengesteuerte Kationen-Kanäle und anschließend öffnen Ca^{2+} -abhängige Kalium (K^+)-Kanäle. Dies führt zu einem Anstieg der nach innen gerichteten Membranleitfähigkeit und zu einem Ausstrom von K^+ , wodurch die Zelle um wenige Millivolt hyperpolarisiert. Die initiale Reaktion auf die AChR-Aktivierung, d.h. die Folge von vorübergehendem Ca^{2+} -Einstrom und anschließendem K^+ -Ausstrom, ist das direkte Erscheinungsbild des ionotropen Rezeptorverhaltens des AChR. Daneben existiert scheinbar als verzögerte Reaktion die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Es ist möglich, dass die Abnahme der globalen Steifigkeit der ÄHZ und damit verbunden eine verminderte elektromotile Antwort in gewisser Weise mit der Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speicher verbunden sind. Es ist möglich, dass der langsame Effekt ver-

antwortlich für die Fähigkeit des efferenten Systems zum Schutz vor akustischer Überstimulation ist [19].

1.4 Funktion und Expression von Prestin unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Das Prestin-Protein wurde bereits direkt nach der Geburt in der lateralen Wand der äußeren Haarzellen der Ratten-Cochlea nachgewiesen. Die Intensität der Färbung erreicht zwischen dem 9. und 12. postnatalen Tag den adulten Zustand. Der zeitliche Ablauf der postnatalen Entwicklung der Prestin-Immunoreaktivität koinzidiert mit der postnatalen Entwicklung der Elektromotilität der äußeren Haarzellen [20]. Gross et al. [21] zeigten, dass der Prestin-mRNA-Gehalt im Cortischen Organ der neugeborenen Ratte während der In-Vitro-Entwicklung etwa um den Faktor zwei ansteigt. Verbunden mit dem Anstieg ist die Ausbildung eines deutlichen Apikal-Basal-Gradienten mit dem höchsten Prestin-mRNA-Gehalt im apikalen und dem niedrigsten im basalen Fragment. Dies stimmt mit Beobachtungen von Judice et al. [22] überein, die eine Zunahme der Färbeintensität von Prestin-Protein vom basalen zum apikalen Segment fanden.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass die regelgerechte Funktion und Expression des Prestins für das gesunde Hören unerlässlich sind. Untersuchungen an Knock-out-(KO) und Knock-in-Tieren (KI), zeigten, dass das Vorhandensein von funktionstüchtigem Prestin in den äußeren Haarzellen von Säugetieren unverzichtbar für die normale cochleäre Funktion ist. Prestin-KO-Mäusen zeigen *in vitro* einen Verlust der Elektromotilität der äußeren Haarzellen und *in vivo* einen Hörverlust von 40 bis 60 dB über allen Frequenzen – vergleichbar mit dem Verlust der cochleären Amplifizierung [23], während heterozygote Mäuse lediglich eine geringfügige Reduktion der Motilität der äußeren Haarzellen und einen leichten Hörverlust von etwa 6 dB zeigen [24]. Die äußeren Haarzellen von Prestin-KO-Mäusen zeigen eine verminderte Steifigkeit, welche ihrerseits zu einem erheblichen Hörverlust führen könnte, selbst wenn die auf Prestin basierende somatische Elektromotilität nicht die Grundlage der cochleären Amplifizierung darstellt. Dallos et al. [25] führten Untersuchungen an Prestin-KI-Mäusen durch. Die Prestin-KI-Maus besitzt ein morphologisch normales Cortisches Organ, eine normale Steifigkeit der äußeren Haarzellen und eine normale mechanoelektrische Transduktion, während die Elektromotilität der äußeren Haarzellen stark reduziert ist. Prestin-KI- und Prestin-KO-Maus zeigen eine vergleichbare cochleäre Sensitivität und fehlende Frequenzselektivität.

Um die Rolle, die Prestin für die Funktion der äußeren Haarzelle und letztlich für das Hören spielt, weiter zu charakterisieren, wurde die Prestin-Expression bereits unter verschiedenen,

die äußeren Haarzellen schädigenden Bedingungen untersucht. Schädigende Einflüsse, wie Hypoxie und Ischämie oder Lärm, führen im cochleären Gewebe zu einer metabolischen Stressantwort. Inwieweit die Prestinexpression dadurch beeinflusst wird, ist weitgehend unklar.

Gross et al. [21] zeigten, dass Hypoxie und Ischämie parallel zum Verlust von äußeren Haarzellen einen Abfall des Prestin-mRNA-Gehalts induzieren. Der mRNA-Gehalt sank prozentual stärker als die Anzahl der vorhandenen äußeren Haarzellen. Das Absinken des mRNA-Gehalts reflektiert Schäden an bzw. Verlust von äußeren Haarzellen und deutet zusätzlich auch ein Absinken der Expression in den verbliebenen äußeren Haarzellen an.

Mazurek et al. [27] beobachteten bei Ratten und Meerschweinchen einen Anstieg der Prestin-mRNA-Expression nach lärminduziertem Hörverlust von 15 bis 25 dB (Messung der DPOAEs). Gleichzeitig betrug der Verlust von äußeren Haarzellen etwa 40 Prozent. Die Prestin-mRNA-Expression scheint in den verbliebenen vorhandenen äußeren Haarzellen hochreguliert zu werden. Interessanterweise trat bei einseitiger Beschallung in der kontralateralen Cochlea ebenfalls ein Anstieg der Prestin-mRNA auf, verbunden mit einer Verbesserung der DPOAEs.

Zahlreiche Medikamente haben ototoxische Nebenwirkungen, darunter Salicylate, Aminoglykoside, Schleifendiuretika, Zytostatika. Die Einnahme von Acetylsalicylsäure, kurz ASS, kann zu einem reversiblen Hörverlust führen. Dies konnte in Tierversuchen gezeigt werden [112]. Die Salicylate binden kompetitiv an das Prestin, wodurch spannungsabhängige Translokation der Chloridionen im Prestinmolekül und somit somatische Elektromotilität gehemmt wird [12]. Die cochleäre Verstärkung des Schallsignals nimmt ab. Klinisch manifestiert sich eine beidseitige Innenohrschwerhörigkeit bis etwa 40 – 50 dB mit einem Abfall der otoakustischen Emissionen [12;28].

1.5 Regulierung der Prestin-Expression

Neuere Forschungsansätze zur Behandlung von menschlichen Hörstörungen konzentrieren sich auf die Gentherapie und die Stammzelltransplantation [114;115]. Ziel ist die Reparatur bzw. der Austausch von geschädigten cochleären Haarzellen. Das Verständnis der Prestin-Regulation ist dabei essentiell. Bisher sind die Mechanismen der dynamischen Prestin-Regulation auf den verschiedenen Ebenen weitgehend ungeklärt, dazu gehören die Prestin-mRNA-Transkription und -Translation, die Prestin-Umsatzrate (*turnover rate*) und Polymerisation. Eine Grundlage für das Verständnis des Prestins ist die Charakterisierung der Genstruktur, der Promotorregionen und der spezifischen Transkriptionsfaktoren.

Transkription und Transkriptionsfaktoren: Als Transkription wird der Prozeß des

Überschreibens eines Gens bzw. dessen DNA-Sequenz in RNA bezeichnet. Der Transkriptionsprozess läßt sich in drei Stadien unterteilen: der Start der Transkription (Initiation), die Verlängerung der RNA-Kette (Elongation) und das Ende der Transkription mit dem Freisetzen des RNA-Transkripts. Zur Transkription besitzen die höheren Eukaryonten drei RNA-Polymerasen (I – II), welche unterschiedliche Gene transkribieren. Die Synthese der mRNA erfolgt durch die Polymerase II, diese transkribiert alle proteinkodierenden Gene und synthetisiert verschiedene regulatorische RNA-Moleküle. Für die Regulation der Transkription besitzen alle Gene auf ihrer DNA konservierte Signale. Für die Initiation sind bestimmte Sequenzabschnitte auf der DNA notwendig. An diese Promotoren genannten Abschnitte binden sogenannte allgemeine Transkriptionsfaktoren und zeigen der RNA-Polymerase den Startpunkt der Transkription an. Häufig findet sich die sogenannte TATA-Box 25 bp stromaufwärts (in 5'-Richtung) des Startpunktes. Sie dient als Erkennungsstelle für den Multiproteinkomplex TFIID, bestehend aus dem TATA-Box Bindeprotein (TBP) und den TBP-assoziierten Faktoren, und somit zum Aufbau des Initiationskomplexes. Die Häufigkeit der Transkription eines bestimmten Gens wird durch zusätzliche genspezifische Regulationsmechanismen gesteuert: genspezifische Promotoren in direkter stromaufwärts gelegener Nachbarschaft, den Promotor verstärkende Enhancer-Elemente und negativ wirkende Silencer-Elemente. Enhancer und Silencer können in weiter Entfernung stromaufwärts oder stromabwärts oder sogar innerhalb der zu transkribierenden Region liegen. Sie werden von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren erkannt. Nahzu immer werden die entstandenen Primärtranskripte co- oder posttranskriptionell modifiziert: Anheften der Cap-Struktur, Spleißen und Anheften des Poly(A)-Schwanzes. Man unterscheidet im menschlichen Genom etwa 200 bis 300 allgemeine und über 2000 spezifische Transkriptionsfaktoren. Während die allgemeinen Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der Gene binden und zusammen mit der DNA-abhängigen Polymerase II den allgemeinen Transkriptionskomplex bilden, aktivieren die spezifischen Transkriptionsfaktoren die Polymerase durch Wechselwirkungen mit den allgemeinen Transkriptionskomplex. Die spezifischen Transkriptionsfaktoren haben zwei charakteristische Domänen, die DNA-bindende-Domäne und die transkriptionsregulierende Domäne, entweder eine Transaktivierungs- oder eine Transrepressordomäne, nach deren Sequenz bzw. Struktur klassischerweise die Einteilung erfolgt. Während der Entwicklung und Zellspezialisierung wird für die Regulation der zellspezifischen Genexpression aus diesen mehr als 2000 Transkriptionsfaktoren selektiert. In die Selektion involviert sind einerseits eine Kaskade von transkriptionaler Kontrolle der Transkriptionsfaktorgene und andererseits von außerhalb der Zelle zugeführter Signale, die posttranskriptional bereits gebildete Transkriptionsfaktoren aktivieren [32]. Die Aktivität der Transkrip-

tionsfaktoren kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden, wozu die Steuerung der Synthese und des Abbau, kovalente Modifikationen, wie Phosphorylierung und Dephospholylierung, Ligandenbindung, Interaktion mit inhibitorischen Proteinen und Wechsel der Bindungspartner gehören. Die Vielfalt und die Kombination der Transkriptionsfaktoren ermöglichen eine exakte Kontrolle der Expression. Es scheint, dass jedes Gen ein individuelles Regulationsmuster besitzt, somit eine bestimmte Menge von bestimmten Proteinen zu einer bestimmten Zeit einen bestimmten Prozeß startet [33;34].

NfκB-Transkriptionsfaktoren: Die Familie der nukleären Transkriptionsfaktoren kappaB besteht in Säugetieren aus fünf Mitgliedern, die normalerweise in inaktiver Form im Zytoplasma vorliegen: NFκB1, NFκB2, Rel-a, Rel-b und c-Rel. NFκB ist an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, wie Zellproliferation und -differenzierung, Entzündungs- und Immunreaktionen, Überleben und Apoptose der Zellen, zelluläre Stressreaktionen und Tumorstromwuchs [32;116;117].

NFκB ist auch in die intrazelluläre Calciumregulation involviert und hat eine bedeutende Rolle für die neuronale Exzitotoxizität. Lang et al. [35] zeigten, dass NFκB eine zentrale Rolle für die Degeneration von cochleären Spiralganglien hat. Mäuse, denen die NFκB-Untereinheit p50 fehlt, zeigten im Verlauf einen zunehmenden Hörverlust assoziiert mit zunehmenden Schäden der Neuronen unterhalb der inneren Haarzellen und einem beschleunigten Verlust der Spiralganglien. Merchant et al. [36] vermuten, dass NFκB in die pathologische Aktivierung zellulärer Stresssignalwege involviert ist, die zum idiopathischen sensorineuralen Hörverlust führen. Des Weiteren wurde von Nagy et al. [37] gezeigt, dass *in vitro* die selektive Inhibierung von NFκB zur Apoptose von unreifen Haarzellen führt.

C-fos-Transkriptionsfaktoren: Der Transkriptionsfaktor C-fos gehört zu den früh induzierbaren Genen (*immediate early genes*), welche als Verbindung zwischen zytoplasmatischen Ereignissen und Regulierung der Genexpression auf nukleärer Ebene innerhalb von Minuten aktiviert werden. In der Lärm-geschädigten Cochlea steigt die Expression frühinduzierter Gene [38]. So führt die akustische Überstimulation zu einem Anstieg der C-fos-Expression im Innenohr [39;40].

GATA-Transkriptionsfaktoren: Die Untersuchung der GATA-Expression im Innenohr ist von besonderem Interesse, da GATA-3-Mutationen mit Hörverlust assoziiert sind [41;42]. Allerdings ist die genaue Pathogenese der Entwicklungsanomalitäten im Innenohr bedingt durch GATA-3-Mutationen noch unbekannt. Bei Patienten mit dem HDR-Syndrom (hypoparathyroidism, deafness, renal defects), die unter Schallempfindungsschwerhörigkeit, Hypoparathyreo-

dismus und Nierendysplasien leiden, wurde eine GATA-3-Haploinsuffizienz nachgewiesen [43]. Der Hörverlust im Rahmen des HDR-Syndroms ist durch eine cochleäre Störung hervorgerufen. Mäuse, die für eine mutierte GATA-3-Form heterozygot sind, zeigen zunehmend morphologische Degenerationen, beginnend mit den apikalen äußeren Haarzellen und schließlich alle Haarzellen sowie Stützzellen der gesamten Cochlea betreffend [44].

Bei den Wirbeltieren sind sechs GATA-Proteine, GATA-1 bis GATA-6, bekannt. GATA-1 bis GATA-3 werden vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert, GATA-4 bis GATA-6 finden sich vorwiegend im Herzen, im Darm und in den Nebennieren [45]. Die GATA-Transkriptionsfaktoren enthalten zwei Zinkfingerstrukturen. Der erste Zinkfinger tritt mit weiteren Proteinen in Wechselwirkung, über den zweiten Zinkfinger werden die Interaktionen mit der DNA vermittelt. Die Mitglieder der GATA-Familie sind wesentlich an zahlreichen Entwicklungsprozessen, wie der Determination von Keimzellen, der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt [46]. Sie sind in die Entwicklung von Herz, Augen, vaskulärem und hämatopoetischen Systemen [47], in das transkriptionelle Rückkopplungsnetzwerk während der endokrinen sympathoadrenalen Differenzierung [48], in die Differenzierung von Adipozyten [49], in die Regulation von allergischen oder inflammatorischen Reaktionen [50], in die Erzeugung des Zytokinsystems [51], in die transkriptionelle Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase [52] und in die Entwicklung des Innenohrs involviert. Bereits in frühen Phasen der Innenohrentwicklung wird Gata-3 exprimiert [53;54]. In den ersten morphogenetischen Stadien ist GATA-3 für die Einstülpung der otischen Plakode und der Bildung des otischen Vesikels erforderlich [55]. Desweiteren ist GATA-3 in die Ausbildung des cochleären Ganglions und in die Wegfindung der efferenten Nervenbahnen zum Ohr involviert [53].

In Hinblick auf die Rolle von Prestin für die Funktion der äußeren Haarzellen, ist es wichtig die Faktoren zu untersuchen und zu verstehen, die in die Regulierung der Prestin-Expression involviert sind. GATA-3 wird während der cochleären Haarzellentwicklung kontinuierlich exprimiert, dies deutet neben der Beteiligung an Prozessen der Morphogenese und der Neurogenese des Innenohrs auf eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Haarzellen hin [56]. Außerdem enthält der Prestin-Promoter verschiedene putative Bindungsstellen für GATA-Transkriptionsfaktoren [57], so dass wir zu der Annahme gelangen, dass die GATA-Transkriptionsfaktoren an den regulatorischen Veränderungen der Prestin-Expression beteiligt sind [58].

Liganden von nukleären Transkriptionsfaktoren: Ein gutes Beispiel für die Beeinflussung der postnatalen Prestin-Expression ist das Schilddrüsenhormon [59]. Die Schilddrüsenhor-

mone (Thyroidhormon, TH) Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (Tetraiodthyronin, T_4) regulieren eine Reihe von Entwicklungsprozessen in verschiedensten Organsystemen. Sie regulieren die Genexpression über Thyroidhormonrezeptoren (TR), die ebenfalls zur nukleären Rezeptorfamilie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren gehören [60] und von zwei verschiedenen Genen, $TR\alpha$ und $TR\beta$ kodiert werden. Verschiebungen im postnatalen Anstieg des TH-Plasma-Spiegels führen zu permanenten Hörstörungen. So führen Mutationen des $TR\beta$ beim Menschen zur Schilddrüsenhormonresistenz (*resistance to thyroid hormone*, RTH) mit Taubheit als eines der bedeutendsten Symptome. TH beeinflusst die postnatale Prestin-Expression. So wird unter dem Einfluss von T_3 die initiale Expression von Prestin beschleunigt und die Expression erhöht, die Abwesenheit von TH verzögert sukzessive die Prestin-Expression, trotzdem werden normale Proteinspiegel erreicht [59].

Ein weiteres Beispiel für eine die Innenohrentwicklung beeinflussende Substanz ist die Retinsäure, der aktive Metabolit der Vitamin-A-Säure. Schilddrüsenhormone und Retinsäure regulieren die Gen-Expression über eine ähnliche Rezeptor-Bindung. Beide agieren als Liganden eines nukleären Rezeptors, an dem sie mit dem entsprechenden Hormone-Response-Element im Ziel-Gen interagieren. Retinsäure ist ein Aktivator der nukleären Rezeptoren Retinoic-acid-Rezeptor (RAR) und Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Es spielt eine wichtige Rolle während der zellulären Differenzierung und des Wachstums und beeinflusst zahlreiche Entwicklungsprozesse, darunter die Strukturierung des Rhombencephalons (lat. Rautenhirn), die Entwicklung des kardiovaskulären und des respiratorischen Systems, der Nieren, der Augen und der olfaktorischen Bahnen [61;62]. Aufgrund der aktuellen Erkenntnisse scheint die Retinsäure eine wichtige Rolle während verschiedener Phasen der Innenohrentwicklung zu spielen, darunter die Morphogenese des Innenohrs und möglicherweise die postnatale Entwicklung und Erhaltung des Innenohrs [63].

Eine die Gata-3-Expression beeinflussende Substanz ist das Fibrat Gemfibrozil, ein Aktivator des Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Rezeptors alpha (PPAR- α ; [64]). PPAR- α gehört zur nukleären Rezeptorfamilie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren und ist in die Regulation des Lipidmetabolismus und -transport involviert [65]. Der Lipidmetabolismus im Cortischen Organ kann die Funktion von Prestin beeinflussen, da die Fluidität der lateralen Plasmamembran der äußeren Haarzellen über den Cholesterinspiegel reguliert wird [66].

Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle: Wachstumsfaktoren und andere Signalmoleküle können ein breites Spektrum an Effekten auf die Entwicklung des Innenohrs haben. Als Wachstumsfaktoren werden Botenstoffe bezeichnet, die Signale zwischen Zellen übertragen und

somit Information weiterleiten. Die Signalübermittlung erfolgt durch Bindung des Wachstumsfaktors an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran, woraufhin eine Signalkaskade im Zellinneren ausgelöst wird, welche zur Aktivierung oder zur Abschaltung eines Gens führt. Es ist eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren bekannt. Der Insulin-artige Wachstumsfaktor, kurz IGF, spielt bekanntermaßen eine Rolle für das Überleben und Wachstum von Zellen, in der Cochlea für die Entwicklung von Haarzellen und den Erhalt der zellulären Intaktheit des Organismus [67;68]. Die Proteine der Transforming-growth-factor-beta-Familie (TGF- β) sind multifunktional. Sie regulieren die Differenzierung, die Proliferation und die Mutation von Zellen und spielen eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung von vielen Geweben, auch der des Innenohres [69].

2. Problemstellung

Prestin ist das Motorprotein der äußeren Haarzellen. Seine Funktion gewährleistet die hohe Sensitivität und Frequenzspezifität des Hörvermögens von Menschen bzw. Säugetieren. Um den molekularen Mechanismus des Hörens und die molekularen Zusammenhänge der Schwerhörigkeit und des Tinnitus, beides häufige sensorische Störungen beim Menschen, besser zu verstehen, werden zum einen Tiere zur Modellbildung eingesetzt (*In-Vivo*-Modelle) zum anderen Zellkulturen (*In-Vitro*-Modelle). Oft bieten Zellkulturen bessere Möglichkeiten, Modellvorstellungen zu entwickeln. In der Berliner Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Prestin-Expression auf der mRNA-Ebene durch Hypoxie und Ischämie in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs vermindert und durch Impulslärm in adulten Meerschweinchen und Ratten erhöht wird. Damit stellt sich die Frage nach Einflussfaktoren und Regulationsmechanismen der Prestin-Expression.

Bei der Beurteilung von Ergebnissen, die *in vitro* gewonnen wurden, ist es wichtig zu prüfen, ob und inwieweit diese mit *in vivo* gewonnenen Untersuchungsergebnissen übereinstimmen. Diesem Zweck sollen in der vorliegenden Arbeit vergleichende Untersuchungen der Genexpression, *in vitro* und *in vivo*, dienen. In früheren Untersuchungen der Berliner Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die organotypische Kultur des Cortischen Organs der neugeborenen Ratte gut geeignet ist, die Prestin-Expression zu untersuchen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit dieses *In-Vitro*-Modell verwendet, um mögliche Einflußfaktoren auf die Prestin-Expression zu untersuchen.

Ein entscheidender methodischer Aspekt der Untersuchung der Genexpression ist die Wahl eines geeigneten Bezugssystems. Es ist zu prüfen, ob die in der Literatur häufig als Referenzgen benutzte Gapdh für die Untersuchung der Prestin-Expression in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs der neugeborenen Ratte geeignet ist. Weiterhin ist zu prüfen, ob der Bezug auf die Gesamt-RNA zu ähnlichen Resultaten führt wie der Bezug auf das Referenzgen.

Transkriptionsfaktoren sind wesentliche Regulatoren der Genexpression. Eine weitere Zielstellung der Arbeit ist daher zu prüfen, ob es einen Transkriptionsfaktor gibt, der *in vitro* und *in vivo* ähnlich wie Prestin reguliert wird.

Auf der Grundlage der bisherigen Kenntnisse könnten folgende Substanzklassen als potentielle Einflussfaktoren auf die Prestin-Expression von Bedeutung sein: Liganden von nukleären Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. Zugleich stellt sich die Frage, ob eine langanhaltende Aktivierung der äußeren Haarzellen zu Veränderungen der Prestin-

Expression führt.

Eine klassische Substanz, die die Prestin-Expression beeinflusst, ist das Schilddrüsenhormon Thyroxin (T_4) [59], der entsprechende Transkriptionsfaktor ist der T_4 -bindende Rezeptor. Zu dieser Familie von Rezeptoren gehört auch der Rezeptor für Retinsäure und für Substanzen, die die PPARs aktivieren. Eine solche Substanz ist Gemfibrozil. Zu den Wachstumsfaktoren, die einen großen Effekt auf die Innenohrentwicklung haben, gehören IGF und TGF- β . Zu den Neurotransmittern, die die Funktionen der äußeren Haarzellen beeinflussen könnten, gehören Acetylcholin und adrenerge Substanzen. Ein häufig verwendetes experimentelles Modell für die chronische Aktivierung von Neuronen ist die Kalium-induzierte Depolarisation.

Somit ergibt sich für die vorliegende Arbeit die Untersuchung der Effekte folgender Substanzen bzw. Bedingungen auf die Prestin-Expression in der Kultur: T_4 , Retinsäure, Gemfibrozil, IGF, TGF- β , ACh, Memantin, Phenylephrin und erhöhte K^+ -Konzentration.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Substanzen

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

Verbrauchsmaterialien

Einmalfilter 0,2 µm (Schleicher-Schuell)
Einmalspritze 1 ml, 10 ml, 20 ml (Becton Dickinson)
Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml (Braun)
Einmaltransferpipette 3,5 ml (Sarstedt)
Einwegskalpell No.20 (Feather)
Kanüle 21 G (Braun)
Kulturflasche 250 ml; 750 ml (Falcon)
LightCycler[®] Kapillaren, 20 µl (Roche)
Membranfilter, Vacuflow 0,2 µm, 125 ml (Schleicher-Schuell)
Mullkompressen, steril 10 cm x 10 cm (MaiMed)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml (Biozym)
PCR-Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf)
Petrischalen ø 35 mm, 60 mm, 150 mm (Falcon)
Pipettenspitzen Tips Filter PCR-clean (Eppendorf)
Pipettenspitzen Tips Reloads (Eppendorf)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf)
Röhrchen, konisch 15 ml, 50 ml (Falcon)

Röhrchen, konisch 50 ml (Sarstedt)
Rundbodenröhrchen 5 ml (Falcon)
Spritze mit Kanüle 1 ml, 26 G (Braun)
UVette, Küvette (Eppendorf)
Zellkulturplatten, 4 Kavitäten (Nunc)

Grundmedium (modifiziert nach Löwenheim [70])

D(+)-Glukose 0,6 % (Glukose-Endkonzentration: 0,9 %; Sigma-Aldrich)
DMEM/F12 1:1 (Gibco)
Fötale Bovines Serum 10 % (FBS; Biochrom)
Insulin-Transferrin-Natriumselenit 10 µg/ml - 10 µg/ml - 10 ng/ml (Roche)
Penicillin 100 U/ml (Biochrom)
rh IGF-1 24 ng/ml (R&D)

Puffer, Lösungen, Substanzen

(±)-Epinephrine (Sigma-Aldrich): $(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{NHCH}_3)\text{OH}$
(±)-Propranolol hydrochloride (Sigma-Aldrich): $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$
(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride (Sigma-Aldrich)
Acetylcholine chloride (Sigma-Aldrich): $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3\text{Cl}^-$
β-Mercaptoethanol (β-ME; Merck); Lysispuffer: 100 µl β-ME in 10 ml RLT-Puffer
BD Ceell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive (BD Biosciences)
Bromphenolblau (0,25 %; Merck)
BSG (Gepufferte Salz-Glukose-Lösung, buffered saline glucose): 116 mM NaCl, 27,2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 6,1 mM KH_2PO_4 , 11,1 mM Glukose, Braun Aqua dest., pH 7,4, 295-310 mOsmol/l
Carbamoylcholine chloride (Sigma-Aldrich): $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Cl})(\text{CH}_3)_3$
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane; Sigma-Aldrich); Anti-fading Mix: 2,5 g, 20 ml PBS, 80 ml Glycerin
DEPC behandeltes H₂O (Roth)
Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva)
DNA Molecular Weight Marker V (Roche)
Ethanol (96 %; Merck); RPE-Puffer: RPE-Konzentrat zzgl. 4faches Volumen EtOH
Ficoll 400 (30 %; Pharmacia)
GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Cambrex)
Gemfibrozil (Sigma-Aldrich): $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$

Genagarose Tiny III (Inno-train)

Ionosteril päd II (Fresenius)

Ladepuffer (5x) für Gelelektrophorese in TBE (10x), 1:1 Aqua dest.:

L-Thyroxine sodium salt pentahydrate (T₄) (Sigma-Aldrich)

Memantine hydrochloride (Sigma-Aldrich): C₁₂H₂₁N · HCl

Na₂EDTA x 2 H₂O 0,2 M (Roth)

Paraformaldehyd (100 ml 4 %iger Fixator): 4 g Paraformaldehyd, 1 ml NaOH (1 M), in 45 ml Aqua dest. bei max. 60 °C lösen, pH 6,8, 50 ml Phosphaftpuffer (0,2 M), Aqua dest.

PB (Phosphatpuffer, phosphate buffer; für Fixatorherstellung): 83 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 104,5 mM Na₂HPO₄ x H₂O, Aqua dest., pH 6,6

PBS (Phosphat gepufferte Salz-Lösung, phosphate buffered saline), Tablette in Millipore-H₂O (10mM Phosphat, 150mM NaCl, pH 7,2 -7,3; Gibco); Arbeitslsg. (3,8 µM): 20 µl Stammlösung, 480 µl PBS

Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich); Stammlsg. (95 µM): 0,1 mg in 100 µl DMSO lösen, 700 µl Retinoic acid (Sigma-Aldrich, Retinsäure)

RiboGreen[®] RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, MoBiTec)

Strychnine hydrochloride (Sigma-Aldrich)

TBE (10x Tris/Boric Acid/EDTA Buffer) (Bio-Rad)

TGF-β (Upstate, Millipore)

Triton X-100 (Fluka, Sigma-Aldrich); 0,2 % Triton: 1 ml, 499 ml PBS

Xylencyanol (0,25 %; Roth)

RNA-Präparation

QIAshredder Homogenizers (Qiagen)

RNase-Free DNase Set (Qiagen)

RNeasy[®] Mini Kit (RLT-, RW1-, RPE-Puffer, Mini-Spinsäulen) (Qiagen)

RT und RT-PCR

dNTP 2,5 mM (Invitrogen)

LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche)

LightCycler[®] Kapillaren, 20 µl (Roche)

Oligo(dT) (BioTez)

Primer (BioTez): Tabelle 2

Reverse Transkriptase (RT) M-MLV und M-MLV RT 5x Reaktionspuffer (Promega)

Ribonuklease-Inhibitor RNasin[®] (Promega)

Tabelle 2: Verwendete Primer.

Gen Accession (Größe)	Sequenz (5' => 3')	Start	Stop
Oligo(dT)			
Forward primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT		
Reverse primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT		
Prestin NM_030840 (162 bp)			
Forward primer	CACAGAGTCCGAGCTACACAGTC	1508	1530
Reverse primer	TCAGTGCCTGCTGTACAAG	1669	1650
Tbp NM_001004198 (201 bp)			
Forward primer	ACCCCCTTGTATCCTTCACC	608	627
Reverse primer	CATGATGACTGCAGCAAACC	808	789
Gata-1 NM_012764 (183 bp)			
Forward primer	GAAGCGAATGATTGTCAGCA	851	870
Reverse primer	TTCTCGTCTGGATTCCATC	1033	1014
Gata-2 NM_033442 (170 bp)			
Forward primer	CCAGCAAATCCAAGAAGAGC	1645	1664
Reverse primer	CGTTGGCGTAGGTAGGATGT	1814	1795
Gata-3 NM_133293 (209 bp)			
Forward primer	GAGAGCAGGGACTTCCTGTG	936	955
Reverse primer	CATGCACCTTTTTGCAC	1141	1125
Gapdh NM_017008 (225 bp)			
Forward primer	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	29	48
Reverse primer	CTTGACTGTGCCGTTGAACT	253	234
c-fos X06769 (179 bp)			
Forward primer	AGAATCCGAAGGGAAAGGAA	555	574
Reverse primer	TGGGCTGCCAAAATAAACTC	733	714
NfκB XM_342346 (204 bp)			
Forward primer	AGGCCATTGAAGTGATCCAG	3099	3118
Reverse primer	CAGTGAGGGACTCCGAGAAG	3302	3283

Geräte

Arbeitsbank, Laminarflowbox (Gelaire)

Biophotometer Genequant II (Eppendorf)

Feinpräparationsinstrumente (Fine Science Tools)

Fluoreszenzmikroskop DMIL (Leica, Microsystem Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany)

Gelelektrophoresekammer und –träger, Biometra® Standard Power Pack P25 (MBT Brand)

Inkubator (Revco Scientific, Inc. Asheville, NC, USA)

Millipore-Anlage, 0,22 µm

Perkin Elmer Cetus, GeneAmp PCR System 9600

Stereomikroskop (Zeiss, Jena, Germany)

Tischzentrifuge 5417 R (Eppendorf)

Tischzentrifuge Mini (VWR Galaxy)

Vollautomatisches Geldokumentations- und Analysesystem GeneGenius (Bio Imaging System)

3.2 Präparation des Cortischen Organs

Die Erlaubnis zur Tiertötung und Organentnahme erteilte das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi), Berlin (T 0234/00). Die Präparation der Cochlea aus neonatalen Wistar-Ratten erfolgte in Anlehnung an Sobkowicz et al. (1993) [71] und Löwenheim et al. (1999) [70]. Je Versuchstag wurden 6 bis 15 Tiere präpariert. Bis zur Präparation befanden sich die Tiere in einer Styroporbox mit etwa 37 °C warmen Gelakkus, damit sie nicht auskühlten. Um einer möglichen Exsikkose der Tiere entgegenzuwirken, wurde den Tieren etwa 150 µl einer Elektrolyt-Glukose-Lösung (Ionosteril päp II) subkutan in die Nackenfalte injiziert. Mit einer chirurgischen Schere wurden die Versuchstiere im distalen Bereich der Halswirbelsäule dekapitiert. Der Kopf wurde mit 70 %igem Alkohol oberflächendesinfiziert und auf einer sterilen Mullkomresse mit der Schnittfläche nach unten kurz ausgeblutet. Anschließend wurde die Kopfhaut und die darunter liegenden Weichteile mit Hilfe einer anatomischen Pinzette und einer kleineren chirurgischen Schere entfernt. Das nun freiliegende Neurocranium wurde beginnend an der Crista occipitalis externa entlang der Sutura sagittalis aufgeschnitten, dann der Schädel mit einem Einmalskalpell in der Median-Sagittalebene gespalten. Die Hirnmasse wurde mit einem Rundspatel entfernt. Mit einer chirurgischen Schere wurde die Pars petrosa des Os temporale separiert und in eine Petrischale (60 mm) mit gekühlter steriler BSG-Penicillin-Lösung überführt.

Die weitere feingewebliche Präparation wurde von Frau Dr. Amarjargal (Ärztin) und Frau Fuchs (Chemie-Ingenieurin) durchgeführt. Verwendet wurden ein Stereomikroskop und Feinpräparationsinstrumente. Die folgenden Präparationsschritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen in einer Laminarflowbox in steriler BSG-Penicillin-Lösung.

Die Cochlea hat prinzipiell zwei präparatorische Zugänge, von medial nach lateral (schädelauswärts) vom Felsenbein zur Basis cochleae und von lateral nach medial durch das Trommelfell (schädleleinwärts). Verwendet wurde der erste Zugangsweg, da so ein geringeres präpara-

tionsbedingtes Verletzungsrisiko für die Zielregion bestand. Die Cochlea mit der noch knorpeligen Kapsel wurde aufgesucht und aus dem umgebenden Felsenbein gelöst. Anschließend wurde die häutige Cochlea von der Kapsel und der Lamina ospiralis ossea getrennt. Es folgte die Überführung des Präparates in eine saubere Petrischale (35 mm). Die Präparationsinstrumente wurden gewechselt. Der Modiolus, die knöcherne Achse der Cochlea, wurde fixiert und die Cochlea vorsichtig davon gelöst. In der Folge lag die Cochlea linear vor und das bindegewebige Ligamentum spirale, welches die Stria vascularis enthält, konnte von basal nach apikal in einem Stück abgezogen werden. Das vorliegende Cortische Organ wurde entsprechend den Windungen in drei Fragmente gleicher Größe geteilt: ein apikales, mediales und basales Fragment.

Alle Präparationsinstrumente wurden vor und zwischen den einzelnen Präparationsschritten mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Das mehrmalige Überführen des Präparates in frisches Präparationsmedium diente der Keimverdünnung, um eine mögliche Kontamination der Kultur zu vermeiden.

3.3 Die organotypische Kultur des Cortischen Organs

Für unsere Untersuchungen nutzten wir die organotypische Kultur des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Wistar-Ratten. Die Zusammensetzung des Mediums für das in-vitro-Modell orientierte sich an Arbeiten von Löwenheim et al. [70]. Als Grundmedium diente Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 nutrient mixtures (DMEM/F12) mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Insulin, 10 µg/ml Transferrin, 10 ng/ml Natriumselenit, 0,6 % D(+)-Glukose (0,9 % Endkonzentration im Medium). Für spezifische Fragestellungen wurde die Zusammensetzung des Mediums modifiziert. Das Medium wurde jeweils am Morgen des Versuchstages steril hergestellt.

Die drei Fragmente wurden getrennt voneinander jeweils in einer mit 500 µl Medium gefüllten Kammer kultiviert. Zur Positionierung der Fragmente wurden je Kammer 350 µl Medium entnommen und in der vierten leer verbliebenen Kammer gesammelt. Die Fragmente wurden ausgerichtet und waren nach etwa 2 Minuten am Kammerboden angeheftet, so dass das Medium vorsichtig wieder aufgefüllt wurde. Die Inkubation der Kulturen erfolgte in einem mit 5 % CO₂ begasten Inkubator bei 37 °C (Standardbedingungen) für die Dauer von 48 bzw. 72 Stunden.

3.4 Darstellung der Haarzellen

Um die Anzahl und Vitalität der einzelnen Haarzellen sowohl im Frisch- als auch im Kultur-Präparat zu bestimmen, wurden diese fixiert und mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (Phal-

loidin-TRITC) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Für die semi-quantitative Darstellung und Auswertung des Prestin-Proteins der äußeren Haarzellen wurden diese nach der Fixierung immunhistochemisch gefärbt und in einer Geldokumentationsanlage ausgewertet.

Fixierung: Zunächst wurde das Medium entfernt und die Präparate zweimal vorsichtig mit etwa 500 µl BSG gewaschen. Dann wurde das Gewebe 30 Minuten in 4 %igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Erfolgte die Färbung nicht direkt im Anschluß, wurden die fixierten Präparate in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

Phalloidinfärbung und Haarzellzählung: Phalloidin ist das Gift des Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*). Es bindet sich hochaffin an filamentäres Aktin (F-Aktin). Das Aktinfilament ist aus zwei helikal angeordneten Strängen globulärer Unterheiten (G-Aktin) aufgebaut. Gewöhnlich sind die Aktinfilamente zu schlanken Bündeln zusammengefügt, die der Stabilisierung der Zellen dienen. Das Monomer (globuläres oder G-Aktin) steht im Gleichgewicht mit dem Polymer (F-Aktin). Die Depolymerisierung wird durch das Phalloidin gehemmt.

An das Phalloidin ist der Fluoreszenzfarbstoff TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) gekoppelt, so dass die aktinreichen Stereozilien und die Kutikularplatten der Haarzellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar werden. Aufgrund der heterogenen Morphologie, der unterschiedlichen Lage im Cortischen Organ und typischen Stereozilienanordnung lassen sich IHZ und ÄHZ klar voneinander unterscheiden.

Das fixierte Gewebe wurde zunächst mit 0,2 %iger Triton-PBS-Lösung für 30 Minuten permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Um Reagenzien einzusparen, wurde um jedes Fragment ein kleiner Plastikring (5 mm) platziert, in den 20 µl Phalloidin (1 µM) appliziert wurden. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde der Plastikring entfernt, das Präparat erneut mit PBS gewaschen und ein Antifading-Mix appliziert. Die beschriebenen Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bis zur Auswertung wurden die gefärbten OC-Fragmente dunkel und kühl (4 °C) gelagert.

Die Zählung der Haarzellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Filter N 2.1) mittels eines Glasobjektträgers mit µm-Skalierung. Um die Zählung zu standardisieren und somit ihre Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden Auswertungs- bzw. Zählkriterien festgelegt: (1) je Fragment werden 3 bis 5 verschiedene repräsentative Abschnitte ausgezählt; (2) der auszuzählende Abschnitt ist 100 µm lang; (3) die Haarzellreihung, d.h. eine Reihe IHZ und drei Reihen ÄHZ, muss gut sichtbar sein; (4) ein Abschnitt muss aus mindestens 20 gut erkennbaren zusammenhängenden ÄHZ bzw. ihren Fehlstellen bestehen; (5) Abschnitte mit mechanischen Alterationen

werden nicht ausgezählt; (6) Haarzellen werden als vorhanden gezählt, wenn die Kutikularplatte und die Stereozilien intakt sind, andernfalls werden sie als Fehlstellen gezählt. Die Dokumentation der Zählungen erfolgte mittels eines standardisierten Zählprotokolls.

3.5 Immunhistochemische Färbung von Prestin- und Gata-3-Protein

Prestin- und GATA-3-Färbung: Um eine Aussage über die Expression des Prestinproteins zu bekommen, wurde das Prestinprotein immunhistochemisch gefärbt [57]. Die fixierten Präparate wurden 10 Minuten in 0,5 %iger Triton-PBS-Lösung permeabilisiert und danach in PBS gewaschen. Nicht-spezifische Bindungsstellen wurden mit 4 %igem normalem Eselserum in PBS eine Stunde blockiert. Für die Prestinfärbung wurden die Präparate über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (1:50 Verdünnung des affinitätsgereinigten polyklonalen Prestinantikörper N-20, 200 µg/ml) in einer Lösung inkubiert, die PBS, 2 % NaCl, 1 % normales Eselserum, 0,1 % Triton X-100 enthält [59]. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Präparate mit dem Fluorescein-(FITC-) konjugiertem affinitätsgereinigtem Sekundärantikörper (1:200 Verdünnung, Esel-anti-Ziege IgG) 60 Minuten lang inkubiert [20]. Ein Antifading-Mix wurde appliziert und die Präparate anschließend mit einem Axio Mikroskop (Imager A1, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) untersucht. Das GATA-3-Protein wurde in Anlehnung an Steenbergen et al. (2002) [72] gefärbt. Der Primärantikörper ist GATA-3 (HG3-31) monoklonales Maus-anti-GATA-3 (#sc-268, Santa Cruz, 200 µg/ml, 1:100). Der Immunnachweis wurde mit dem entsprechenden sekundären FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (#115-095-003, Jackson Dianova, 1:200) durchgeführt.

Quantitative Bestimmung des Prestin-Proteins: Um die Expression von Prestin-Protein in den organotypischen Kulturen zu quantifizieren, wurde ein Vorgehen genutzt, welches auf der immunhistochemischen Identifikation von Prestin in der Membran, auf der Visualisierung von Prestin mittels Konfokalmikroskopie und auf dem Erfassen der Membranen der äußeren Haarzellen mittels Gelscan-Programm-Paket (GelScan V5.01, BioSciTec, Marburg, Deutschland) basiert. Um sicher zu stellen, dass alle Fragmente unter denselben Bedingungen gefärbt werden, wurden diese zusammen auf einem mit Zell- und Gewebekleber (Cell-Tal, B&D, Bedford, MA) bedeckten Glasobjektträger befestigt, mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA) umrandet und dann gefärbt.

Die konfokalen Bilder der äußeren Haarzellmembranen wurden mit einem aufrechten Lasermikroskop (Leica DM 2500), ausgestattet mit einem 63x Objektiv, in Öl-Immersion, mit Hilfe einer 488 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers angefertigt. Die optischen Schnitte wurden von

dem mittleren Teil der Zellregion zwischen der Kutikularplatte und dem Nukleus angefertigt. Zur Bestimmung der Intensität der Prestin-Protein-Expression in den Membranen der äußeren Haarzellen wurde das Gelscan-Programm-Paket verwendet. Die Abbildung der Prestin gefärbten äußeren Haarzellmembran wurde als Probenspur betrachtet, die aus einem Höchstwert, der Membran, einem Tiefstwert, dem Zytosol (Hintergrund) und einem zweiten Höchstwert, der gegenüberliegenden Membran, besteht. Dieses Histogramm wurde genutzt, um die *differential integrated density*, kurz DID, das heißt den Farbdichtewert der Banden mit abgezogenem Hintergrund, zu ermitteln, ausgedrückt in Pixelwerten der Graustufen. Die Ergebnisse zeigen, dass dies ein effizientes System darstellt, um quantitative Veränderungen in der Protein-Expression von Prestin zu detektieren. Der spezielle Vorteil dieses Verfahrens besteht in der Möglichkeit, die Prestin-Protein-Expression in jedem einzelnen Segment des Cortischen Organs zu ermitteln. Es wurden je Segment 30 äußere Haarzellen untersucht.

Die Präparate wurden im Konfokalmikroskop der Arbeitsgruppe Frau Dr. Pohl/Frau Dr. Smorodchenko (Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité) photographiert und die Bilder digitalisiert. Die immunhistochemischen Färbungen von Prestin- und GATA-3-Protein, sowie die Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse wurde von Frau Fuchs durchgeführt.

3.6 Isolierung und Quantifizierung der RNA

Die sowohl frisch als auch nach jeweiliger Kutivierungsdauer gewonnen RNA-Proben wurden zu je drei bzw. zwei Fragmenten gepoolt, um eine ausreichende RNA-Menge zu gewinnen. Die RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit isoliert. Das Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von RNA auf der Silicagel-Membran und der Mikrozentrifugationstechnik. Es beinhaltet folgende Schritte:

- 1) Lyse in GITC- (Guanidinisothiocyanat-) haltigem Puffer und Homogenisierung des Gewebes durch Zerkleinern auf der QIAshredder Spinsäule,
- 2) Einfrieren bei -80 °C oder sofortige Weiterverarbeitung;
- 3) Einstellen der Bindungsbedingungen mittels Ethanolzugabe;
- 4) Bindung der Gesamt-RNA auf der RNeasy Spinsäule durch Adsorption der RNA an die Silicagel-Membran, Zentrifugation;
- 5) 4 Waschschrte mit RW1 und RPE zum Entfernen von Kontaminationen, Zentrifugation;
- 6) Eluieren der RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser, Einfrieren bei -80 °C.

Die RNA-Isolation wurde entsprechend der Vorschrift des RNeasy® Mini Kit Handbuchs

durchgeführt. Um letzte DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde nach dem ersten Waschgang eine DNase-Verdauung in der RNeasy Mini-Spinsäule mit Hilfe des optionalen RNase-Free DNase Sets durchgeführt. Eventuelle DNase-Reste werden in den nachfolgenden Waschgängen wieder entfernt.

Die quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte über zwei Verfahren: (1) Spektrophotometrie mittels Biophotometer und (2) Fluorometrie mittels RiboGreen[®].

Während die photometrische RNA-Messung zuverlässig nur bis in den µg/ml-Konzentrationsbereich messen kann, ermöglicht die RiboGreen[®]-Methode eine RNA-Konzentrationsbestimmung im ng/ml-Bereich (Messbereich: 1 ng/ml - 1 µg/ml) und ist somit um etwa das 1000fache sensitiver. Die RiboGreen[®]-Methode ist verglichen mit der spektrophotometrischen Messung im Biophotometer erheblich zeitintensiver.

Die Ergebnisse beider Messmethoden wurden in einer Testreihe miteinander verglichen. Gemessen wurden je 4 Lungen- und Lebergewebeproben. Die Ergebnisse beider Methoden variierten um den Faktor 1 bis 1,4, wobei die im Biophotometer gemessenen RNA-Konzentrationen geringer waren. Die A260/A280-Ratio betrug 1,7 bis 1,8.

Zur Quantifizierung der RNA aus den OC-Fragmenten wurde die RiboGreen[®]-Methode genutzt.

3.7 Quantifizierung der mRNA mittels Real-time-Polymerase-Kettenreaktion

Die mRNA wurde mit dem LightCycler mittels Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR) bestimmt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über zwei Verfahren: (a) der Prestin-mRNA Gehalt wurde auf 1 ng Gesamt-RNA bezogen, ausgedrückt in arbitrary units (AU oder RE_{RNA}, relative Einheiten), (b) die Prestin-mRNA Expression wurde auf die Expression eines house-keeping Gens als Referenzgen bezogen, ausgedrückt als Ratio (Berechnung nach Pfaffl [73]). Prinzipiell beinhaltet die real-time PCR folgende Schritte:

- 1) Denaturierung/ Linearisierung;
- 2) Reverse Transkription der RNA in cDNA;
- 3) Amplifikation.

Die real-time PCR kann entweder in einem, d.h. cDNA-Synthese und PCR sind gekoppelt im selben Röhrchen, oder in zwei Schritten, d.h. cDNA Synthese erfolgt unabhängig von der PCR, durchgeführt werden. Die Ein-Schritt-Methode hat den Vorteil, dass sie sehr schnell ist, allerdings ist das System schlechter kontrollierbar und es treten eher Artefakte auf. Die Zwei-Schritt-Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, benötigt mehr Zeit, allerdings können

mehrere mRNA-Spezies aus derselben cDNA analysiert werden.

Alle Pipettierschritte wurden auf Eis ausgeführt. Die Reaktionsreagenzien wurden zunächst in einem Mix zusammenpipettiert und dann zu jeden Proben-Ansatz pipettiert.

Linearisierung und reverse Transkription (RT): Der erste Schritt dient der Linearisierung der RNA, d.h. dem Auflösen von Sekundärstrukturen. Pro Ansatz wurden 5,6 µl RNase-freies Wasser (in der Folge „Wasser“), 0,4 µl RNasin und 5 µl der RNA-Probe bzw. Wasser (Leerwert) in einem 0,2 ml (PCR-) Eppendorfgefäß vermischt und im Perkin Elmer für 5 Minuten auf 70 °C erwärmt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Im zweiten Schritt erfolgt die cDNA-Synthese. Je Ansatz wurden 4 µl RT-Puffer (5x), 0,25 µl RNasin, 0,125 µl M-MLV-Reverse-Transkriptase, 4 µl dNTP-Mix (10 µM) und 1 µl Oligo-dT-Mix (75,8 µM) zugefügt und für 60 Minuten auf 42 °C erwärmt, dann für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Real-time PCR: Der dritte Schritt erfolgte mit dem Roche LightCycler[®] System. Das System beinhaltet folgende Programme: die Prä-Inkubation (95 °C, 10 min) zur Aktivierung der Polymerase und zur Denaturierung der DNA, die Amplifikation der DNA-Zielsequenz, das Erstellen der Schmelzkurven zur Identifikation des PCR-Produkts und schließlich das Abkühlen auf 40 °C.

Ein Amplifikationszyklus besteht aus der Denaturierung (95 °C, 10 s), dem Anlagern des Primers (Primer-spezifische Temperatur, 10 s; Tabelle 3) und der Extension (72 °C, 15 s). Das LightCycler[®]-System-Protokoll wurde für jede Zielsequenz anhand einer Effizienzkurve optimiert.

Tabelle 3: Primer-spezifische Annealing-Temperaturen und Effizienzen.

Gen (Größe)	Amplifikation	Schmelzkurve	Effizienz
Prestin (162)	70 °C	65 °C	1,9
Tbp (201)	66 °C	60 °C	1,9
Gapdh (226)	66 °C	55 °C	2,0
Gata-1 (183)	66 °C	55 °C	2,0
Gata-2 (170)	64 °C	55 °C	1,9
Gata-3 (174)	66 °C	50 °C	1,9

Größe der Primer in Basenpaaren (bp) angegeben.

Jeder Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl zusammengesetzt aus je 1 µl 3'- und 5'-Primer (10 µM), 4 µl Master Mix (Roche), abhängig von der Zielsequenz 1 – 5 µl cDNA (Tabelle 4) und Wasser (PCR-Grad).

Tabelle 4: cDNA-Einsatz in PCR.

Gen (Größe)	cDNA-Einsatz	Gen (Größe [bp])	cDNA-Einsatz
Prestin (162)	5 µl	Gata-1 (183)	5 µl
Tbp (201)	3 µl	Gata-2 (170)	3 µl
Gapdh (226)	1 µl	Gata-3 (174)	3 µl

Größe der Primer in Basenpaaren (bp) angegeben.

Gelelektrophorese und Dokumentation: Zur Auswertung der PCR-Produkte wurden diese nach ihrem Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden 1-2 µl Amplifikat (bzw. Leerwert) mit 2 µl Ladebuffer in 10 µl (Gesamtvolumen) TBE-Puffer und der Molekulargewichtsmarker V (8-587 bp) auf ein SybrGreen-haltiges 3 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung in einer Gelelektrophoresekammer erfolgte bei 100 V für etwa. 45 Minuten. Die DNA-Banden wurden mittels eines Geldokumentations- und -analysesystems dargestellt und digitalisiert.

Auswertung der Gen-Expressionswerte der real-time PCR: Die Ergebnisse der real-time PCR wurden unter Verwendung von zwei verschiedenen Bezugssystemen ausgewertet: (1) bezogen auf die Gesamt-RNA und (2) bezogen auf ein Referenzgen.

Normiert auf die Gesamt-RNA: Der relative Gehalt des Zielgens in den Proben wurde auf 1 ng Gesamt-RNA der jeweiligen Probe normiert und in relativen Einheiten (RE_{RNA}) ausgedrückt [74]. Die Grundlage der Berechnung der Amplifikate der real-time PCR ist die Intensität des Fluoreszenzsignals (F) am Crossing Point (CP), welche das Produkt aus der Menge (N_0) des Zielgens und der Effizienz (E) hoch dem CP-Wert einer bestimmten eingesetzten RNA-Menge (CP_x) ist:

$$F = N_0 \times E^{CP_x}; N_0 = \frac{F}{E^{CP_x}}.$$

Logarithmiert man die Gleichung und geht davon aus, dass N_0 proportional zur eingesetzten RNA-Menge (RNA_x) ist, erhält man folgende Gleichung:

$$\log(F) = \log(RNA_x) + CP_x \times \log(E).$$

Davon ausgehend, dass alle CP-Werte des Zielgens innerhalb eines PCR-Durchgangs per Definition mit derselben Fluoreszenzintensität korrespondieren und die CP-Werte auf eine eingesetzte RNA-Menge von 1 ng normiert werden, ergibt sich für den normierten CP-Wert ($CP_{norm.}$) folgende Gleichung:

$$CP_{norm.} = \frac{\lg(RNA_x)}{\lg(E)} + CP_x.$$

Setzt man F gleich eins und verwendet die normalisierten CP-Werte kann der Gehalt der

mRNA des Zielgens in relativen Einheiten berechnet werden:

$$RE_{RNA} = \frac{1}{E^{CP_{norm}}}.$$

Um den Umgang mit den in relativen Einheiten ausgedrückten Werten zu erleichtern, werden die erhaltenen RE_{RNA} mit dem Faktor 10^{11} multipliziert.

Normiert auf ein Referenzgen: Die Auswertung der real-time PCR erfolgte mittels relativer Quantifizierung nach Pfaffl [73]. Hierbei werden die Werte der mRNA-Expression eines Zielgens auf den Expressionswert eines nicht-regulierten Referenzgens (*housekeeping gene*) normiert. Die relative Expressionsratio des Zielgens (R), ausgedrückt als relative Einheit normiert auf das Referenzgen (RE_{Tbp}), berechnet sich aus den Effizienzen (E) der PCR und der Differenz der Crossing Points (ΔCP) des Ziel- und des Referenzgens:

$$R = RE_{Tbp} = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta CP(\text{Zielgen})}}{E(\text{Referenzgen})^{\Delta CP(\text{Referenzgen})}}.$$

Die CP-Werte der Proben werden auf einen in jedem Experiment mitgeführten Calibrator normiert:

$$\Delta CP = CP(\text{Calibrator}) - CP(\text{Probe}).$$

Die Effizienz berechnet sich anhand der Steigung der Standardkurve aus der Anzahl der Zyklen am Crossing Point und der eingesetzten cDNA-Menge:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}.$$

Die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels real-time PCR ist derzeit die geeignetste Methode der mRNA-Quantifizierung [73].

3.8 Methodische Varianz

Über den gesamten Zeitraum wurde jedem Versuch ein Calibrator als weitere Probe zugefügt. Dieser besteht aus einem Pool von Cochleagewebe der neonatalen Ratte. Die Cochleae neugeborener Ratten wurden gesammelt und das Gewebe aufbereitet. Der so gewonnene Cochlea-Pool wurde aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Calibrator dient einerseits zur Auswertung der RT-PCR-Daten (Kapitel 3.7), andererseits zur Qualitätskontrolle der experimentellen Arbeit über den gesamten Zeitraum. Um die Tag zu Tag Varianz der RT-PCR zu detektieren, wurden die CP-Werte der Calibrator-Proben entlang der Zeitachse ausgewertet (Abbildung 4).

Der Variationskoeffizient beträgt für *Prestin* 2,5 Prozent, für *Tbp* 1,8 Prozent, für *Gata-3* 2,3 Prozent, für *Gata-2* 4,9 Prozent und für *Gata-1* 1,3 Prozent. Die Varianzen der CP-Werte des Calibrators entsprechen einem Variationskoeffizienten des Calibrators bezogen auf die Gesamt-

RNA (RE_{RNA}) von 22 Prozent für Prestin, 15 Prozent für Tbp, 20 Prozent für Gata-3, 28 Prozent für Gata-2 und 17 Prozent für Gata-1.

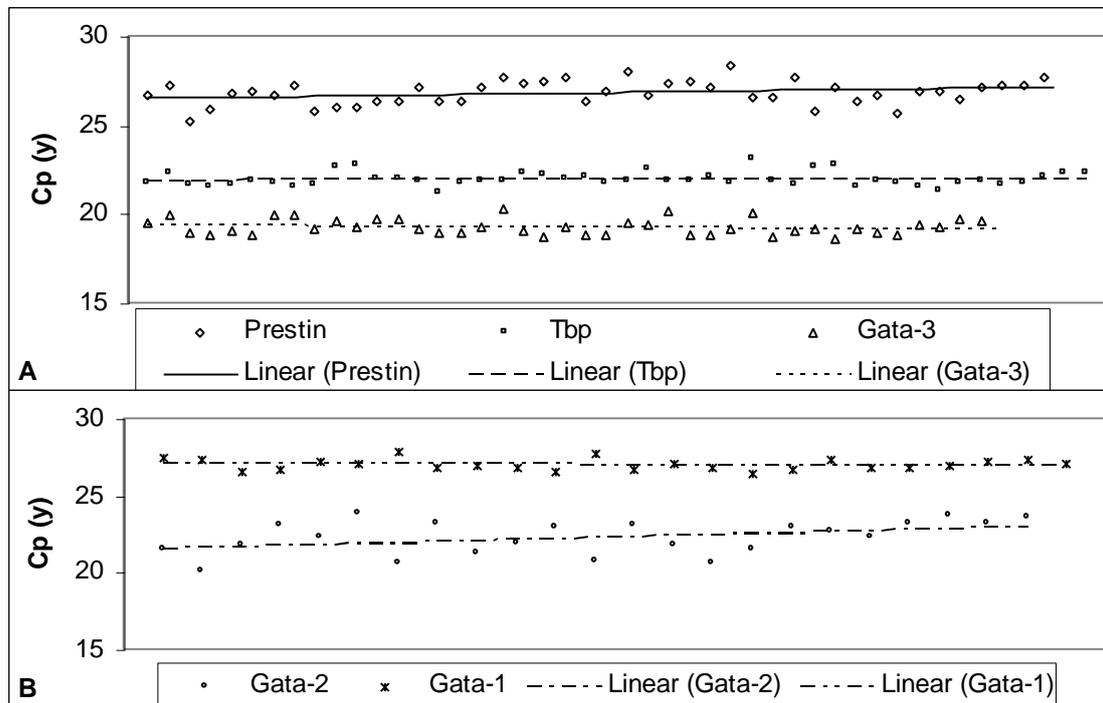


Abbildung 4: CP-Werte der Prestin-, Tbp-, Gata-3-, Gata-2- und Gata-1-mRNA des Calibrators während der experimentellen Arbeit. A: Prestin, Tbp und Gata-3. B: Gata-2 und Gata-1. Dargestellt sind die Einzelwerte des CP-Werts der RT-PCR. Die Geraden repräsentieren die Gleichungen der linearen Regression: Prestin $y = 0,01x + 26,47$; $R = 0,280$; $n = 44$. Tbp $y = x + 21,875$; $R = 0,056$; $n = 46$. Gata-3 $y = -0,01x + 19,36$; $R = 0,147$; $n = 41$. Gata-2 $y = 0,07x + 21,42$; $R = 0,406$; $n = 23$. Gata-1 $y = x + 27,00$; $R = 0,073$; $n = 24$. CP-Wert...Crossing Point.

3.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms STATISTICA 6.0. Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) wurden berechnet und mit Hilfe des Programms MS-Excel dargestellt. Die Daten wurden mittels ANOVA analysiert und mittels post-hoc-Test (Scheffé-Test, LSD) verglichen. Als signifikant wurden $p < 0,05$ gewertet.

Der konservative Scheffé-Test wurde verwendet, um nicht nur paarweise Vergleiche durchzuführen, sondern alle möglichen linearen Kombinationen von Gruppenmittelwerten zu untersuchen. Dadurch ist für eine Signifikanz eine größere Differenz der Mittelwerte erforderlich.

Um bei negativem Scheffé-Test Tendenzen aufzuzeigen, wurde der liberalere Least-Significant-Difference-(LSD-)Test verwendet. Dieser paarweise multiple Vergleichstest detek-

tiert die geringste signifikante Differenz. Diese ergibt sich durch das Poolen der Varianzen der Gruppen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der organotypischen Kultur der neonatalen Ratte

Die Charakterisierung der organotypischen Kultur des Cortischen Organs (OC) neonataler Ratten erfolgte mittels Beurteilung des Zustandes der Haarzellen, der Haarzellzählung und RNA-Quantifizierung. Hierzu wurden drei Gruppen definiert: (1) Frischpräparat; (2) 48-Stunden-Präparat und (3) 72-Stunden-Präparat.

4.1.1 Zustand und Anzahl der Haarzellen

Das entsprechend den Windungen in drei gleichgroße Fragmente geteilte OC wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt und begutachtet. Hierzu wurde ein OC von 3 bis 5 Tage alten Ratten direkt nach der Präparation fixiert und diente als Ausgangswert (Frischpräparat), das kontralaterale Organ wurde kultiviert.

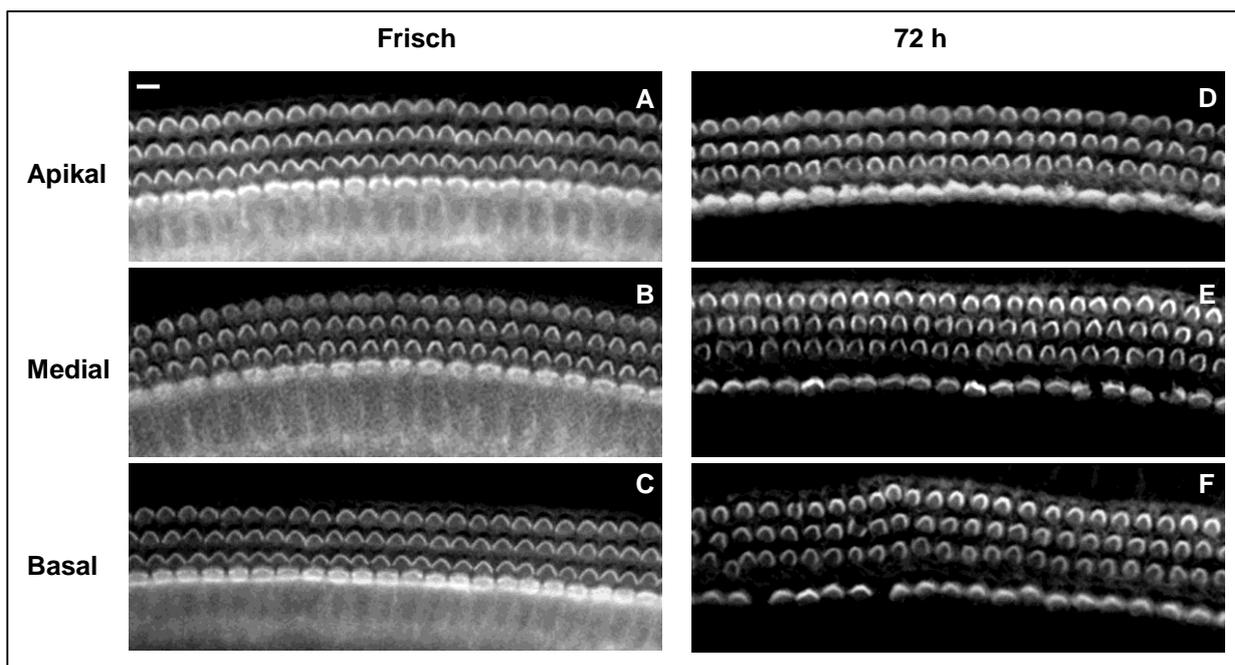


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der Phalloidin-gefärbten Haarzellen. A-C: Frisch fixiert. D-E: Nach 72 Stunden Kultivierung fixiert. Abgebildet sind jeweils ein apikales (A, D), mediales (B, E) und basales (C, F) Fragment. Der Maßbalken entspricht 10 μm .

Abgesehen von vereinzelt Läsionen bzw. Verlusten waren in allen drei Fragmenten, sowohl im Frisch- als auch im kultivierten Präparat, die inneren und äußeren Haarzellen intakt. Präparationsbedingte mechanische Läsionen gingen nicht in die Bewertung ein. Abbildung 5

zeigt links ein Frisch- und rechts ein 72-Stunden-Präparat. Von oben nach unten ist jeweils das apikale, mediale und basale Fragment abgebildet. Die Organstruktur ist erhalten und es liegen keine mechanischen Alterationen vor. Eine innere und drei äußere HZ-Reihen mit Stereozilien sind gut erkennbar. Es sind mehr als 20 aufeinander folgende äußere HZ abgebildet. Innere und äußere HZ lassen sich anhand ihrer typischen bogenförmigen Gestalt, ihrer Lage und ihrer Anzahl gut voneinander abgrenzen.

Es wurden die vorhandenen HZ gezählt. Abbildung 6 zeigt die graphische Auswertung der vorhandenen Haarzellen. Pro 100 µm Fragmentlänge befinden sich im Frischpräparat 10 IHZ, im 48- und im 72-Stunden-Präparat sind es 9 IHZ. Je äußere Haarzellreihe befinden sich in den frisch fixierten Präparaten im Mittel 13 ÄHZ, in den kultivierten Präparaten sind es 12 ÄHZ je Reihe. Da sich die drei äußeren Haarzellreihen jeweils in ihrer Anzahl an äußeren Haarzellen nicht unterscheiden, wurden sie in der Folge als Gesamtzahl der äußeren Haarzellen zusammengefaßt.

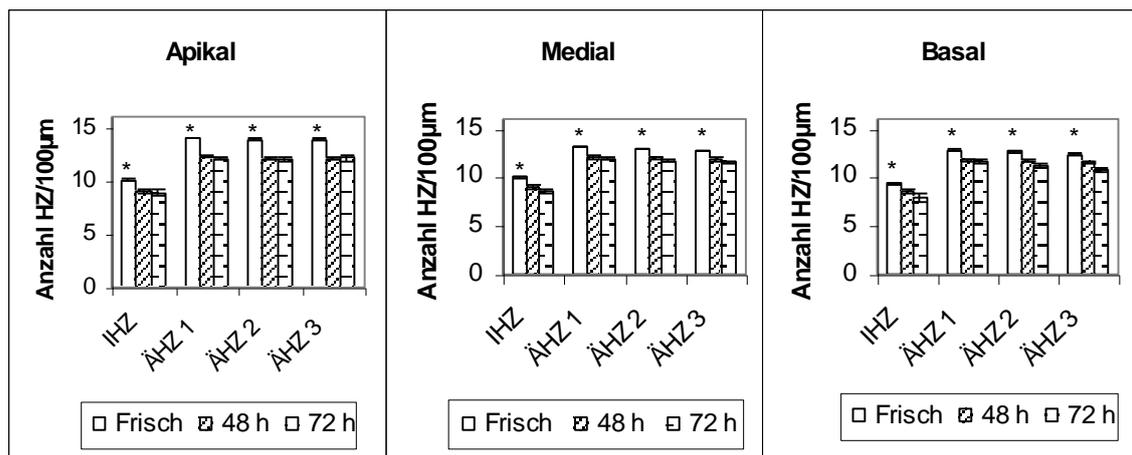


Abbildung 6: Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs. Gemittelte Anzahl der vorhandenen Haarzellen pro 100 µm im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs; frisch, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden in Kultur; jeweils gezählt in 3 bzw. 4 repräsentativen Abschnitten. Dargestellt sind MW ± SEM (frisch: n = 16-17, 48 h: n = 19-22, 72 h: n = 9-10). IHZ...innere Haarzellen; ÄHZ...äußere Haarzelle; ÄHZ 1...der inneren HZ anliegende äußere HZ; ÄHZ 2...der ÄHZ 1 anliegende äußere HZ; ÄHZ 3...der ÄHZ 2 anliegende äußere HZ. *...Signifikant nach Scheffé-Test: p < 0,001 frisch vs. Kultur.

Die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen im Cortischen Organ sinkt signifikant nach 48 bzw. 72 Stunden in Kultur. Um diesen Abfall der Haarzellanzahl zu analysieren, wurden parallel zu den vorhandenen (Tabelle 5) die degenerierten Haarzellen anhand der Fehlstellen ausgezählt (Tabelle 6). Dargestellt ist die Anzahl der vorhandenen und fehlenden inneren und äußeren

ren Haarzellen jeweils im apikalen, medialen und basalen OC-Fragment im Frischpräparat, im 48-Stunden- und im 72-Stunden-Präparat pro 100 µm, ausgedrückt als Median mit Angabe der 10er und 90er Perzentile.

Tabelle 5: Anzahl der vorhandenen inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.

	HZ	Apikal	Medial	Basal
Frisch		n = 17	n = 17	n = 17
	IHZ	10,0 (9,3 - 10,7)	10,1 (9,3 - 10,7)	9,1 (7,7 - 10,7)
	ÄHZ	41,3 (35,8 - 43,5)	39,2 (37,3 - 40,3)	37,6 (36,4 - 38,9)
48 Stunden		n = 19	n = 21	n = 16
	IHZ	9,2 (7,7 - 10,3)	9,1 (8,0 - 9,9)	9,2 (7,2 - 10,1)
	ÄHZ	36,8 (34,0 - 38,4)	35,7 (33,8 - 37,9)	35,7 (32,5 - 37,3)
72 Stunden		n = 9	n = 10	n = 7
	IHZ	9,7 (7,8 - 10,1)	8,7 (7,7 - 9,6)	8,5 (6,9 - 9,3)
	ÄHZ	36,8 (32,4 - 40,5)	35,2 (33,6 - 38,4)	33,9 (29,6 - 36,8)

Gemittelte Anzahl der vorhandenen Haarzellen pro 100 µm im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs im Frischpräparat, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden in Kultur. Dargestellt sind Median (10er - 90er Perzentile), sowie die Anzahl n der ausgewerteten Fragmente. IHZ...innere Haarzellen, ÄHZ...äußeren Haarzellen.

Tabelle 6: Anzahl der fehlenden inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.

	HZ	Apikal	Medial	Basal
Frisch		n = 17	n = 17	n = 17
	IHZ	0,0 (0,0 - 0,5)	0,0 (0,0 - 0,5)	0,8 (0,0 - 1,9)
	ÄHZ	0,0 (0,0 - 0,3)	0,0 (0,0 - 0,5)	0,0 (0,0 - 0,8)
48 Stunden		n = 19	n = 21	n = 16
	IHZ	0,3 (0,0 - 0,8)	0,5 (0,0 - 1,3)	0,5 (0,0 - 2,4)
	ÄHZ	0,2 (0,0 - 1,1)	0,0 (0,0 - 0,5)	0,4 (0,0 - 1,6)
72 Stunden		n = 9	n = 10	n = 7
	IHZ	0,3 (0,0 - 0,5)	0,9 (0,0 - 1,6)	0,8 (0,5 - 2,1)
	ÄHZ	0,0 (0,0 - 0,5)	0,1 (0,0 - 1,5)	0,5 (0,0 - 2,9)

Gemittelte Anzahl der Fehlstellen von Haarzellen pro 100 µm im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs im Frischpräparat, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden in Kultur. Dargestellt sind Median (10er - 90er Perzentile), sowie die Anzahl n der ausgewerteten Fragmente. IHZ...innere Haarzellen, ÄHZ...äußeren Haarzellen.

In den Frischpräparaten fehlen 3 Prozent der inneren Haarzellen, während die Reihen der äußeren Haarzellen keine Fehlstellen aufweisen. Nach 48 bzw. 72 Stunden in der Kultur fehlen etwa 6 Prozent der inneren und etwa 1 Prozent der äußeren Haarzellen. Es deutet sich eine Zu-

nahme des Zellverlustes in der Kultur an, es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Der Trend ist dadurch charakterisiert, dass die IHZ vulnerabler auf die Kultivierung reagieren als die ÄHZ. Der Verlust von inneren und auch äußeren Haarzellen während der Kultivierung ist im basalen Fragment am höchsten.

Die signifikante Differenz der vorhandenen Haarzellen vor und nach Kultivierung resultiert, wie die Zählung der Fehlstellen zeigt, nicht aus einem Untergang von Haarzellen. Vielmehr ist die verminderte Zellzahl nach 48 bzw. 72 Stunden Kultur gegenüber den Frischpräparaten auf das Anheften und Auswachsen der Fragmente auf dem Boden der Kultivierungsplatten und daraus resultierender Dehnung zurückzuführen.

4.1.2 Verhalten des RNA-Gehaltes

Die RNA-Konzentration wurde in den Frischpräparaten, d.h. etwa 2 Stunden nach der Präparation, und in den Kultur-Präparaten, nach 72 Stunden Kultur, bestimmt. Abbildung 7 zeigt die Mittelwerte der RNA-Konzentration im 30 µl Eluat im Frischpräparat verglichen mit dem 72-Stunden-Präparat im apikalen, medialen und basalen Fragment. Zu erkennen ist der RNA-Abfall nach 72 Stunden in Kultur um 59 Prozent von 28 ng/µl auf 12 ng/µl im apikalen Fragment. Im medialen OC-Abschnitt sank die RNA-Konzentration um 41 Prozent von 20 ng/µl auf 12 ng/µl und im basalen Fragment um 24 Prozent von 18 ng/µl auf 14 ng/µl.

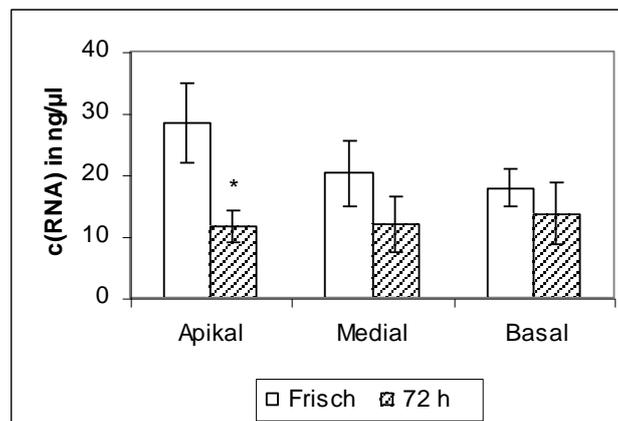


Abbildung 7: RNA-Konzentration frisch und nach 72 Stunden Kultur im apikalen, medialen und basalen Fragment. Für die RNA-Präparation wurden je Präparat 2-3 Fragmente gepoolt. Die Quantifizierung des RNA-Gehaltes erfolgte im 30 µl Eluat mittels RiboGreen. Dargestellt sind MW ± SEM der RNA-Konzentration in ng/µl, n = 6. *...Signifikant nach LSD-Test: $p < 0,02$ vs. frisch.

Es ist bedeutsam, dass der RNA-Abbau nicht durch Haarzellverlust bedingt ist, da nahezu alle Haarzellen am Ende der Kultur in intakter Form vorliegen (vgl. Tabelle 6, Seite 35). Dieser

Abfall ist am ehesten auf den Abbau von ribosomaler RNA infolge präparativ bedingter Zelluntergänge zurückzuführen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration in den vorliegenden Untersuchungen erfolgte, um in ausgewählten Versuchen einen Bezugswert zu haben, der unabhängig von einem Referenzgen ist.

4.1.3 Expression von Referenzgenen

Um die Gen-Expression quantitativ zu analysieren, werden die Gen-Expressions-Daten auf ein Referenzgen (*housekeeping gene*) bezogen. Es ist bekannt, dass die Expression der üblicherweise verwendeten Referenzgene unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erheblich schwankt [75]. Dementsprechend wurde nach einem geeigneten Referenzgen gesucht, d.h. nach einem Gen, das unter den vorliegenden Versuchsbedingungen stabil und unverändert exprimiert wird.

4.1.3.1 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Ein bekanntes und häufig genutztes Referenzgen ist die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; [76]). Die GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und kommt ubiquitär im Organismus vor.

In Abbildung 8 ist die Expression der Gapdh-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment im Frisch- und 72-Stunden-Präparat dargestellt. Nach 72 Stunden in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs von postnatalen Ratten verdoppelt sich der Gapdh-mRNA-Gehalt der Präparate.

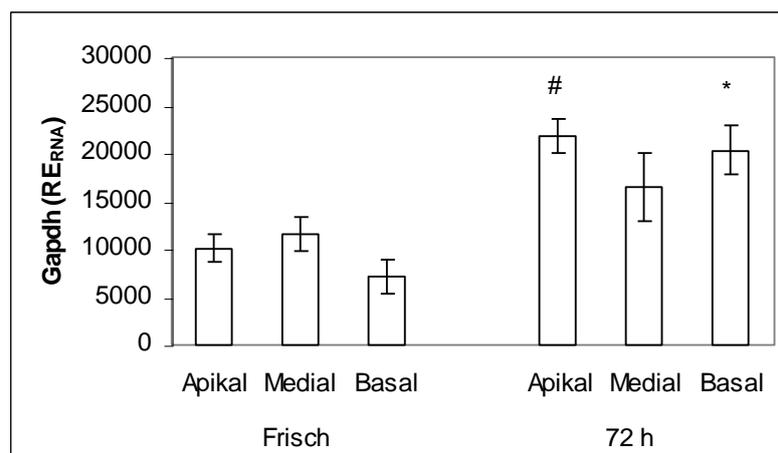


Abbildung 8: Gapdh-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment frisch und nach 72 Stunden in Kultur. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf RNA (RE_{RNA}), n = 4. Signifikant nach Scheffé-Test vs. frisch: *...p < 0,05; nach LSD-Test: #...p < 0,002.

Aufgrund des Anstiegs des Gapdh-mRNA-Gehalts innerhalb der Kultur erwies sich die Gapdh als Referenzgen für das organotypische Model der Cochlea als ungeeignet.

4.1.3.2 TATA box binding protein

Das TATA Box Binde-Protein (TBP) ist eine wesentliche Untereinheit des TFIID (Transkriptionsfaktor der Polymerase II, Fraktion D) und kann als allgemeiner Transkriptions-Initiations-Faktor betrachtet werden [77]. Es bindet an die sog. TATA-Box, eine Thymin- und Adenin-reiche DNA-Sequenz in der Promotorregion eines Genes. In verschiedenen Geweben wurde die Eignung von Tbp als Referenzgen gezeigt, beispielsweise im Ovar [78], in Nierenzellen [79] und im Blut [80]. Tbp wurde hinsichtlich seiner Eignung als Referenzgen in der organotypischen Kultur der Cochlea geprüft, da es in verschiedenen Spezies und Geweben bereits als solches verwendet wurde.

Abbildung 9 zeigt den Tbp-mRNA-Gehalt im apikalen, medialen und basalen Fragment im Frisch- und 72-Stunden-Präparat. In den Frischpräparaten beträgt der Tbp-Gehalt etwa 440 ± 40 RE_{RNA} (n = 18), in den 72-Stunden-Präparaten etwa 510 ± 20 RE_{RNA} (n = 54). Es bildet sich kein Apikal-Basal-Gradient aus. Apikal betrug der Tbp-Gehalt etwa 480 ± 40 RE_{RNA}, medial etwa 500 ± 30 RE_{RNA} und basal etwa 490 ± 30 RE_{RNA} (jeweils n = 24). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Tbp-Gehalt nach 72 Stunden Kultur einerseits und innerhalb der OC-Regionen andererseits.

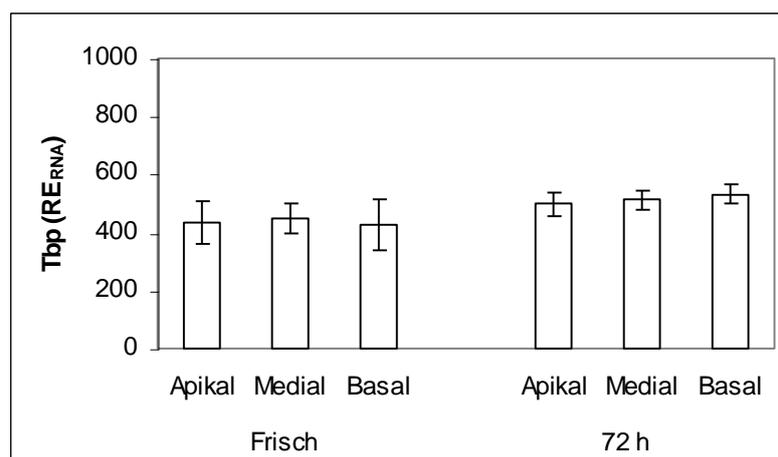


Abbildung 9: Tbp-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment frisch und nach 72 Stunden in Kultur. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf RNA (RE_{RNA}), frisch n = 6; 72 h n = 18.

Die Tbp-Expression wird durch die Kulturbedingungen nicht verändert. Sowohl die direkt nach der Präparation (frisch) gewonnenen Proben verglichen mit den 72-Stunden-Kultur-

Präparaten, als auch der Vergleich zwischen apikalem, medialem und basalem Fragment zeigen ein im biologischen Rahmen stabiles Niveau der Expression der mRNA. Daher wurde Tbp als Referenzgen eingesetzt.

4.1.4 Expression von Transkriptionsfaktoren

Die Transkription von Genen unterliegt der mehr oder weniger strengen Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren. Es ist von großer Bedeutung, jene Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die die Expression von Prestin regulieren. In Vorversuchen wurde die Expression von drei Transkriptionsfaktoren, die eine potentielle Bedeutung für die Prestin-Expression haben könnten verglichen: C-fos, NfκB und Gata-3.

Wie aus Abbildung 10 A hervorgeht, sinkt die Expression der c-fos-mRNA nach 72 Stunden Kultur gegenüber den Frischpräparaten um 70 bis 80 Prozent (Wilcoxon-Test: $p < 0,03$ frisch versus 72 Stunden, $n = 6$), während die Prestin-Expression ansteigt. Man erkennt in Abbildung 10 B, dass die Expression von NfκB -mRNA nach 72 Stunden in Kultur in allen drei Fragmenten etwa um den Faktor 0,5 absinkt (Wilcoxon-Test: $p < 0,03$ frisch versus 72 Stunden, $n = 6$). Die Expression der Gata-3-mRNA ist der von Prestin auffallend ähnlich (Abbildung 10 C). Beide Gene zeigen einen Apikal-Basal-Gradienten und werden nach 72 Stunden Kultur auf einem höheren Niveau exprimiert.

Von den ausgewählten Transkriptionsfaktoren zeigt nur Gata-3 ein dem Prestin ähnliches Expressionsverhalten, sowohl in der Entwicklung als auch im Apikal-Basal-Gradienten. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde die Expression von Gata-3 parallel zu der von Prestin untersucht. Da die Transkriptionsfaktoren Gata-3, Gata-2 und Gata-1 eine funktionelle Gruppe bilden, wurden darüber hinaus Gata-2 und Gata-1 untersucht.

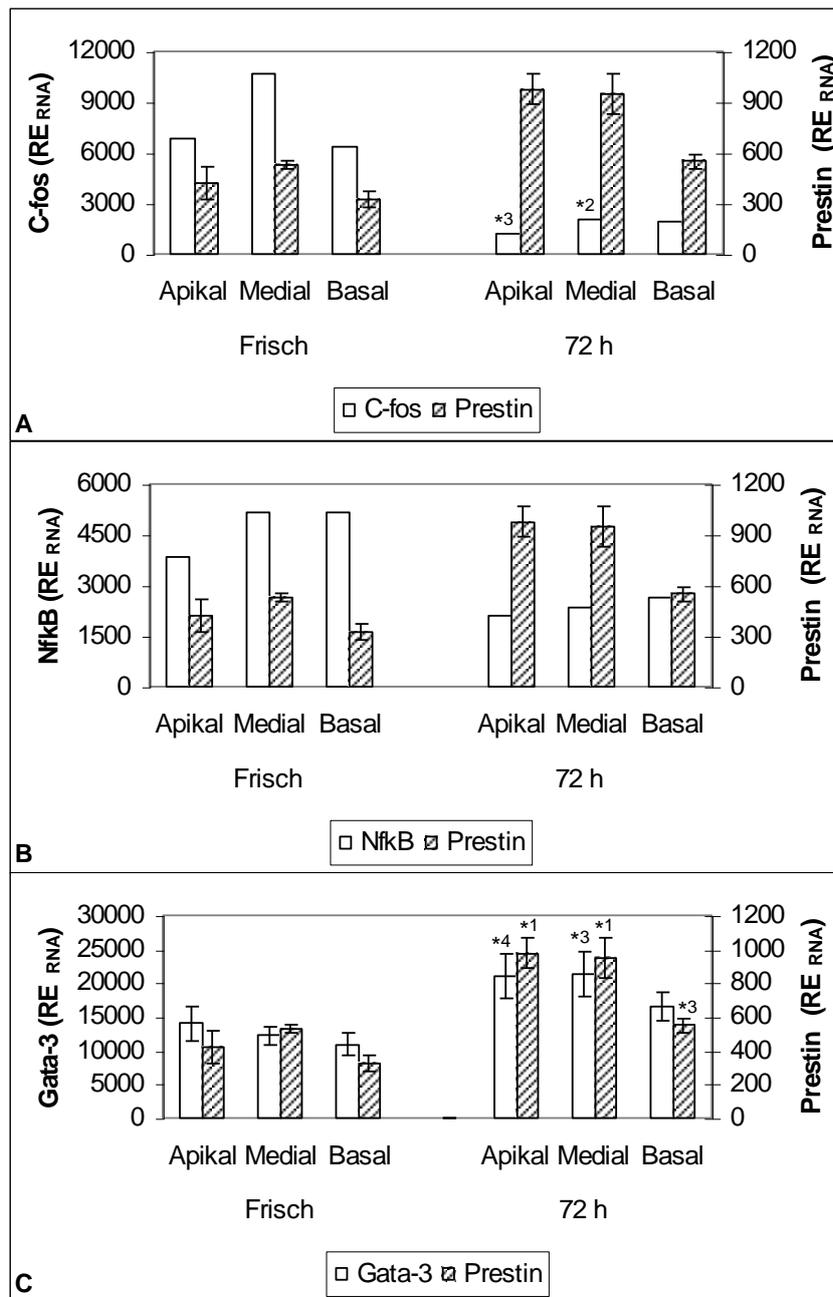


Abbildung 10: mRNA-Gehalt der Transkriptionsfaktoren im apikalen, medialen und basalen Fragment frisch und nach 72 Stunden in Kultur. A: C-fos. B: NfκB. C: Gata-3. Dargestellt ist der MW bezogen auf RNA (RE_{RNA}) aus zwei unabhängigen Versuchen der c-fos- und NfκB-mRNA-Expression bzw. MW ± SEM der Gata-3-mRNA-Expression (n = 6-7). Zur besseren Übersicht sind MW ± SEM der Prestin-mRNA-Expression bezogen auf RNA (RE_{RNA}) (n = 6-7) auf der Sekundär-Y-Achse dargestellt. *...Signifikant nach LSD-Test vs. frisch: *¹...p < 0,001; *²...p < 0,01; *³...p < 0,05; *⁴p = 0,05 (n.s.).

4.2 Verhalten der Expression von Prestin und Gata-Transkriptionsfaktoren in der organotypischen Kultur (*in vitro*) und *in vivo*

Für die Untersuchung der mRNA-Expression von Prestin und den Gata-

Transkriptionsfaktoren (Gata-1, -2, -3) *in vitro* wurde die organotypische Kultur des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Wistar-Ratten genutzt. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte im frisch präparierten Gewebe und in der organotypischen Kultur nach 48 Stunden und nach 72 Stunden Kultivierung. Um die Entwicklung der Gen-Expression *in vivo* zu untersuchen, wurde das Cortische Organ von zwei, fünf und acht Tage alten Tieren frisch präpariert und untersucht.

Die quantitative Bestimmung erfolgte über zwei Verfahren: (1) der mRNA Gehalt des Zielgens wurde auf 1 ng Gesamt-RNA bezogen, ausgedrückt in relativen Einheiten (RE_{RNA}); (2) die mRNA Expression des Zielgens wurde auf die Expression eines Referenzgens bezogen, ausgedrückt als Ratio in RE_{Tbp} (berechnet nach Pfaffl [73]).

4.2.1 mRNA-Entwicklung von Prestin und Gata-3, -2, -1 *in vitro*

Während der *In-vitro*-Entwicklung steigt die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 an. Die Entwicklung beider Gene verläuft parallel.

4.2.1.1 mRNA-Entwicklung *in vitro* bezogen auf die Gesamt-RNA

Wie in Abbildung 10 C (Seite 40) gezeigt, beträgt der Prestin-mRNA-Gehalt in den Frischpräparaten im apikalen Fragment etwa 420 RE_{RNA} , im medialen etwa 530 RE_{RNA} und im basalen etwa 330 RE_{RNA} . Nach 72 Stunden in Kultur steigt der mRNA-Gehalt apikal um den Faktor 2,3 auf etwa 980 RE_{RNA} , medial um den Faktor 1,8 auf etwa 950 RE_{RNA} und basal um den Faktor 1,7 auf etwa 550 RE_{RNA} signifikant an. Durch den stärkeren Anstieg der Prestin-mRNA-Expression im apikalen Fragment verglichen mit den medialen und basalen, steigt der Apikal-Basal-Gradient nach 72 Stunden von 1,5 auf 1,8.

Die Expression von Gata-3 verhält sich ähnlich der von Prestin. In den apikalen Fragmenten steigt die mRNA-Expression von 14000 RE_{RNA} um den Faktor 1,5 auf 21000 RE_{RNA} , in den medialen Fragmenten von 12000 RE_{RNA} um den Faktor 1,7 auf 21000 RE_{RNA} und in den basalen Fragmenten von 11000 RE_{RNA} um den Faktor 1,5 auf 17000 RE_{RNA} signifikant an. Die Gata -3-mRNA-Expression verändert sich gleichmäßig im gesamten Cortischen Organ. Der Apikal-Basal-Gradient beträgt 1,2 in den Frisch-Präparaten und 1,3 nach 72 Stunden in Kultur.

4.2.1.2 mRNA-Entwicklung *in vitro* bezogen auf das Referenzgen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der *In-Vitro*-Entwicklung von Prestin und den Transkriptionsfaktoren Gata-1, -2 und -3 bezogen auf das Referenzgen Tbp dargestellt.

Prestin- und Gata-3-Entwicklung: Abbildung 11 zeigt den Prestin- und Gata-3-mRNA-

Gehalt bezogen auf Tbp im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs frisch, nach 48 Stunden und 72 Stunden in Kultur. Die Expression von Prestin-mRNA steigt im apikalen Fragment nach 48 Stunden auf das 1,7fache und nach 72 Stunden auf das 2,7fache an. Im medialen Fragment steigt die Expression *in vitro* nach 48 Stunden auf das 1,5fache und nach 72 Stunden auf das 2,2fache. Das Expressionsniveau ist im basalen Fragment nach 48 Stunden stabil und steigt erst nach 72 Stunden auf das 1,7fache an. Die Dauer der Kultur führt im Cortischen Organ apikal, verglichen mit medial und basal, zu einem stärkeren Anstieg der Prestin-Expression. Der bereits bei den drei bis fünf Tage alten Tieren (frisch) ausgebildete Apikal-Basal-Gradient erhöht sich *in vitro* nach 48 Stunden von 1,4 auf 2,3 bzw. auf 2,2 nach 72 Stunden.

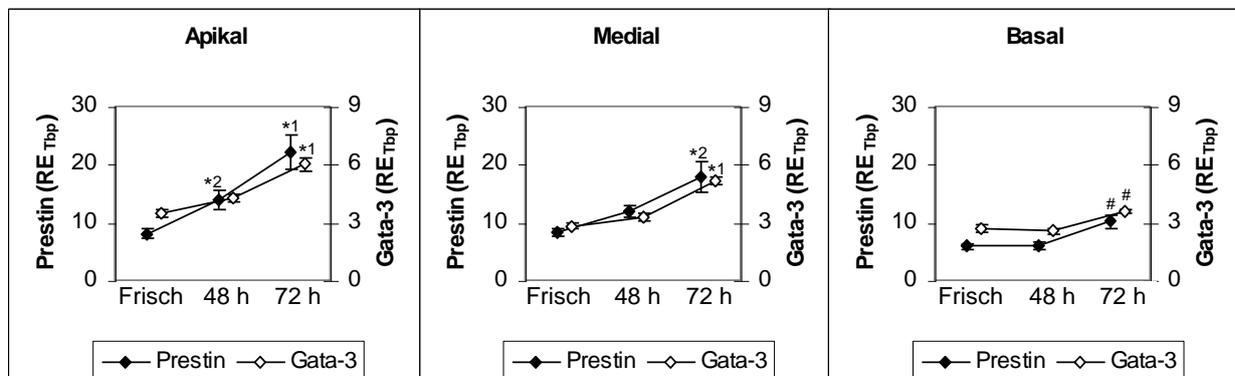


Abbildung 11: In-vitro-Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs. Dargestellt sind MW \pm SEM der Genexpression bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) frisch ($n = 31$), nach 48 Stunden ($n = 25$) und nach 72 Stunden ($n = 6$) in der organotypischen Kultur. Primär-Y-Achse: Prestin. Sekundär-Y-Achse: Gata-3. Signifikant nach Scheffé-Test: *¹... $p < 0,001$; *²... $p < 0,02$; nach LSD-Test: #... $p < 0,05$. SEM teilweise innerhalb des Symbols.

Die Gata-3-mRNA-Expression *in vitro* ähnelt der von Prestin, nach 72 Stunden steigt die Expression apikal und medial auf das 1,8fache, basal auf das 1,3fache. Die Expression von Gata-3 steigt, ähnlich der von Prestin, im apikalen und medialen Fragment stärker als im basalen. Der Apikal-Basal-Gradient steigt *in vitro* von 1,3 auf 1,7 (Scheffè: $p < 0,001$).

Um die Kinetik der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression in den ersten 24 Stunden nach Beginn der Kultur zu erfassen, wurden ältere Daten der Arbeitsgruppe herangezogen. Diese Daten stammen aus früheren Microarray-Untersuchungen und beziehen sich auf das gesamte Cortische Organ, da hier nicht nach der Region unterschieden wurde. Der komplette Datensatz wurde entsprechend des MIAME Standards publiziert [82]. Die Dauer der Kultur betrug 24 Stunden. Die Art der Präparation, Kulturmedium und -bedingungen, sowie die RNA-Präparation folgten

den in der vorliegenden Arbeit angewendeten Protokollen. Abbildung 12 zeigt links die Prestin- und rechts die Gata-3-mRNA-Expression des gesamten Cortischen Organs der neonatalen Ratte frisch präpariert und nach 24 Stunden in Kultur. Ebenfalls dargestellt ist die mRNA-Expression nach 48 und 72 Stunden jeweils im apikalen, medialen und basalen Fragment. Die gestrichelte Linie zeigt, zur besseren Übersicht die aus den Einzelfragmenten gemittelte mRNA -Expression des gesamten Cortischen Organs.

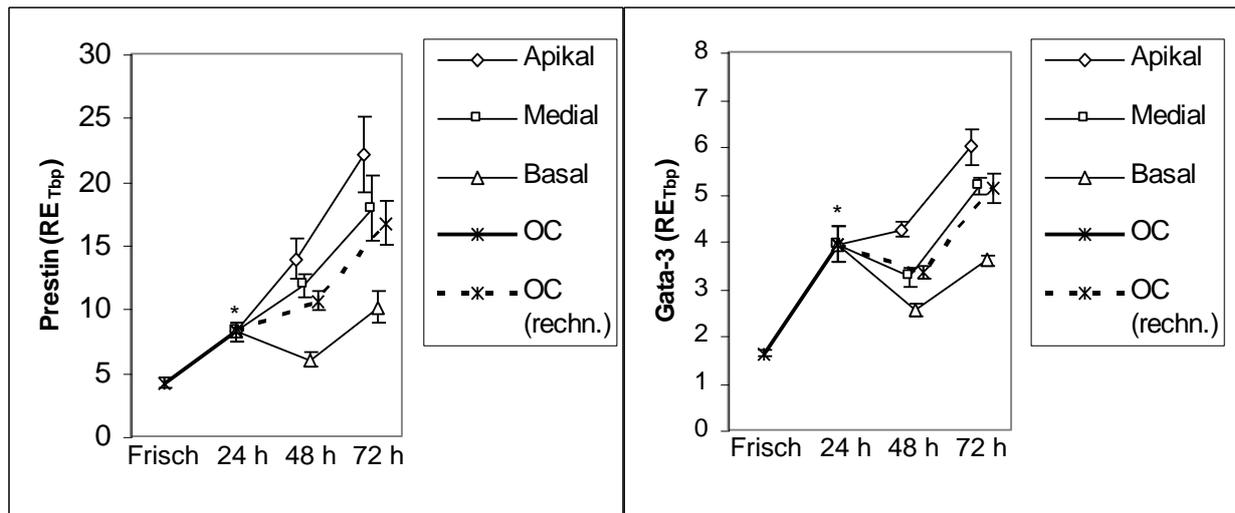


Abbildung 12: Einfluss der Dauer der Kultur auf die Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression im Cortischen Organ. Links: Prestin. Rechts: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}), frisch (n = 6), nach 24 Stunden (n = 6), nach 48 Stunden (n = 25) und nach 72 (n = 6) Stunden in Kultur. Signifikant nach Scheffé-Test: *...p < 0,001 vs. frisch. Zur besseren Übersicht ist als gestrichelte Linie die aus den Einzelfragmenten gemittelte Expression nach 48 und 72 Stunden dargestellt.

Unter den Kulturbedingungen verdoppelt sich die Expression von Prestin-mRNA innerhalb von 24 Stunden. Es zeigt sich weiterhin, dass die *In-Vitro*-Expression der Prestin-mRNA im apikalen und medialen Fragment verglichen mit dem basalen Fragment stärker zunimmt. Da das Expressionsniveau im basalen Fragment innerhalb von 48 Stunden stabil bleibt und erst nach weiteren 24 Stunden ansteigt, ist die 24-Stunden-Kultur für die Untersuchung der Prestin-Expression in Abhängigkeit von der Region weniger gut geeignet. Für die Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren auf die Prestin-mRNA-Expression ist sowohl die 48-Stunden- als auch die 72-Stunden-Kultur besser geeignet, da beide einen ausreichend hohen Entwicklungsgradienten aufweisen. Der Prestin-mRNA-Gehalt steigt im Cortischen Organ verglichen mit der Frisch-Kontrolle nach 24 Stunden *in vitro* auf das Doppelte, nach 48 Stunden etwa auf das 2,6fache und nach 72 Stunden etwa auf das 4fache.

Der Gata-3-mRNA-Gehalt des gesamten Cortischen Organs steigt nach 24 Stunden *in vitro* auf das 2,4fache. Nach 48 Stunden liegt das apikale Fragment oberhalb des Expressionsniveaus des gesamten OC nach 24 Stunden in Kultur. Nach 72 Stunden *in vitro* steigt die Gata-3-Expression verglichen mit der Expression nach 48 Stunden in Kultur in allen drei Fragmenten. Die Gata-3-mRNA-Expression des gesamten Cortischen Organs steigt im Mittel nach 48 Stunden auf das 2,1fache und nach 72 Stunden auf das 3,2fache, jeweils verglichen mit der Frisch-Kontrolle.

Gata-1- und Gata-2-Entwicklung: Im Folgenden (Abbildung 13) sind die Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren Gata-1 und Gata-2 dargestellt. Zur besseren Übersicht ist ebenfalls die Expression der Gata-3-mRNA als gestrichelte Linie abgebildet. Während Gata-2 auf dem Niveau der Gata-3-mRNA exprimiert wird, erfolgt die Expression von Gata-1-mRNA auf deutlich geringerem Niveau. Der Gata-1-mRNA-Gehalt beträgt etwa ein Zehntel dessen von Gata-2 und -3. Die Expression der Gata-2-mRNA steigt *in vitro* im apikalen Fragment nach 48 Stunden auf das 1,8fache und nach 72 Stunden auf das 2,4fache. Im medialen Fragment steigt der Gata-2-mRNA-Gehalt nach 48 Stunden auf das 1,5fache und nach 72 Stunden auf das 1,7fache. Im basalen Fragment wird Gata-2 während der *In-Vitro*-Entwicklung auf einem stabilen Niveau exprimiert. Die Gata-2-mRNA-Expression zeigt bereits bei den drei bis fünf Tage alten Tieren (Frischpräparate) einen Apikal-Basal-Gradienten, welcher sich von 1,5 auf 2,5 nach 48 Stunden bzw. auf 2,9 nach 72 Stunden in Kultur erhöht. Der Gata-1-mRNA-Gehalt fällt während der *In-Vitro*-Entwicklung im Cortischen Organ ab. Im apikalen Fragment fällt die Expression nach 48 Stunden auf ein Fünftel und nach 72 Stunden auf ein Zehntel des mRNA-Gehaltes des Frischpräparates. Im medialen Fragment sinkt der Gata-1-mRNA-Gehalt auf das 0,3fache nach 48 Stunden und auf das 0,1fache nach 72 Stunden in Kultur. Basal fällt der Gata-1-mRNA-Gehalt nach 48 Stunden auf ein Zehntel des Frischpräparates bzw. nach 72 Stunden auf ein Fünftel. Gata-1 wird im apikalen, medialen und basalen Cochlea-Fragment auf dem gleichen Niveau exprimiert.

Während der *In-Vitro*-Entwicklung steigt die Gata-2- und sinkt die Gata-1-mRNA-Expression im Cortischen Organ. Die Gata-2-mRNA-Expression gleicht der von Gata-3 und somit weitgehend der von Prestin.

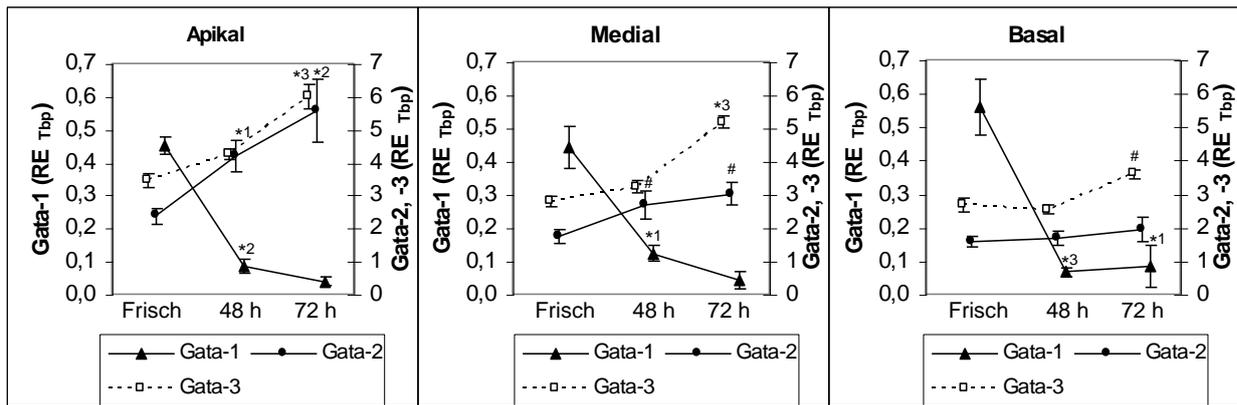


Abbildung 13: *In-vitro*-Entwicklung der Gata-1 und Gata-2-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs. Dargestellt sind MW \pm SEM der Genexpression bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) frisch ($n = 16$), nach 48 Stunden ($n = 12$) und nach 72 Stunden ($n = 4$) in der organotypischen Kultur. Aus Gründen der Übersicht erfolgt zusätzlich die Darstellung der Gata-3-mRNA als gestrichelte Linie. Primär-Y-Achse: Gata-1. Sekundär-Y-Achse: Gata-2 und -3. Signifikanz nach Scheffé-Test vs. frisch: *1... $p < 0,05$; *2... $p < 0,005$; *3... $p = 0,001$; nach LSD-Test vs. frisch: #... $p < 0,05$. SEM teilweise innerhalb des Symbols.

Apikal-Basal-Gradient: Zur besseren Vergleichbarkeit des Apikal-Basal-Gradienten von Prestin, Gata-2 und Gata-3 während der *In-Vitro*-Entwicklung wurde der mRNA-Gehalt des jeweiligen Fragments auf den Mittelwert des mRNA-Gehaltes aus apikalem, medialem und basalem Fragment bezogen. Die graphische Auswertung zeigt Abbildung 14.

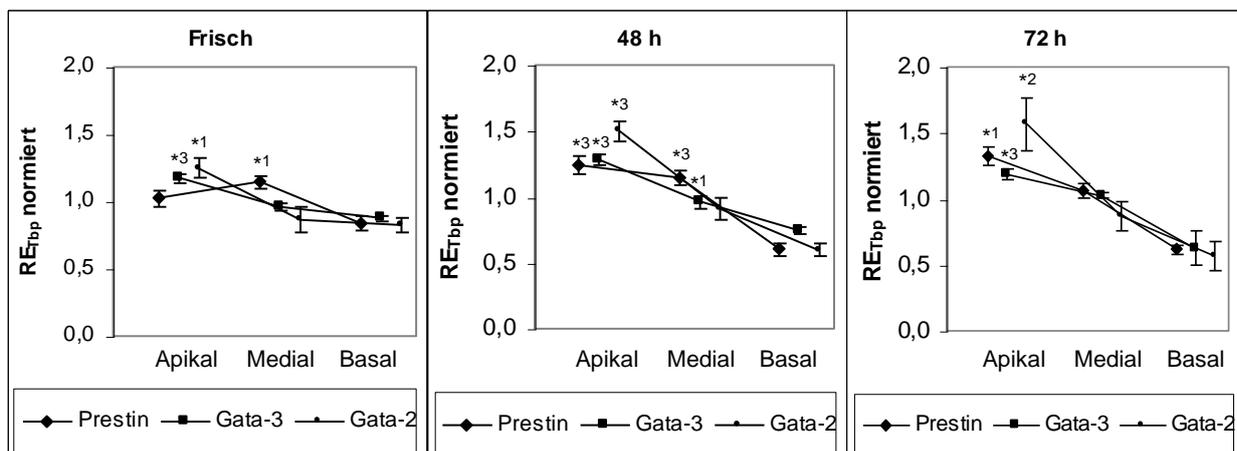


Abbildung 14: Apikal-Basal-Gradient der Prestin-, Gata-3- und Gata-2-mRNA-Expression *in vitro* im Cortischen Organ. Daten (in RE_{Tbp}) jeweils normalisiert auf den Mittelwert aus apikalem, medialem und basalem Fragment (RE_{Tbp} normiert) in der Frisch- (Prestin, Gata-3 $n = 31$; Gata-2 $n = 16$), 48-Stunden- (Prestin, Gata-3 $n = 25$; Gata-2 $n = 12$) und 72-Stunden-Kultur (Prestin, Gata-3 $n = 6$; Gata-2 $n = 4$). Dargestellt sind MW \pm SEM. *...Signifikant nach Scheffé-Test vs. basal: *1... $p < 0,05$; *2... $p < 0,005$; *3... $p < 0,001$. SEM teilweise innerhalb des Symbols.

Der Prestin-mRNA-Gehalt deutet in den Frischpräparaten einen Apikal-Basal-Gradienten an, der sich nach 48 Stunden Kultur deutlich bildet und sich nach weiteren 24 Stunden Kultur weiter verstärkt. Die mRNA-Expression von Gata-3 und Gata-2 zeigt einen ähnlichen Apikal-Basal-Gradienten wie Prestin. Die Expression von Gata-1 zeigt keinen Apikal-Basal-Gradienten (Daten nicht dargestellt).

4.2.2 mRNA-Entwicklung von Prestin und Gata-3, -2, -1 *in vivo*

Um zu prüfen, ob die *in vitro* gefundenen Expressions-Muster von Prestin, Gata-1, -2 und -3 die *In-Vivo*-Entwicklung widerspiegeln, wurde die Gen-Expression im frisch präparierten Cortischen Organ von zwei (P2), fünf (P5) und acht (P8) Tage alten neugeborenen Ratten untersucht. Die Auswertung der real-time PCR-Daten erfolgt zum einen durch Bezug auf die Gesamt-RNA, zum anderen durch Bezug auf das Referenzgen.

4.2.2.1 Verhalten des Referenzgens während der *In-Vivo*-Entwicklung

Zunächst wurde die Eignung von Tbp als Referenzgen für die *In-Vivo*-Untersuchungen geprüft. Abbildung 15 zeigt den Tbp-mRNA-Gehalt im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei, fünf und acht Tage alten Ratten. Der Tbp-Gehalt beträgt im Mittel 400 RE_{RNA}. Es bildet sich weder ein Apikal-Basal-Gradient, noch ein Entwicklungsgradient aus. Auch *in vivo* wird Tbp, im Rahmen der biologischen Varianz, auf einem stabilen Niveau exprimiert und ist daher als Referenzgen geeignet.

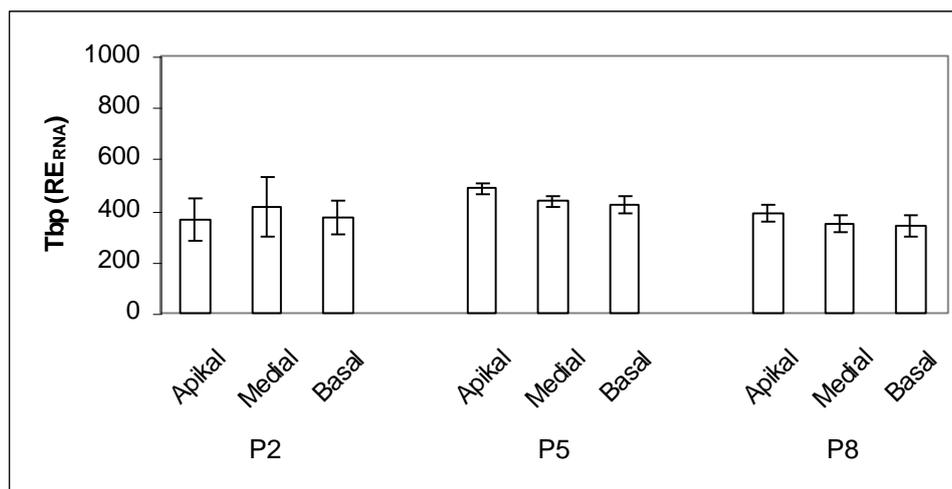


Abbildung 15: *In-Vivo*-Entwicklung der Tbp-mRNA-Expression *in vivo* am zweiten, fünften und achten postnatalen Tag im apikalen, medialen und basalen Fragment. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf RNA (RE_{RNA}). P2...zweiter postnataler Tag (n = 6), P5...fünfter postnataler Tag (n = 6-7), P8...achter postnataler Tag (n = 5-6).

4.2.2.2 mRNA-Entwicklung *in vivo* bezogen auf die Gesamt-RNA

In Abbildung 16 ist die Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression bezogen auf die Gesamt-RNA, ausgedrückt in relativen Einheiten (RE_{RNA}), dargestellt. Während der *In-Vivo*-Entwicklung vom zweiten bis zum achten postnatalen Tag steigt die Expression der Prestin-mRNA an. In den P2-Präparaten ist der Prestin-mRNA-Gehalt in den drei OC-Regionen annähernd konstant mit $145 RE_{RNA}$. In der apikalen OC-Region steigt der Prestin-mRNA-Gehalt am fünften postnatalen Tag auf $500 RE_{RNA}$ und am achten postnatalen Tag auf $850 RE_{RNA}$. In der medialen OC-Region beträgt der Prestin-mRNA-Gehalt in den P5-Präparaten $400 RE_{RNA}$ und in P8-Präparaten $700 RE_{RNA}$. Basal steigt der Prestin-mRNA-Gehalt auf $250 RE_{RNA}$ am fünften und $300 RE_{RNA}$ am achten postnatalen Tag. Demnach nimmt die Prestin-Expression vom zweiten zum fünften postnatalen Tag apikal um den Faktor 4,1 zu, medial um den Faktor 2,6 und basal um den Faktor 1,5. Vom zweiten bis zum achten postnatalen Lebenstag steigt die Expression von Prestin apikal auf das 6,7fache, medial auf das 4,4fache und basal auf das 1,9fache. Verglichen mit dem Expressionsanstieg vom zweiten zum fünften postnatalen Tag, steigt die Prestin-mRNA-Expression vom fünften zum achten Lebenstag langsamer an. Apikal und medial um das 1,7fache (LSD: $p < 0,01$ und $p < 0,05$), basal beträgt der Faktor 1,2.

Der *in vitro* beobachtete Apikal-Basal-Gradient der Prestin-Expression besteht nicht von Geburt an, sondern entwickelt sich erst postnatal (Daten nicht dargestellt). Am zweiten postnatalen Tag ist kein Gradient zu erkennen, am fünften postnatalen Tag ist der Gradient mit dem Faktor 2,1 (LSD: $p < 0,05$) von apikal nach basal bereits ausgebildet und verstärkt sich bis zum achten postnatalen Tag auf den Faktor 2,8 (LSD: $p < 0,001$).

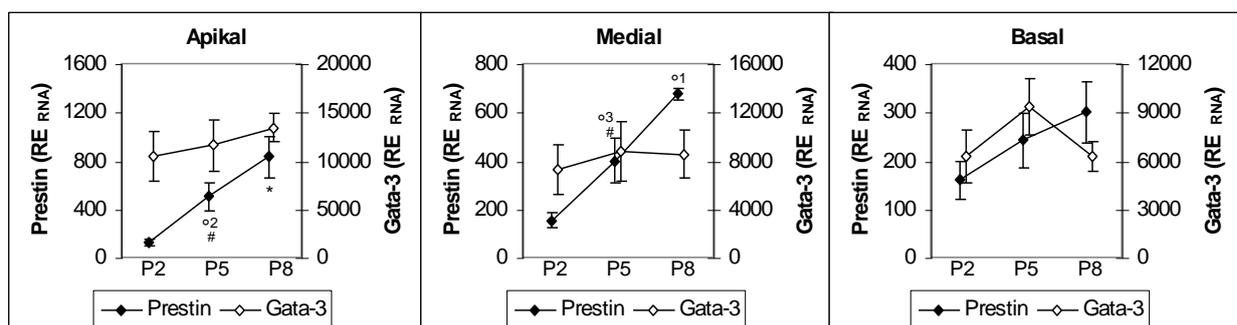


Abbildung 16: *In-vivo*-Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf RNA (RE_{RNA}) der Genexpression von zwei (P2, $n = 6$), fünf (P5, $n = 7$) und acht Tage (P8, $n = 6$) alten neonatalen Ratten. Signifikant vs. P2 nach Scheffé-Test: *... $p < 0,001$; nach LSD-Test: °1... $p < 0,001$; *2... $p < 0,01$; *3... $p < 0,05$; signifikant vs. P8 nach LSD-Test: #... $p < 0,05$ (Gata-3 n.s.). SEM teilweise innerhalb des Symbols.

Anders als *in vitro* beobachtet, verhält sich die Gata-3-mRNA-Expression *in vivo* nicht wie die des Prestins. Gata-3 wird *in vivo* vom zweiten bis zum achten postnatalen Tag auf einem annähernd stabilen Niveau exprimiert. In den apikalen Fragmenten beträgt der Gata-3-mRNA-Gehalt am zweiten postnatalen Tag 10500 RE_{RNA}, am fünften 11500 RE_{RNA} und am achten 13500 RE_{RNA}; medial am zweiten postnatalen Tag 7000 RE_{RNA}, am fünften und am achten postnatalen Tag 8500 RE_{RNA}; basal am fünften postnatalen Tag 9500 RE_{RNA}, am zweiten und achten postnatalen Tag 6500 RE_{RNA}. Ebenso wie *in vitro* bildet sich *in vivo* ein Apikal-Basal-Gradient der Gata-3-Expression. Er beträgt 1,7 am zweiten postnatalen Tag, am fünften 1,3 und 2,1 (LSD: $p < 0,05$) am achten postnatalen Tag. Gata-3 wird *in vivo* zwischen dem zweiten und achten postnatalen Tag auf einem stabilen Niveau exprimiert.

4.2.2.3 mRNA-Entwicklung *in vivo* bezogen auf das Referenzgen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der *In-Vivo*-Entwicklung von Prestin und den Transkriptionsfaktoren Gata-1, -2 und -3 bezogen auf das Referenzgen Tbp dargestellt.

Prestin- und Gata-3-Entwicklung: Abbildung 17 zeigt die graphische Darstellung der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression in relativen Einheiten (RE_{Tbp}). Die Auswertung der Expression von Prestin-mRNA bezogen auf das Referenzgen zeigt das gleiche Ergebnis wie die Auswertung bezogen auf die Gesamt-RNA. Am zweiten postnatalen Tag beträgt der Prestin-mRNA-Gehalt unabhängig von der OC-Region 4 RE_{Tbp}. Am fünften postnatalen Tag steigt die Prestin-Expression apikal und medial auf etwa 11 RE_{Tbp} und basal auf 6 RE_{Tbp}. Am achten postnatalen Tag erhöht sich der Prestin-mRNA-Gehalt im apikalen Fragment auf 18 RE_{Tbp}, im medialen Fragment auf 17 RE_{Tbp} und im basalen Fragment auf 10 RE_{Tbp}.

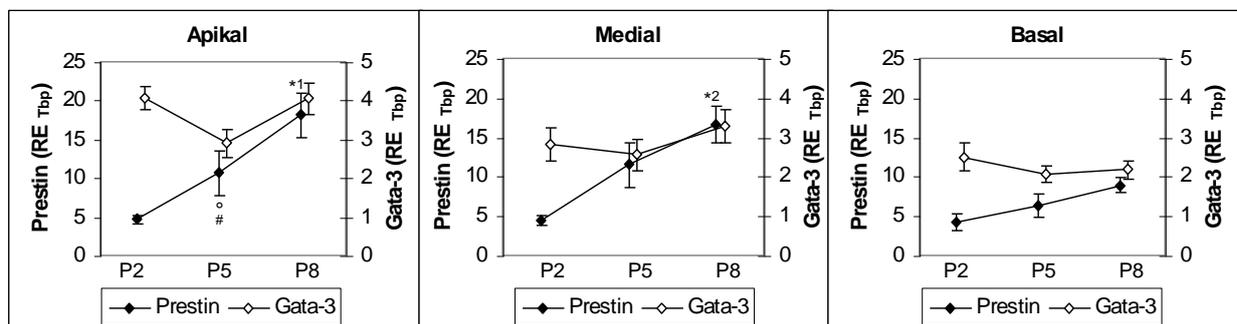


Abbildung 17: In-vivo-Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) der Genexpression von zwei (P2, n = 10), fünf (P5, n = 11) und acht Tage (P8, n = 10) alten neonatalen Ratten. Signifikant vs. P2 nach Scheffé-Test: *¹... $p < 0,001$; *¹... $p < 0,03$; nach LSD-Test: °... $p < 0,03$; signifikant vs. P8 nach LSD-Test: #... $p < 0,01$ (Gata-3 n.s.). SEM teilweise innerhalb des Symbols.

Die Prestin-mRNA-Expression steigt vom zweiten zum fünften postnatalen Tag stärker an, als vom fünften zum achten Lebenstag (Tabelle 7). Der Anstieg der Prestin-Expression vom zweiten zum achten postnatalen Tag ist apikal mit dem Faktor 3,9 (Scheffé: $p < 0,01$) am größten, medial steigt die Expression auf das 3,8fache (Scheffé: $p < 0,05$) und basal auf das 2,1fache an. Der Apikal-Basal-Gradient entwickelt sich erst postnatal: er wächst von 1,1 am zweiten postnatalen Tag auf 1,8 am fünften und schließlich 2,0 (LSD: $p < 0,005$) am achten postnatalen Tag.

Die Expression der Gata-3-mRNA entwickelt sich *in vivo* nicht parallel zum Anstieg der Prestin-mRNA-Expression (Abbildung 17). Vom postnatalen Tag zwei (P2) zum Tag fünf (P5) bleibt die Gata-3-mRNA-Expression gleich oder fällt ab, während der Prestin-mRNA-Gehalt deutlich ansteigt (Tabelle 7). Von P5 nach P8 steigen sowohl der Gata-3- als auch der Prestin-mRNA-Gehalt um etwa denselben Faktor an.

Der Apikal-Basal-Gradient der Gata-3-Expression beträgt am zweiten postnatalen Tag 1,6 (LSD: $p < 0,01$), am fünften 1,4 und am achten 1,9 (LSD: $p < 0,001$).

Tabelle 7: Veränderung der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression *in vivo* im apikalen, medialen und basalen Fragment.

	P2		P5		P8
	Prestin	Gata-3	Prestin	Gata-3	
Apikal	2,3*	0,7*	1,7*	1,4*	
Medial	2,6*	0,9*	1,4	1,3	
Basal	1,5	0,8	1,4	1,0	

Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) ausgedrückt als Vielfaches. P2...zweiter postnataler Tag ($n = 10$), P5...fünfter postnataler Tag ($n = 11$), P8...achter postnataler Tag ($n = 10$). *...Signifikant nach LSD-Test: $p < 0,05$.

Gata-1- und Gata-2-Entwicklung: Im Folgenden (Abbildung 18) sind die Expressionsmuster der *In-Vivo*-Entwicklung von Gata-1 und Gata-2 dargestellt. Zur besseren Übersicht ist ebenfalls die Expression der Gata-3-mRNA als gestrichelte Linie abgebildet.

Gata-1- und Gata-2 werden während der *In-Vivo*-Entwicklung vom zweiten zum achten postnatalen Tag auf einem konstanten Niveau exprimiert. Der Gata-2-mRNA-Gehalt im apikalen Fragment beträgt am zweiten postnatalen Tag 3 RE_{Tbp} , am fünften 2,5 RE_{Tbp} und am achten postnatalen Tag 3 RE_{Tbp} . Im medialen Fragment beträgt der Gata-2-Gehalt am zweiten, fünften und achten postnatalen Tag etwa 2 RE_{Tbp} . Basal beträgt der Gata-2-mRNA-Gehalt am zweiten postnatalen Tag 1,6 RE_{Tbp} und am fünften sowie achten postnatalen Tag 1,4 RE_{Tbp} . Damit liegt keine Veränderung der Genexpression während der Entwicklung *in vivo* vor. Während der Gata-1-mRNA-Gehalt in der Kultur abfällt, bleibt er *in vivo* auf konstantem Niveau.

Während der *In-Vivo*-Entwicklung folgt die Gata-2-mRNA-Expression einem Apikal-Basal-Gradienten, welcher bereits am zweiten postnatalen Tag besteht und konstant bleibt. Bei den zwei und acht Tage alten Tieren beträgt er 1,9 und 1,7 bei den fünf Tage alten Tieren.

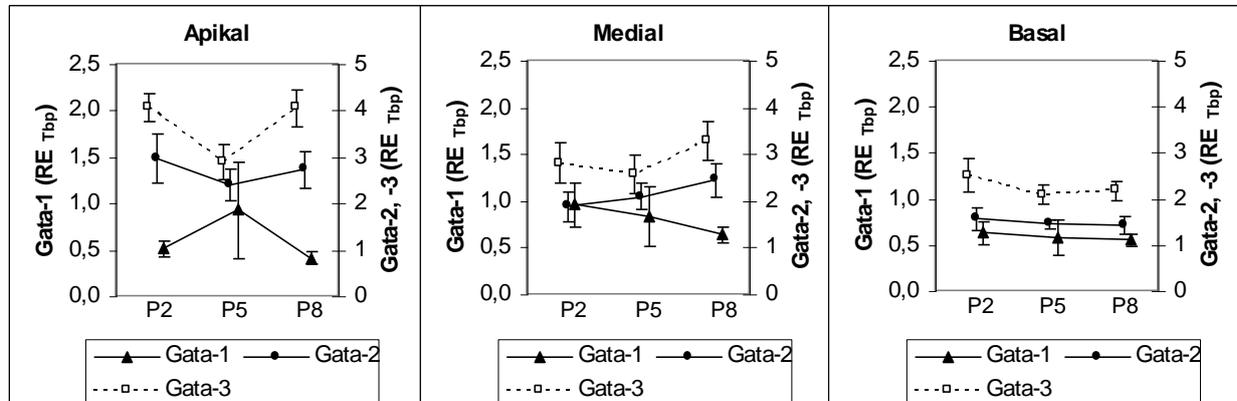


Abbildung 18: *In-vivo*-Entwicklung der Gata-mRNA-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment im zwei, fünf und acht Tage alten Cortischen Organ. Aus Gründen der Übersicht erfolgt zusätzlich die Darstellung der Gata-3-mRNA als gestrichelte Linie. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}). Primär-Y-Achse: Gata-1 (n = 10-11). Sekundär-Y-Achse: Gata-2 (n = 8-9) und Gata-3 (n = 9-11). P2...zweiter postnataler Tag; P5...fünfter postnataler Tag; P8...achter postnataler Tag.

Apikal-Basal-Gradient: Um den Apikal-Basal-Gradienten von Prestin, Gata-2 und Gata-3 während der *In-Vivo*-Entwicklung besser vergleichen zu können, wurde der mRNA-Gehalt des jeweiligen Fragments auf den Mittelwert des mRNA-Gehaltes aus apikalem, medialem und basalem Fragment des Cortischen Organs bezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Am zweiten postnatalen Tag ist der Apikal-Basal-Gradient der Prestin-Expression noch nicht ausgebildet. Dieser entwickelt sich im Laufe der postnatalen Entwicklung und erreicht am P8 einen Faktor von 2. Im Gegensatz dazu, ist ein signifikanter Apikal-Basal-Gradient der Gata-3- und Gata-2-Expression während der gesamten postnatalen Entwicklung nachzuweisen. Die *In-Vivo*-Entwicklung der Gata-1-mRNA-Expression zeigt keinen Apikal-Basal-Gradienten.

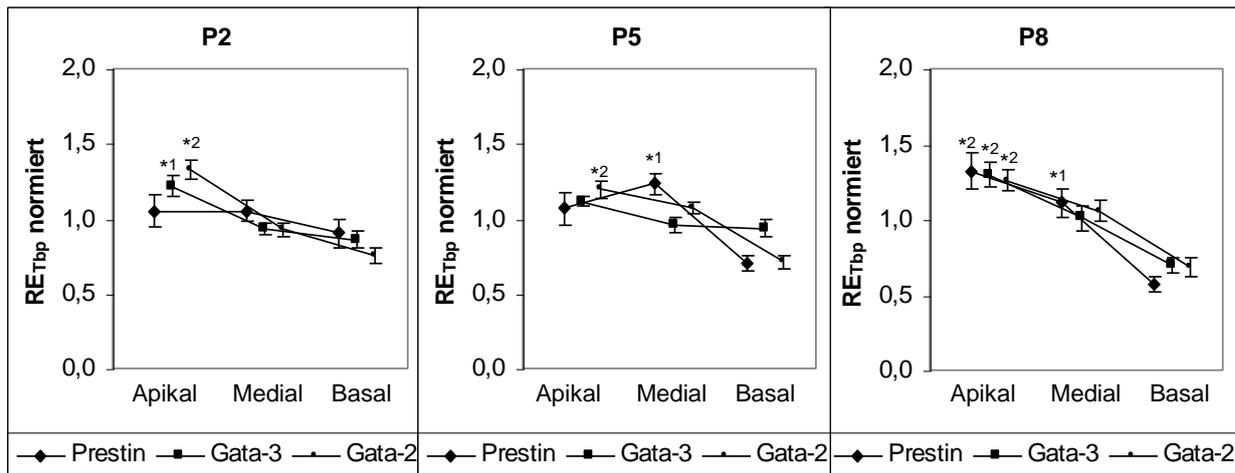


Abbildung 19: Apikal-Basal-Gradient der Prestin-, Gata-3- und Gata-2-mRNA-Expression *in vivo* im zwei, fünf und acht Tage alten Cortischen Organ. Daten (in RE_{Tbp}) jeweils normalisiert auf den Mittelwert aus apikalem, medialem und basalem Fragment (RE_{Tbp} normiert; n = 10-11). Dargestellt sind MW ± SEM. *...Signifikant nach Scheffé-Test vs. basal: *¹...p < 0,001; *²...p < 0,05. P2...zweiter postnataler Tag; P5...fünfter postnataler Tag; P8...achter postnataler Tag. SEM teilweise innerhalb des Symbols.

4.2.3 Prestin- und GATA-3-Protein

4.2.3.1 *In-Vivo*-Entwicklung des Prestin-Proteins

Um zu analysieren, ob die *in vivo* beobachtete Zunahme der Prestin-mRNA mit einer Zunahme des Prestin-Proteins verbunden ist, wurde das Prestin-Protein in den organotypischen Kulturen immunhistochemisch gefärbt. Die konfokalen Bilder (Abbildung 20) der gefärbten Präparate zeigen klar gekennzeichnet drei Reihen äußerer Haarzellen. Andere Regionen des Cortischen Organs zeigen nur wenig bzw. keine Färbung (Hintergrund-Färbung). Das Prestin befindet sich ausschließlich in der lateralen Plasmamembran der äußeren Haarzellen, wie bereits beschrieben [20].

Anschließend wurde die fluoreszierende Intensität der Zellwände der äußeren Haarzellen gemessen. Die Bestimmung der Dichte der Banden (Differential Integrated Density, DID) in den verschiedenen Segmenten zeigt einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität vom zweiten zum achten postnatalen Tag und einen Abfall der Intensität vom apikalen zum basalen Segment (Abbildung 21A). Sowohl das Entwicklungsmuster als auch das regionale Muster der Expression des Prestin-Proteins entsprechen weitgehend den Mustern der Prestin-mRNA-Expression (Abbildung 21B).

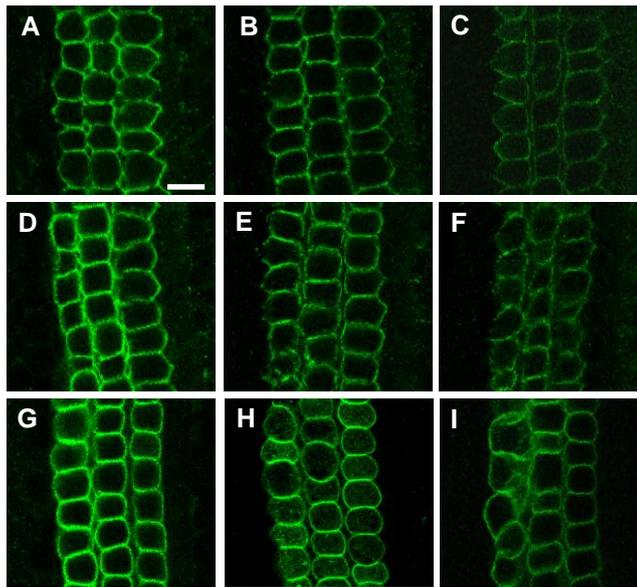


Abbildung 20: Prestin-Protein-Färbung im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei, fünf und acht Tage alten Ratten. A: apikales, B: mediales, C: basales Fragment am zweiten postnatalen Tag. D: apikales, E: mediales, F: basales Fragment am fünften postnatalen Tag. G: apikales, H: mediales, I: basales Fragment am achten postnatalen Tag. Der Maßstab entspricht 10 µm.

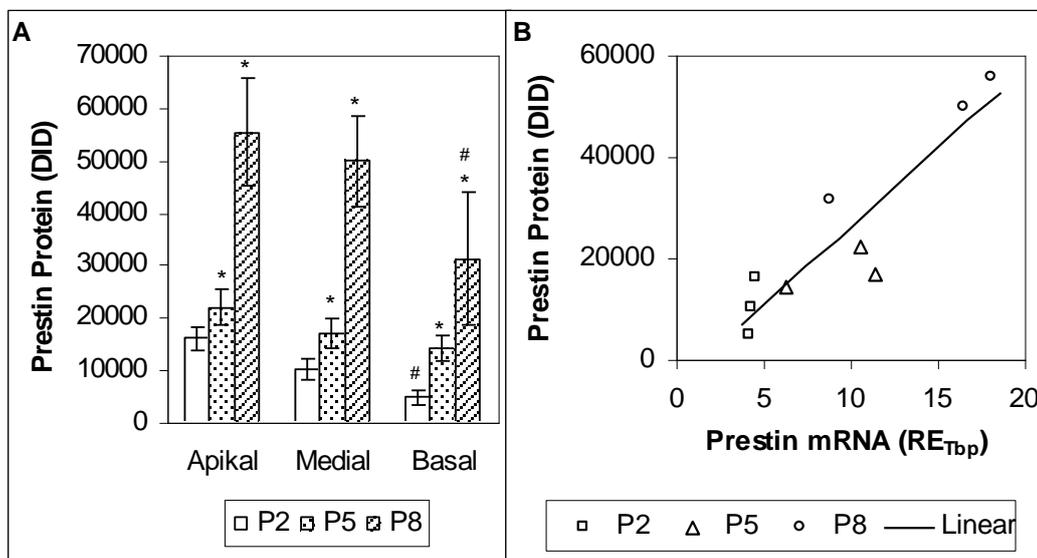


Abbildung 21: In-Vivo-Entwicklung von Prestin-Protein im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei, fünf und acht Tage alten Ratten. A: Prestin-Protein-Gehalt. Dargestellt sind MW \pm SEM ausgedrückt als Differential Integrated Density (DID). Signifikanz nach Scheffè-Test: *... $p < 0,02$ vs. P2; #... $p < 0,05$ vs. apikal. B: Korrelation zwischen dem mRNA- und Protein-Gehalt von Prestin (Protein...y; mRNA...x). Dargestellt sind die MW der Prestin-mRNA (RE_{Tbp}) und des Prestin-Proteins (DID). Die Gerade repräsentiert die Gleichung der linearen Regression: $y = 3095x - 4940$; $R = 0,917$; $n = 9$; $p < 0,001$. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten. P2...zweiter postnataler Tag; P5...fünfter postnataler Tag; P8...achter postnataler Tag.

4.2.3.2 *In-Vivo*-Entwicklung des GATA-3-Proteins

Da in der Literatur unterschiedliche Aussagen über die GATA-3-Protein-Expression in Haarzellen während der postnatalen Entwicklung vorliegen, wurde von uns die Anwesenheit und mögliche Veränderungen der GATA-3-Protein-Expression im Cortischen Organ von zwei und acht Tage alten Ratten geprüft (Abbildung 22).

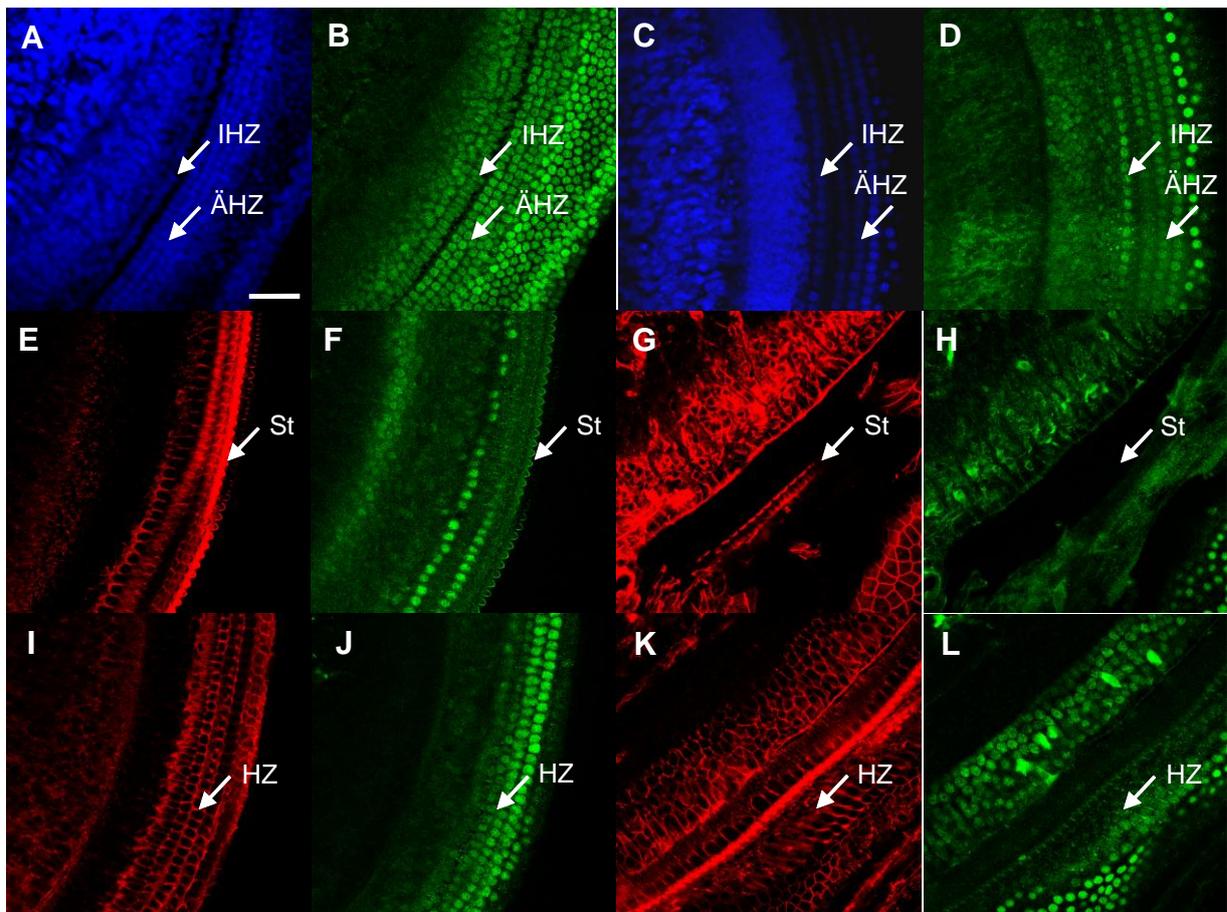


Abbildung 22: GATA-3-Färbung der Zellkerne im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei und acht Tage alten Ratten. A: Hoechst-Färbung der Haarzellkerne im apikalen Fragment am zweiten postnatalen Tag. B: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. C: Hoechst-Färbung der Haarzellkerne im apikalen Fragment am achten postnatalen Tag. D: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. E: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment des Cortischen Organs am zweiten postnatalen Tag fokussiert auf Höhe der Stereozilien. F: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. G: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment am achten postnatalen Tag fokussiert auf Höhe der Stereozilien. H: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. I: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment am zweiten postnatalen Tag fokussiert auf die Zellkerne der Haarzellen. J: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. K: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment am achten postnatalen Tag fokussiert auf die Zellkerne der Haarzellen. L: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. Maßstab: 10 μ m. HZ...Haarzellen; IHZ...innere Haarzellen; ÄHZ...äußere Haarzellen; St...Stereozilien.

In den apikalen Fragmenten können die drei Reihen äußerer Haarzellen und die eine Reihe innerer Haarzellen durch Verwendung der Hoechst-Färbung leicht identifiziert werden (Abbildung 22A,C). Eine Expression von GATA-3-Protein ist in den Haarzellen, aber auch in den Nachbarzellen sichtbar (Abbildung 22B,D). Die GATA-3-Expression ist am achten postnatalen Tag (Abbildung 22D) geringer als am zweiten postnatalen Tag (Abbildung 22B). In den basalen Fragmenten kann die Region der Zellkerne der Haarzellen durch Verwendung der Phalloidin-Färbung identifiziert werden (Abbildung 22I,K). Aufgrund der räumlichen Struktur der basalen Fragmente überlappen die Hoechst-gefärbten Zellkerne. Auf Höhe der Stereozilien und unterhalb ist keine GATA-3-Färbung sichtbar (Abbildung 22E-H). Demgegenüber erscheint auf Höhe der Zellkerne am zweiten postnatalen Tag eine starke GATA-3-Färbung (Abbildung 22I,J). Am achten postnatalen Tag ist eine schwache Färbung in den Zellkernen der Haarzellen und eine stärkere Färbung in den Stützzellen sichtbar (Abbildung 22K,L). In den Negativ-Kontrollen färben sich die Kerne nicht an (Abbildung 23N, Seite 55).

4.2.3.3 *In-Vitro*-Entwicklung des GATA-3-Proteins

Da sich die Gata-3-mRNA-Expression *in vitro* anders verhält als *in vivo*, wurde die GATA-3-Protein-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten im frisch präparierten Gewebe sowie nach 48 Stunden Kultur untersucht (Abbildung 23).

Die drei Reihen äußerer Haarzellen und die eine Reihe innerer Haarzellen lassen sich im apikalen Fragment durch Verwendung der Hoechst-Färbung leicht identifizieren (Abbildung 23A,C). Es findet sich eine intensive GATA-3-Färbung der Haarzellen, aber auch der Nachbarzellen in den frisch präparierten Geweben und auch nach 48 Stunden Kultur (Abbildung 23A,B). In den 48 Stunden kultivierten Präparaten erscheint die Fluoreszenzintensität sogar stärker verglichen mit den frisch präparierten Präparaten (Abbildung 23C,D). In den basalen Fragmenten wird die Region der Zellkerne der Haarzellen durch Verwendung der Phalloidin-Färbung identifiziert (Abbildung 23I,K), da sich die Hoechst-gefärbten Zellkerne aufgrund der räumlichen Struktur der basalen Fragmente überlappen. Auf Höhe der Stereozilien und unterhalb ist basal keine GATA-3-Färbung sichtbar (Abbildung 23E,F). Auf Höhe der Zellkerne zeigt sich nach 48 Stunden Kultur eine starke GATA-3-Färbung (Abbildung 23K,L). In den Negativ-Kontrollen färben sich die Kerne nicht an (Abbildung 23N).

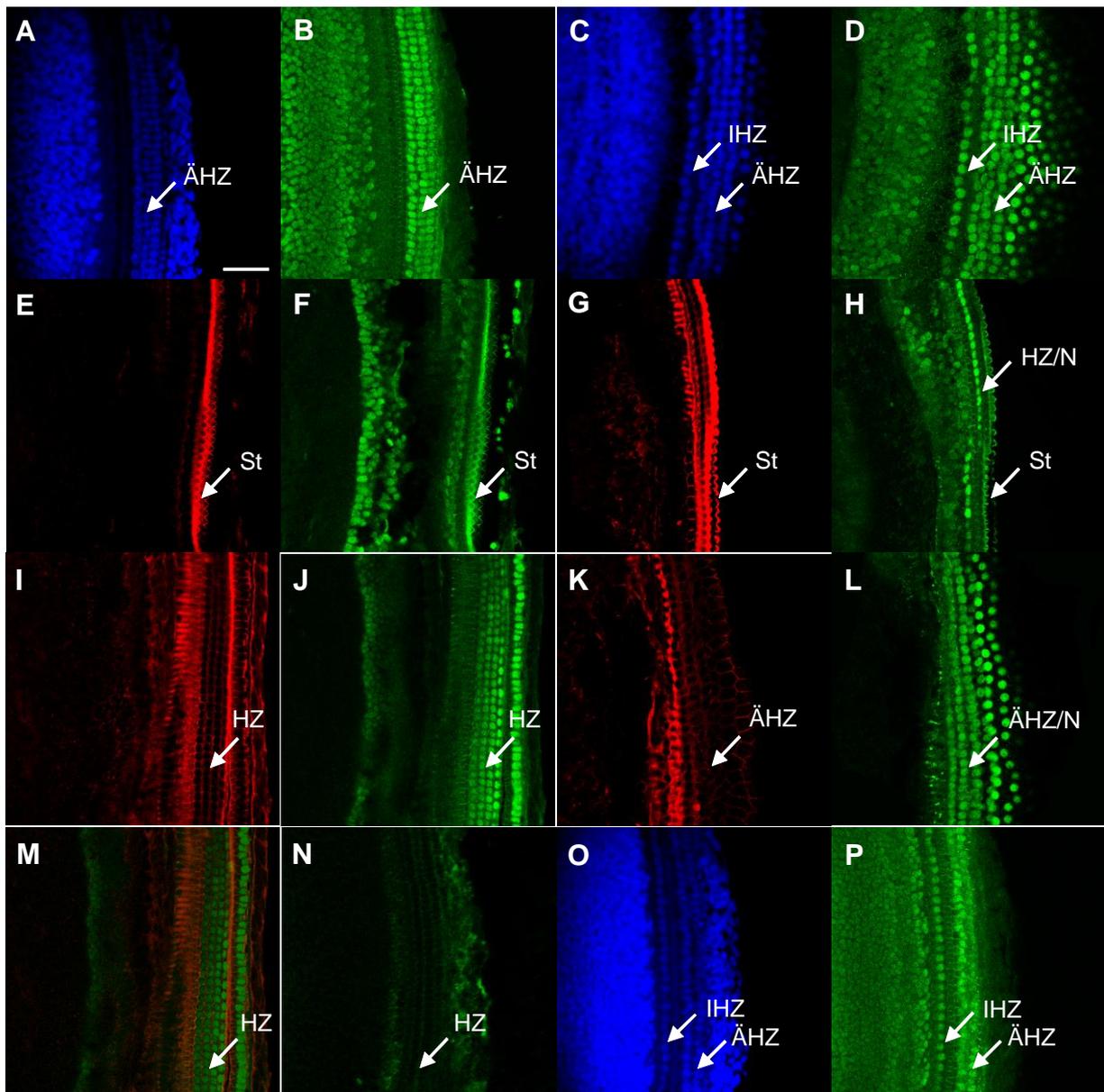


Abbildung 23: GATA-3-Färbung der Zellkerne im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten frisch präpariert und nach 48 Stunden Kultur. A: Hoechst-Färbung der Haarzellkerne im apikalen Fragment (frisch). B: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. C: Hoechst-Färbung der Haarzellkerne im apikalen Fragment (48 Stunden). D: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. E: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment (frisch) fokussiert auf Höhe der Stereozilien. F: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. G: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment (48 Stunden) fokussiert auf Höhe der Stereozilien. H: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. I: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment (frisch) fokussiert auf Höhe der Zellkerne der Haarzellen. J: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. K: Phalloidin-Färbung im basalen Fragment (48 Stunden) fokussiert auf Höhe der Zellkerne der Haarzellen. L: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. M: Überlagerung von I und J. N: Negativ-Kontrolle (Färbeprozess ohne den GATA-3 spezifischen Antikörper). O: A auf Höhe der Zellkerne der inneren Haarzellen fokussiert. P: GATA-3-Färbung desselben Abschnitts. Maßstab: 10 µm. HZ...Haarzellen; IHZ...innere Haarzellen; ÄHZ...äußere Haarzellen; St...Stereozilien; HZ/N...Zellkerne (Nucleus) der Haarzellen.

4.3 Einflussfaktoren auf die Prestin- und Gata-mRNA-Expression

4.3.1 Einfluss der Spiralganglien

Um den möglichen Einfluss der Spiralganglienneurone auf die Prestin-Expression zu untersuchen, wurde der Versuchsaufbau modifiziert: ein Cortisches Organ wurde vollständig von den Spiralganglien isoliert, das kontralaterale nicht. Beide Gruppen wurden für 72 Stunden kultiviert.

Der Indikator für den Einfluss der Spiralganglienzellen auf das Cortische Organ war die Degenerierung der Nervenfasern nach Eliminierung der Spiralganglienzellen. Als Nachweisverfahren für das Vorhandensein bzw. die Elimination der Spiralganglien diente die Neurofilamentfärbung. Die Nervenfasern in der Gruppe, die mit Spiralganglien präpariert wurden, blieben intakt (Abbildung 24A). In Abbildung 24B sieht man ein Cochleafragment, von dem die Spiralganglien während der Präparation entfernt wurden. Man erkennt die degenerierten Neurofilamente, in denen sich das zytoskelettale Strukturprotein Neurofilament perlschnurartig anreichert.

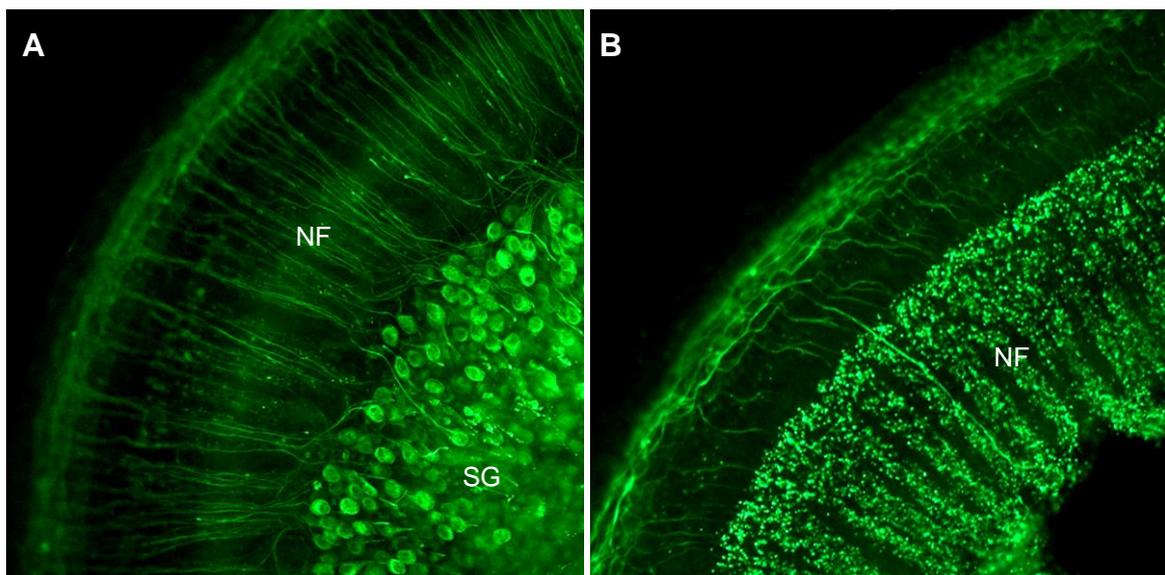


Abbildung 24: Neurofilamentfärbung. A: Cochleafragment mit Spiralganglien präpariert. B: Cochleafragment ohne Spiralganglien präpariert. NF...Neurofilamente; SG...Spiralganglien.

Wie bereits früher beschrieben hat die Präparationsmethode keinen Einfluss auf die Anzahl und Qualität der Haarzellen [71]. Die Fragmente, von denen die Spiralganglien entfernt wurden, waren in unserem Labor in der Regel sogenannte Schwimmer, d.h. sie waren nicht am Boden angehaftet, sondern schwammen eingerollt und waren somit für eine quantitative Auswertung der Haarzellen weniger gut geeignet. Der RNA-Gehalt pro Präparat war in der Gruppe ohne Spi-

ralganglien erwartungsgemäß kleiner als in der Gruppe mit Ganglien. So sank die RNA-Konzentration von durchschnittlich 16 ng/μl (+ SG) auf 10 ng/μl (- SG). Der signifikante Abfall der RNA-Konzentration nach dem Entfernen der Spiralganglienzellen gegenüber den Präparaten mit verbleibenden Spiralganglienzellen (Scheffè + vs. - SG: $p < 0,05$) resultiert somit aus dem Entfernen von Gewebe.

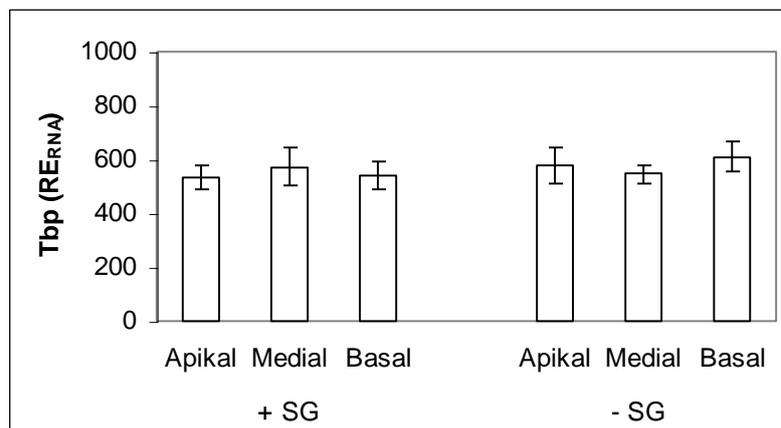


Abbildung 25: Tbp-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 72 Stunden Kultur in Abhängigkeit von der Präparationsart. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf RNA (RE_{RNA}). SG...Spiralganglien. + SG...mit SG präpariert, n = 5; - SG...ohne SG präpariert, n = 7.

Zunächst wurde die Eignung des Referenzgens in diesem Versuchsaufbau geprüft. Wie erwartet, wird die Expression von Tbp nicht durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der Spiralganglien beeinflusst. Abbildung 25 zeigt die graphische Auswertung. Der Tbp-mRNA-Gehalt beträgt in der Gruppe mit Spiralganglien im Mittel 550 ± 30 RE_{RNA} (n = 15) und in der Gruppe ohne Spiralganglien 575 ± 30 RE_{RNA} (n = 21).

Das Entfernen der Spiralganglienzellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Prestin-mRNA-Expression. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der zwei verwendeten Auswertungsverfahren – die Expression von Prestin-mRNA bezogen auf RNA und bezogen auf das Referenzgen Tbp. Beide Auswertungsverfahren zeigen, im Rahmen der methodischen Varianz, das gleiche Ergebnis. Der Prestin-mRNA-Gehalt beträgt in der Gruppe mit Spiralganglien 400 RE_{RNA} bis 1100 RE_{RNA} bzw. 5 RE_{Tbp} bis 13 RE_{Tbp}. In der Gruppe ohne Spiralganglien liegt der Prestin-Gehalt zwischen 500 RE_{RNA} und 1000 RE_{RNA} bzw. zwischen 6 RE_{Tbp} und 14 RE_{Tbp}. Unabhängig von der Art der Präparation ist der Apikal-Basal-Gradient nachweisbar. Die Expression von Prestin ist im basalen Fragment am geringsten gegenüber dem apikalen und medialen Fragment. Der Apikal-Basal-Gradient beträgt in der Gruppe mit Spiralganglien 2,5 (Scheffè: $p < 0,04$) und in der Gruppe ohne Spiralganglien 2,2.

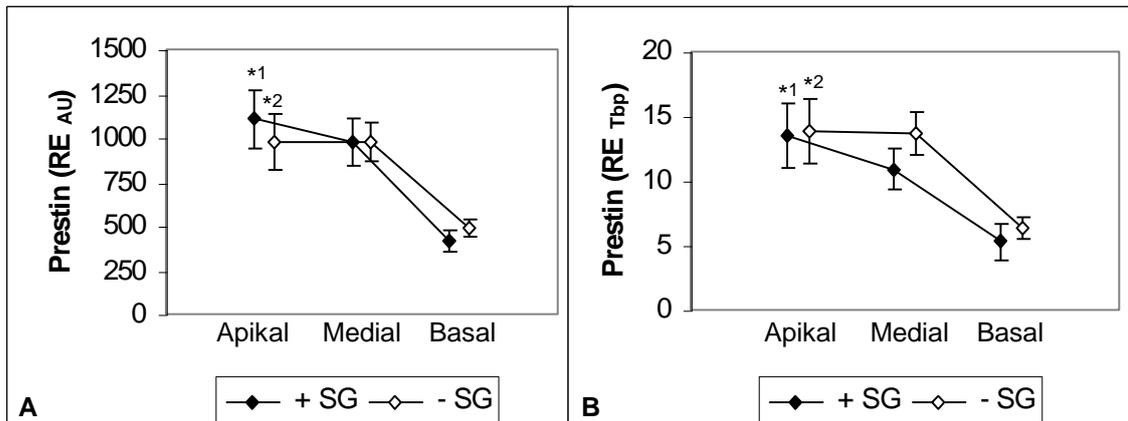


Abbildung 26: Einfluss der Präparationsart auf die Prestin-mRNA-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment. A: Prestin bezogen auf RNA (RE_{RNA}). B: Prestin bezogen auf das Tbp (RE_{Tbp}). Dargestellt sind MW \pm SEM nach 72 Stunden Kultur. SG...Spiralganglien. + SG...mit SG präpariert, n = 5; - SG...ohne SG präpariert, n = 7. *...Signifikant nach LSD-Test apikal vs. basal: *¹...p < 0,001; *²...p < 0,005.

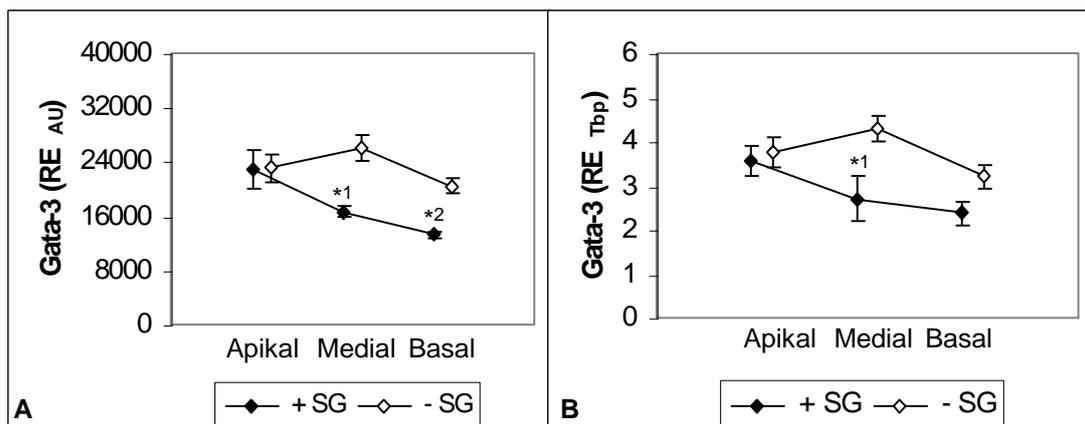


Abbildung 27: Einfluss der Präparationsart auf die Gata-3-mRNA-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment. A: Gata-3 bezogen auf RNA (RE_{RNA}). B: Gata-3 bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}). Dargestellt sind MW \pm SEM nach 72 Stunden Kultur. SG...Spiralganglien. + SG...mit SG präpariert, n = 3; - SG...ohne SG präpariert, n = 5. *...Signifikant nach LSD-Test mit vs. ohne SG: *¹...p < 0,005; *²...p < 0,02.

Die Expression der Gata-3-mRNA in Abhängigkeit zur Präparationsart ist sowohl auf RNA, als auch auf Tbp bezogen in Abbildung 27 (A bzw. B) dargestellt. Apikal beträgt der Gata-3-mRNA-Gehalt in beiden Gruppen 23000 RE_{RNA} bzw. 4 RE_{Tbp} . Medial steigt der Gata-3-Gehalt von 17000 RE_{RNA} auf 26000 RE_{RNA} bzw. von 3 RE_{Tbp} auf 4 RE_{Tbp} . Basal beträgt der Gata-3-Gehalt in der Gruppe mit Spiralganglien 13000 RE_{RNA} und in der Gruppe ohne Spiralganglien 20000 RE_{RNA} bzw. 2 RE_{Tbp} und 3 RE_{Tbp} . Das Entfernen der Spiralganglien hat im apikalen

Fragment keinen Einfluss auf die Gata-3-mRNA-Expression. Im medialen Fragment steigt die Gata-3-Expression. Im basalen Fragment ist ein Anstieg der Gata-3-Expression angedeutet.

In den Präparationen außerhalb dieses Teilversuches stehen die Unversehrtheit des Cortischen Organs und eine möglichst kurze Präparationsdauer im Vordergrund. Bei dieser Art der Präparation können Teile der Spiralganglienzellen am OC-Präparat verbleiben.

4.3.2 Einfluss des Schilddrüsenhormons L-Thyroxin (T₄)

Es ist bekannt, dass die Schilddrüsenhormone *in vivo* die Expression von Prestin beeinflussen [59], allerdings existieren bislang keine Daten darüber, ob Schilddrüsenhormone auch *in vitro* die Prestin-Expression beeinflussen. Die Untersuchung des Einflusses von T₄ in der Kultur kann zugleich ein Indikator dafür sein, ob die organotypische Kultur des Cortischen Organs für die Untersuchung von Einflüssen ausgewählter Faktoren auf die Prestin-Expression geeignet ist. Zugleich kann das Verhalten der Expression der Gata-Transkriptionsfaktoren analysiert werden.

Zur Analyse eines möglichen T₄-Effekts *in vitro* auf die Prestin- und die Gata-3-Expression, wurde dem Kulturmedium 0,5 µmol L-Thyroxin (T₄) hinzugesetzt. Nach 48 Stunden Kultivierung wurden die Haarzellen dargestellt und der Prestin- und Gata-3-mRNA-Gehalt der Proben bestimmt und jeweils mit den Kontrollen verglichen. Der Prestin- und Gata-3-mRNA-Gehalt wurde auf das Referenzgen (RE_{Tbp}) bezogen.

Bei der Auswertung der Phalloidin-Färbung fand sich kein Unterschied in der Anzahl und im Zustand der Haarzellen zwischen den Kontrollen und den T₄-Präparaten.

Abbildung 28 zeigt die Genexpression von Prestin und den Gata-Transkriptionsfaktoren nach 48 Stunden in Kultur in den T₄-Präparaten und den Kontrollen, ausgedrückt als Vielfaches des Ausgangswertes (frisch), d.h. die Veränderung der Genexpression von frisch nach 48 Stunden Kultur (im Englischen: fold change). Hierzu wurde jeweils die RNA des einen Cortischen Organs eines Tieres frisch präpariert und die RNA des kontralateralen OC nach 48 Stunden Kultur präpariert. In den Kontrollen steigt die Prestin-mRNA-Expression (Abbildung 28 A) im apikalen Fragment des Cortischen Organs um das 1,8fache, medial um das 1,5fache und basal um das 1,2fache. Dies entspricht dem in den *In-Vitro*-Versuchen gezeigten Anstieg der Prestin-Expression nach 48 Stunden Kultur. Unter dem Einfluss von L-Thyroxin verdoppelt sich der Prestin-mRNA-Gehalt apikal auf das 4,3fache und medial auf das 3,0fache. Basal zeigte sich kein signifikanter T₄-Effekt. Nach der Zugabe von L-Thyroxin steigt die Prestin-mRNA-Expression *in vitro* im apikalen und medialen Fragment deutlich. Die mRNA-Expression von Gata-3 unter T₄-Gabe ist der von Prestin auffallend ähnlich (Abbildung 28 B). Die Gata-3-mRNA-Expression steigt unter dem Einfluss des L-Thyroxin im apikalen Fragment vom

1,3fachen in den Kontrollen auf das 2,2fache, medial vom 1,2fachen auf das 1,8fache und basal vom 1,1fachen auf das 1,6fache. Nach T₄-Zugabe erhöht sich die Gata-3-mRNA-Expression *in vitro* im apikalen, im medialen und basalen Fragment signifikant. Wie die Expression der Prestin-mRNA wird auch die der Gata-3-mRNA in der apikalen Region stärker stimuliert als in der basalen. Gata-2 und Gata-1 zeigen keine signifikanten Änderungen im Expressionsmuster unter T₄-Gabe verglichen mit den Kontrollen.

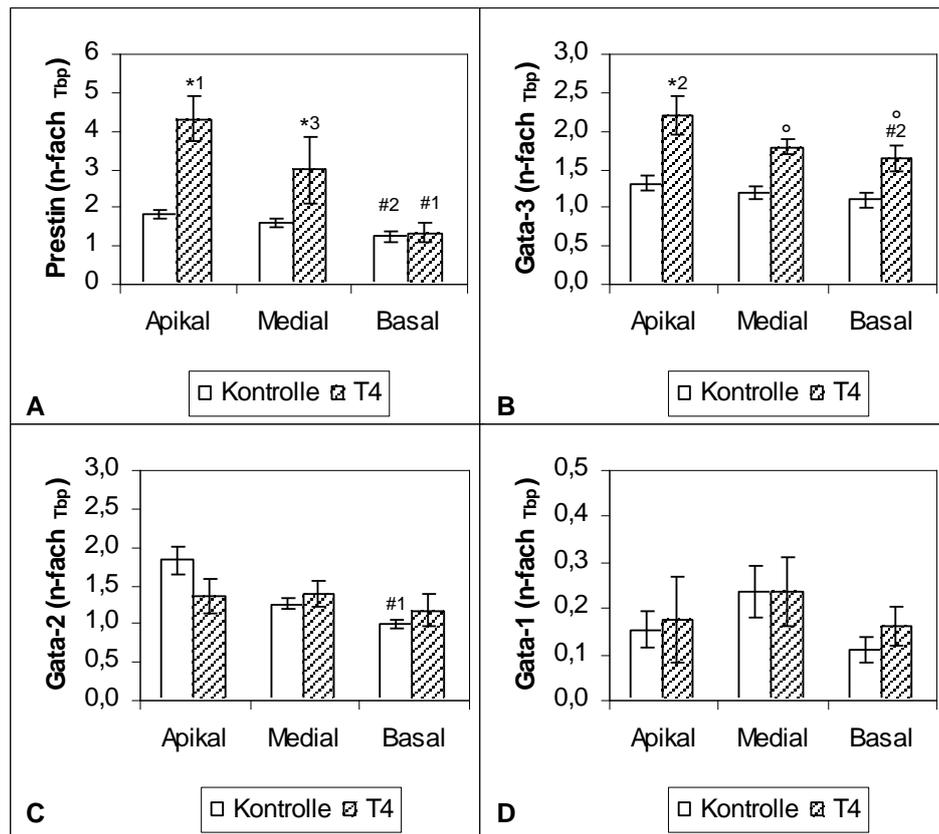


Abbildung 28: Einfluss von L-Thyroxin auf die mRNA-Expression von Prestin und den Gata-Transkriptionsfaktoren im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs. A: Prestin. B: Gata-3. C: Gata-2. D: Gata-1. Dargestellt sind MW ± SEM der Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) von frisch nach 48 Stunden in Kultur als Vielfaches (n-fach_{Tbp}). Kontrolle: ohne T₄ (n = 25-30), T₄: mit 0,5 µm T₄ (n = 6). *°...Signifikant vs. Kontrolle: *...nach Scheffé-Test: *¹...p < 0,001; *²...p < 0,01; *³...p < 0,03; °...nach LSD-Test: p < 0,05. #...Signifikant vs. apikal: #¹...nach Scheffé-Test: p < 0,005; #²...p < 0,05.

Der Apikal-basal-Gradient der Prestin-mRNA-Expression wird unter dem Einfluss von T₄ stärker ausgebildet, da der Anstieg der Expression im apikalen Fragment 3fach höher ist als im basalen Fragment. Während die Gata-3-mRNA-Expression in den Kontrollen keinen Apikal-Basal-Gradienten zeigt, bildet sich dieser unter T₄-Zugabe aus. Im Gegensatz dazu findet sich ein Apikal-Basal-Gradient der Gata-2-mRNA-Expression in den Kontrollen, jedoch nicht in den T₄-

Präparaten, ebensowenig in der Gata-1-mRNA-Expression.

Die Gata-3-mRNA-Expression korreliert signifikant mit der von Prestin sowohl in den Kontrollen als auch in den T₄-Präparaten (Abbildung 29) und unabhängig von der OC-Region (Tabelle 8).

Tabelle 8: Korrelation der L-Thyroxin induzierten Prestin- und Gata-3-mRNA-Veränderungen.

Fragment	Regressionsgleichung	Bestimmtheitsmaß R	p-Wert	Anzahl n
Apikal	$y = 0,85x^{1,75}$	0,963	< 0,01	6
Medial	$y = 1,13x^{1,59}$	0,894	< 0,05	5
Basal	$y = 0,99x^{1,72}$	0,971	< 0,01	6

Potenzielle Regressionsanalyse der Veränderung der Expression von Prestin und Gata-3 von frisch nach 48 Stunden Kultur unter T₄-Einfluss im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs. Achsengleichungen der potenziellen Regression. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten. Prestin...y; Gata-3...x.

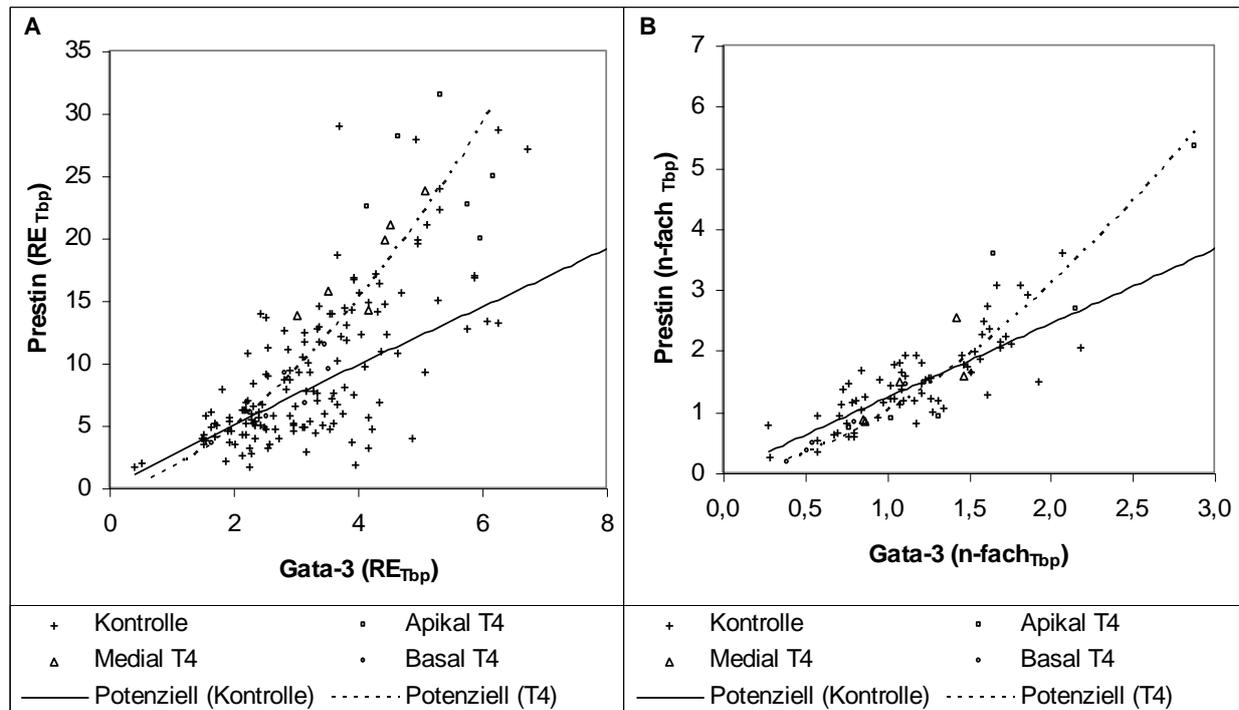


Abbildung 29: Korrelation von Prestin- und Gata-3-mRNA unter dem Einfluss von L-Thyroxin. A: mRNA-Gehalt nach 48 Stunden Kultur bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}). B: Anstieg der mRNA-Expression (in RE_{Tbp}) von frisch nach 48 Stunden Kultur (n-fach_{Tbp}). Dargestellt sind die Einzelwerte der Kontrollen unabhängig von der Region sowie die Einzelwerte unter dem Einfluss von T₄ im apikalen, medialen und basalen Fragment der Cochlea. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Gleichungen der potenziellen Regression: A: Kontrolle $y = 2,48x^{1,10}$; R = 0,703; n = 63; p < 0,001. T₄ $y = 1,57x^{1,63}$; R = 0,904; n = 17; p < 0,001. B: Kontrolle $y = 1,22x^{1,00}$; R = 0,808; n = 63; p < 0,001. T₄ $y = 0,99x^{1,63}$; R = 0,952; n = 17; p < 0,001. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten. Prestin...y; Gata-3...x.

Um zu analysieren, ob der T₄-induzierte Anstieg der Prestin-mRNA mit einem Anstieg des Prestin-Proteins verbunden ist, wurde das Prestin-Protein in den organotypischen Kulturen immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 30) und die Fluoreszenzintensität der Zellmembranen der äußeren Haarzellen gemessen.

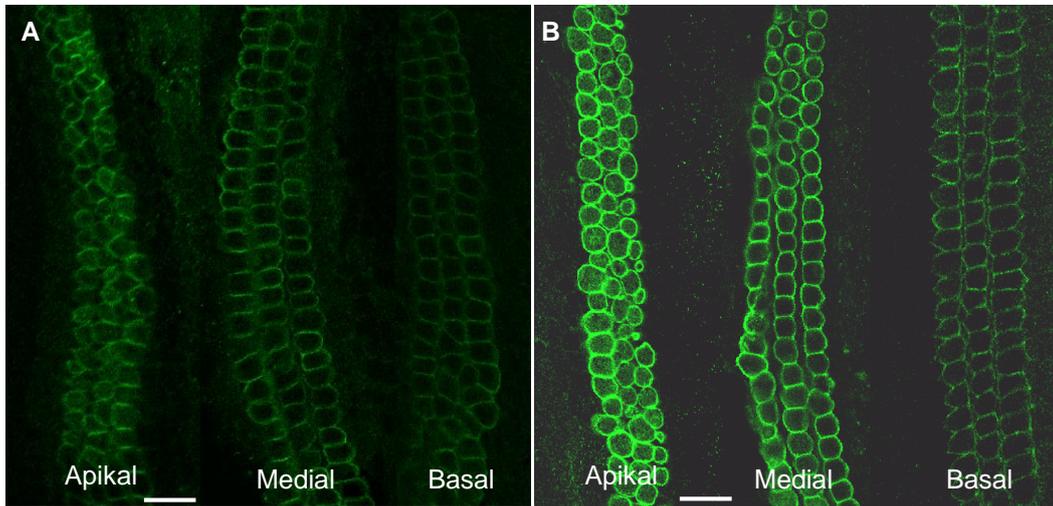


Abbildung 30: Prestin-Protein-Färbung im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten nach 48 Stunden Kultur mit und ohne L-Thyroxin. A: ohne T₄. B: mit 0,5 µM T₄. Der Maßstabbalken entspricht 10 µm. T₄...L-Thyroxin.

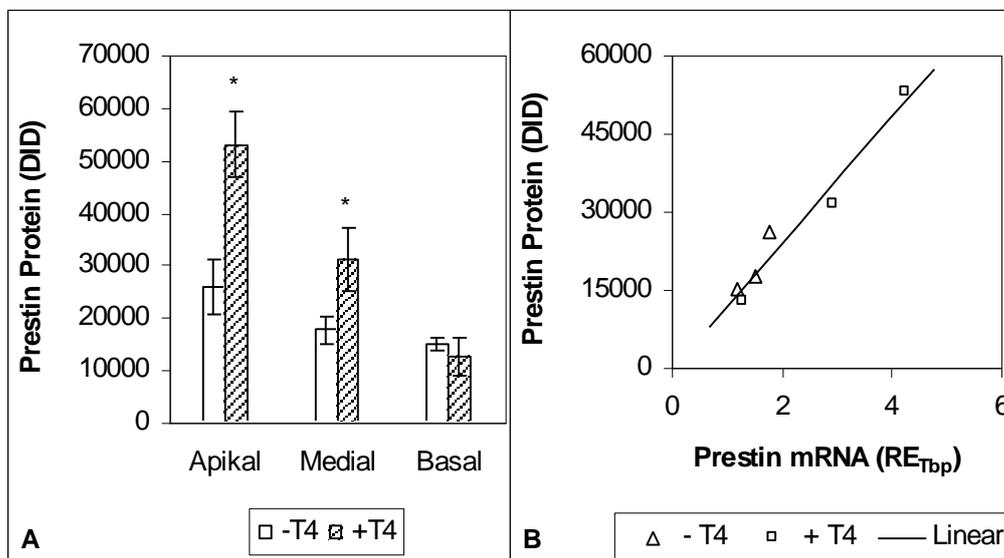


Abbildung 31: Einfluss von L-Thyroxin auf die Prestin-Protein-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten nach 48 Stunden Kultur. A: Prestin-Protein-Gehalt. Dargestellt sind MW ± SEM ausgedrückt als Differential Integrated Density (DID). *...Signifikant nach Scheffé-Test $p < 0,006$. B: Korrelation zwischen dem mRNA- und Protein-Gehalt von Prestin (Protein...y;

mRNA...x). Dargestellt sind die MW der Prestin-mRNA (RE_{Tbp}) und des Prestin-Proteins (DID). Die Gerade repräsentiert die Gleichung der linearen Regression: $y = 12180x - 850$; $R = 0,977$; $n = 6$; $p < 0,001$. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten.

Die Bestimmung der Dichte der Banden (DID) in den verschiedenen Segmenten zeigt einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität unter dem Einfluss von T_4 und einen Abfall der Intensität vom apikalen zum basalen Segment (Abbildung 31A). Das Muster der Prestin-Protein-Expression stimmt weitgehend mit dem Muster der Prestin-mRNA-Expression überein. Es berechnet sich ein hoher Korrelationskoeffizient zwischen dem mRNA- und Protein-Gehalt von Prestin (Abbildung 31B).

4.3.3 Einfluss von Retinsäure

Retinsäure ist der aktive Metabolit der Vitamin-A-Säure und Aktivator von nukleären Rezeptoren. Retinsäure wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Um zu verifizieren, dass mögliche mRNA-Veränderungen durch Retinsäure verursacht sind und nicht durch DMSO, wurde das eine OC mit Retinsäure behandelt, das kontralaterale OC diente als Kontrolle und wurde mit einer der Retinsäure-Konzentration entsprechenden DMSO-Konzentration behandelt. Es wurden fünf Retinsäure-Konzentrationen untersucht: 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M jeweils gelöst in 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % bzw. 1 % DMSO. Die entsprechenden Kontrollen enthielten die jeweilige DMSO-Konzentration: 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % bzw. 1 % DMSO. Nach 48 Stunden Kultur wurde der mRNA-Gehalt gemessen und in einem Teil der Präparate die Haarzellen gezählt.

Die Auswertung der Phalloidin-Färbung ergab keinen signifikanten Unterschied in Form, Anordnung oder Anzahl der Haarzellen in der Retinsäure-Gruppe verglichen mit Kontrollen, die im Standardmedium kultiviert wurden.

Zunächst wurde geprüft, ob DMSO in den verwendeten Lösungskonzentrationen die Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression nach 48 Stunden Kultur beeinflusst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Kontrollen wurden unter Standardbedingungen – ohne DMSO – kultiviert. Die Behandlung der Proben mit 0,01 Prozent bis 0,5 Prozent DMSO hat weder einen Einfluss auf den Prestin- noch auf den Gata-3-mRNA-Gehalt. Die Erhöhung der DMSO-Konzentration auf 1 Prozent führt zu einem signifikanten Abfall des Prestin- und des Gata-3-Gehalts. Der Prestin-Gehalt sinkt apikal nach Behandlung mit 1 Prozent DMSO um 85 Prozent gegenüber dem Kontrollwert, medial um 80 Prozent und basal um 70 Prozent. Der Gata-3-Gehalt sinkt apikal um 50 Prozent, medial um 30 Prozent und basal um 40 Prozent gegenüber dem Kon-

trollwert.

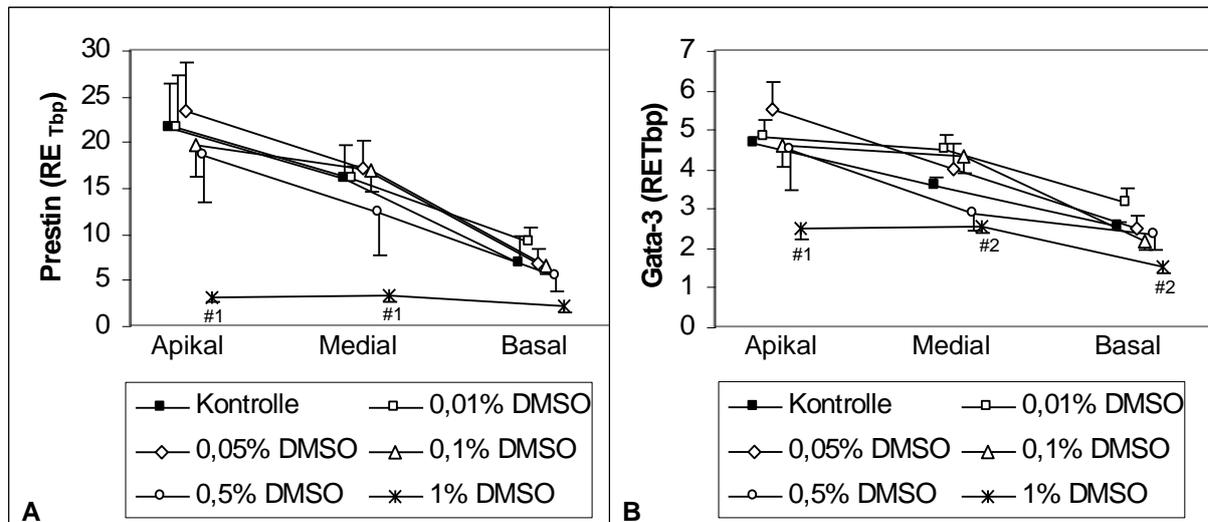


Abbildung 32: Einfluss von DMSO auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM des Prestin-mRNA-Gehalts bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur. Zur besseren Übersicht wurde der SEM jeweils nur nach oben oder nach unten dargestellt. Kontrolle (n = 17), 0,01% (n = 5), 0,05% (n = 6), 0,1% (n = 10), 0,5% μ M (n = 8) und 1% (n = 7) DMSO. # ...Signifikant nach LSD-Test vs. Kontrolle: #1 ...p < 0,001; #2 ...p < 0,05.

Da DMSO-Konzentrationen bis 0,5 Prozent in der 48-Stunden-Kultur keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 haben, werden genannte Konzentrationen zur besseren Übersicht im Folgenden als Kontrolle zusammengefasst und den Retinsäure-Gruppen gegenübergestellt.

Retinsäure reduziert die Expression von Prestin und Gata-3 nach 48 Stunden Kultur dosisabhängig. Abbildung 33A zeigt den dosisabhängigen Einfluss der Retinsäure auf den Prestin-mRNA-Gehalt im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur. Im apikalen Segment sinkt die Prestin-Expression ab einer Konzentration von 10 μ M signifikant, im medialen Segment ab einer Konzentration von 50 μ M. Während basal Konzentrationen von 100 μ M und mehr notwendig sind, um die Prestin-Expression zu reduzieren. Die Zugabe von 10 μ M Retinsäure senkt apikal den Prestin-mRNA-Gehalt um 30 Prozent, 50 μ M apikal und medial um 60 Prozent und 100 μ M apikal und medial um 80 bis 90 Prozent.

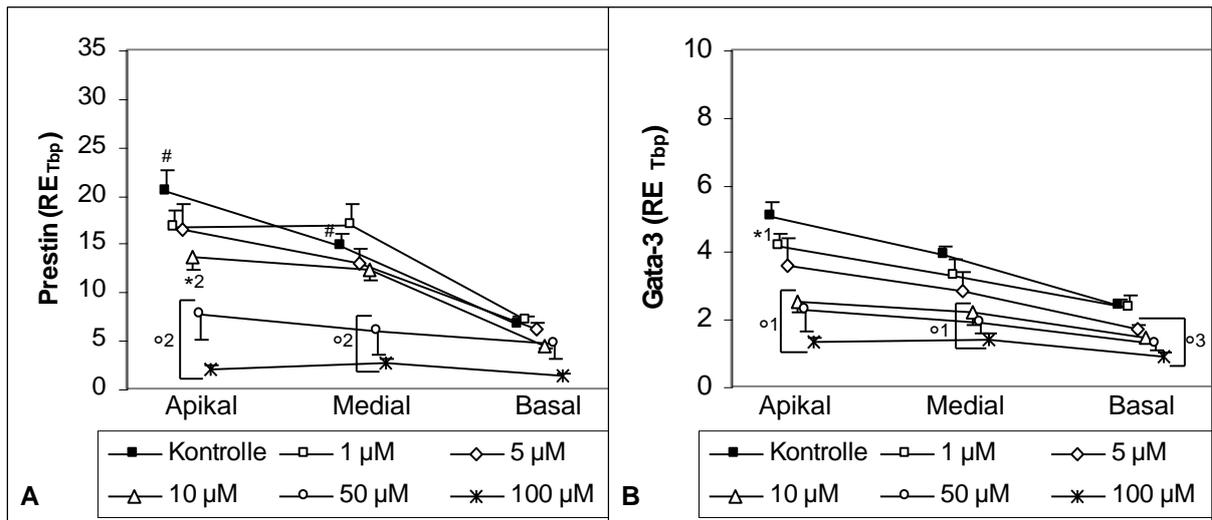


Abbildung 33: Einfluss von Retinsäure auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM des Prestin-mRNA-Gehalts bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur. Zur besseren Übersicht wurde der SEM jeweils nur nach oben oder nach unten dargestellt. Kontrolle (beinhaltet entsprechend der Konzentration der Retinsäure 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5% DMSO; n = 30), 1 μ M (n = 5), 5 μ M (n = 6), 10 μ M (n = 10), 50 μ M (n = 8) und 100 μ M (n = 6) Retinsäure. Signifikant nach LSD-Test: *...vs. Kontrolle: *¹...p < 0,01; *²...p < 0,02; °...jeweils vs. Kontrolle: °¹...p < 0,001; °²...p < 0,003; °³...p < 0,03; #...p < 0,007 vs. kombinierte Proben von 5 μ M und 10 μ M Retinsäure.

Die Expression von Gata-3 reagiert ähnlich sensitiv auf die Retinsäure, wie die des Prestins. Apikal sinkt die Gata-3-Expression ab Konzentrationen von 5 μ M signifikant, medial und basal ab Konzentrationen von 10 μ M. Abbildung 33B zeigt den dosisabhängigen Einfluss der Retinsäure auf den Gata-3-mRNA-Gehalt im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur. Die Zugabe von 5 μ M Retinsäure senkt apikal den Prestin-mRNA-Gehalt um 30 Prozent, 10 μ M apikal, medial und basal um 40 bis 50 Prozent, 50 μ M apikal, medial und basal um 50 bis 60 Prozent und 100 μ M apikal, medial und basal um 60 bis 70 Prozent.

Um den konzentrationsabhängigen Einfluss der Retinsäure auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 im Cortischen Organ besser vergleichen zu können, wird in Abbildung 34 die Veränderung des mRNA-Gehalts der mit Retinsäure behandelten Probe zur entsprechenden Kontrolle als Vielfaches dargestellt.

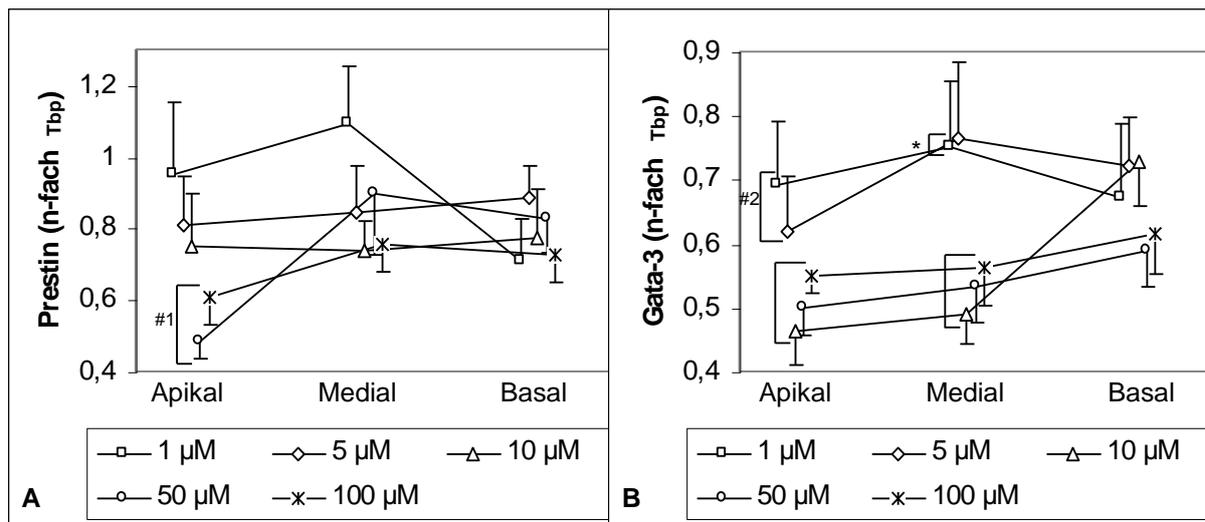


Abbildung 34: Einfluss von Retinsäure auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM der Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) nach Behandlung mit Retinsäure als Vielfaches der entsprechenden mit DMSO behandelten Kontrolle (n-fach_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur. 1 μ M (n = 5), 5 μ M (n = 6), 10 μ M (n = 8), 50 μ M (n = 8) und 100 μ M (n = 7) Retinsäure. *...Signifikant nach Scheffé-Test: p < 0,03 kombinierte Proben von 1 μ M und 5 μ M vs. kombinierte Proben von 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M. #...Signifikant nach LSD-Test: #1...p < 0,02 kombinierte Proben von 50 μ M und 100 μ M vs. 1 μ M; #2...p < 0,02 kombinierte Proben von 1 μ M und 5 μ M vs. kombinierte Proben von 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M.

Im apikalen Segment hat eine Retinsäure-Konzentration von 1 μ M keinen Einfluss auf die Prestin-mRNA-Expression (Abbildung 34A), während der Prestin-mRNA-Gehalt unter dem Einfluss von Konzentrationen bis 10 μ M um etwa 20 Prozent absinkt und Konzentrationen von 50 μ M und 100 μ M die Prestin-Expression um etwa 50 Prozent senken. Im medialen Segment sinkt die Prestin-Expression um maximal 20 Prozent ab einer Konzentration von 5 μ M; eine Dosissteigerung bis 100 μ M hat keinen verstärkenden Effekt. Die Prestin-Expression im basalen Fragment ist kaum sensitiv gegenüber der Retinsäure; der mRNA-Gehalt der mit Retinsäure behandelten Proben beträgt zwischen 70 Prozent und 90 Prozent der entsprechenden mit DMSO behandelten Kontrollen. Die Gata-3-Expression (Abbildung 34B) reagiert sensitiver auf die Retinsäure. Bereits niedrige Konzentrationen von 1 μ M senken die Expression im gesamten Cortischen Organ um etwa 25 Prozent. Im apikalen und medialen Fragment sinkt die Expression um 50 Prozent ab Konzentrationen von 10 μ M. Basal werden für eine Expressions-Reduktion um 40 Prozent Konzentrationen von 50 μ M und mehr benötigt.

Um die Beziehung zwischen der Expression von Prestin und der von Gata-3 unter dem Einfluss der Retinsäure besser zu analysieren, wurde die Regressionsanalyse verwendet. Abbildung 35 zeigt eine hohe Korrelation zwischen der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression unter

dem Einfluss von Retinsäure. Die Gleichungen der linearen Regression der Werte in jedem Segment sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression korreliert auch innerhalb jedes Segments unabhängig von der Retinsäure-Konzentration signifikant.

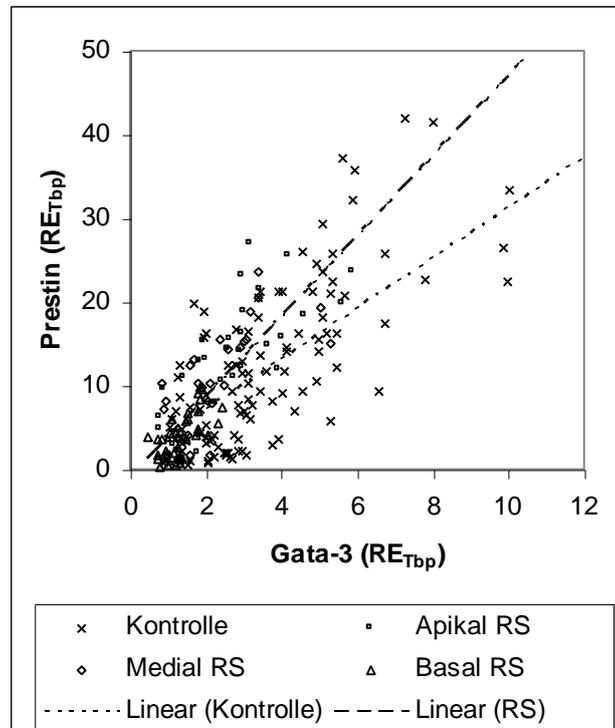


Abbildung 35: Korrelation von Prestin und Gata-3 unter dem Einfluss von Retinsäure. Dargestellt sind die Einzelwerte des mRNA-Gehalts bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment der Cochlea nach 48 Stunden Kultur. Die Einzelwerte der Kontrollen sind unabhängig von der Region dargestellt. Die gestrichelten Geraden repräsentieren die Gleichungen der linearen Regression: Kontrollen (DMSO-behandelt) $y = 3,01x + 1,0$; $R = 0,794$; $n = 110$; $p < 0,001$. Retinsäure (alle) $y = 4,81x - 1,17$; $R = 0,803$; $n = 100$; $p < 0,001$. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten. Prestin...y; Gata-3...x. RS... Retinsäure.

Tabelle 9: Korrelation der Retinsäure induzierten Prestin- und Gata-3-mRNA-Veränderungen.

Fragment	Regressionsgleichung	Bestimmtheitsmaß R	p-Wert	Anzahl n
Apikal	$y = 4,64x - 0,14$	0,785	< 0,001	36
Medial	$y = 4,26x + 0,64$	0,733	< 0,001	30
Basal	$y = 3,79x - 0,94$	0,679	< 0,001	34

Lineare Regressionsanalyse des mRNA-Gehalt von Prestin und Gata-3 im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs nach 48 Stunden Kultur unter dem Einfluss von Retinsäure. Achsengleichungen der linearen Regression. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten.

4.3.4 Einfluss von Gemfibrozil

Um zu prüfen, ob Gemfibrozil die Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur beeinflusst, wurde dem Medium Gemfibrozil zugegeben. Es wurden drei Gemfibrozil-Gruppen unterschiedlicher Konzentration definiert, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen: 50 μM , 250 μM und 1 mM. Diese wurden mit der Kontroll-Gruppe verglichen. Ein OC wurde frisch, das kontralaterale OC nach 48 Stunden in Kultur untersucht. In einem Teil der Präparate wurden die Haarzellen gezählt, in den restlichen Präparaten wurde die RNA isoliert und die Prestin- und Gata-3-mRNA, sowie die des Referenzgens Tbp bestimmt.

Um einen möglichen Effekt des Gemfibrozils auf den Zustand und die Anzahl der Haarzellen zu beobachten, wurden die HZ nach 48 Stunden fixiert und mit Phalloidin gefärbt. Gemfibrozil hat in der organotypischen 48-Stunden-Kultur verglichen mit den Kontroll-Präparaten keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen und die Anzahl der vorhandenen Haarzellen bzw. deren Fehlstellen (Daten nicht dargestellt).

In Abbildung 36 ist der mRNA-Gehalt von Prestin und Gata-3 nach 48 Stunden Kultur der Kontrollen und unter dem Einfluss von 50 μM , 250 μM und 1 mM Gemfibrozil dargestellt.

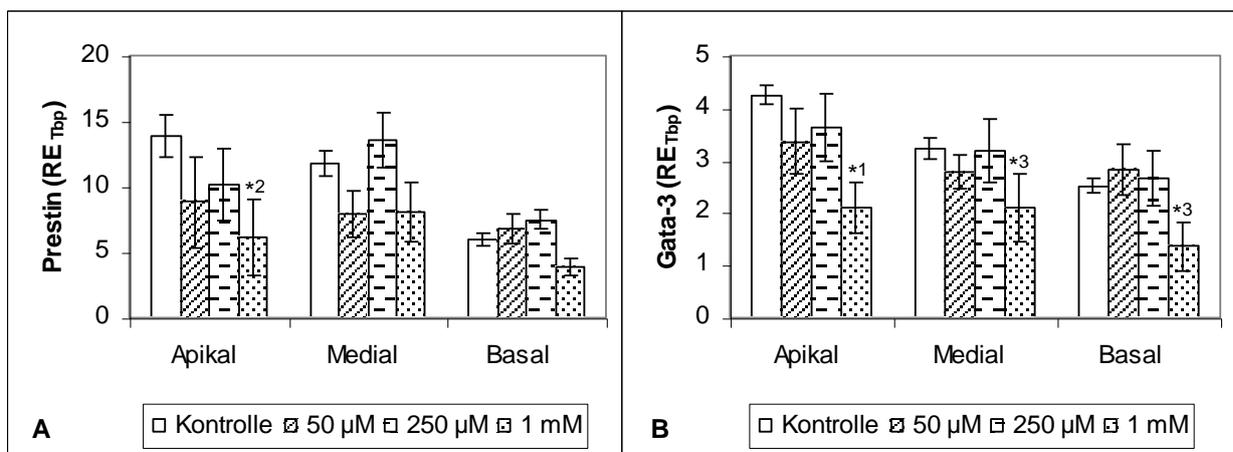


Abbildung 36: Einfluss von Gemfibrozil auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur. Dargestellt sind MW \pm SEM bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}). Kontrolle (n = 25), 50 μM , 250 μM und 1 mM Gemfibrozil (jeweils n = 4). *...Signifikant nach LSD-Test vs. Kontrolle: *¹...p < 0,001; *²...p < 0,01; *³...p < 0,03.

In den Kontrollen beträgt der Prestin-mRNA-Gehalt nach 48 Stunden Kultur apikal 14 RE_{Tbp}, medial 12 RE_{Tbp} und basal 6 RE_{Tbp}. Niedrige Gemfibrozil-Konzentrationen (50 μM , 250 μM) haben keinen signifikanten Einfluss auf die Prestin-Expression. Der Prestin-mRNA-Gehalt beträgt apikal etwa 10 RE_{Tbp}, medial 8 RE_{Tbp} bis 14 RE_{Tbp} und basal 7 RE_{Tbp}. Eine Erhöhung der

Gemfibrozil-Konzentration auf 1 mM führt zu einem signifikanten Abfall der Prestin-Expression in der apikalen OC-Region. Medial und basal deutet sich ein Abfall an. Der Prestin-mRNA-Gehalt beträgt apikal 6 RE_{Tbp}, medial 8 RE_{Tbp} und basal 4 RE_{Tbp}. Die Expression von Gata-3 verhält sich ähnlich. Während niedrige Gemfibrozil-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Gata-3-Expression haben, sinkt die Gata-3-Expression bei 1 mM im apikalen, medialen und basalen Fragment. Bei 1 mM Gemfibrozil fällt der Gata-3-mRNA-Gehalt in allen Fragmenten signifikant etwa um den Faktor 2.

Um den Einfluss von Gemfibrozil auf die Expression von Prestin und Gata-3 weiter zu charakterisieren, wurde der mRNA-Gehalt nach 48 Stunden Kultur mit den Werten des frisch präparierten Cortischen Organs (kontralaterales OC desselben Versuchstieres) verglichen. Die Veränderung der Prestin- und Gata-3-Expression nach 48 Stunden Kultur unter dem Einfluss von Gemfibrozil verglichen mit den Kontrollen ist in Abbildung 37 dargestellt. Niedrige Konzentrationen von Gemfibrozil (50 µM und 250 µM) haben keinen Einfluss auf die Prestin- und Gata-3-Expression. Bei einer Konzentration von 1 mM wird sowohl die Expression von Prestin als auch die von Gata-3 inhibiert. Die Expression von Prestin sinkt im apikalen Segment um 71 Prozent, im medialen um 42 Prozent und im basalen um 17 Prozent. Die Gata-3-Expression vermindert sich um etwa 50 Prozent.

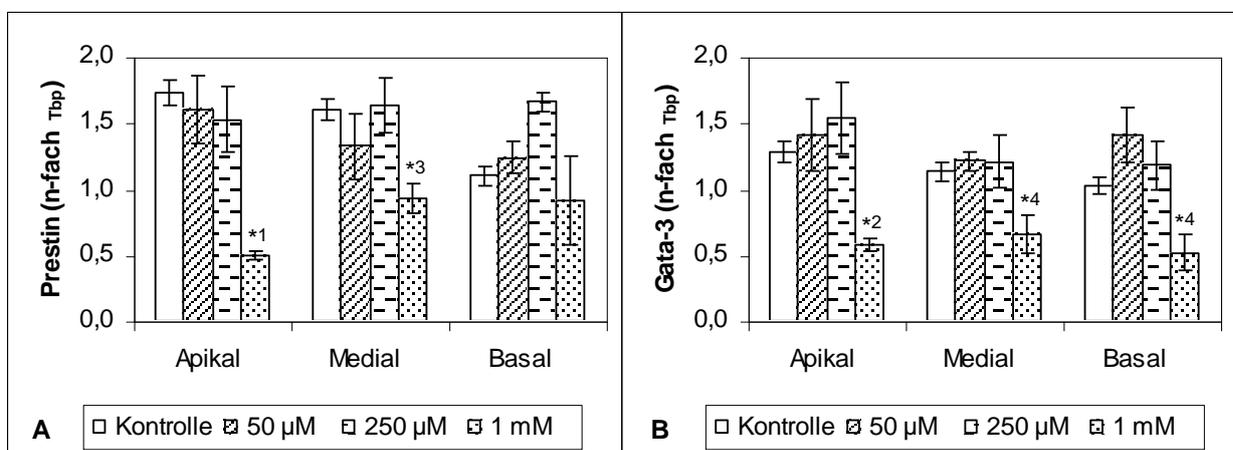


Abbildung 37: Einfluss von Gemfibrozil auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW ± SEM der Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) nach 48 Stunden Kultur als Vielfaches der entsprechenden frisch präparierten Probe (n-fach_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment. Kontrolle (n = 24), 50 µM (n = 4), 250 µM (n = 4) und 1 mM (n = 3). *...Signifikant nach LSD-Test vs. Kontrolle: *¹...p < 0,001; *²...p < 0,005; *³...p < 0,01; *⁴...p < 0,05.

Unter dem Einfluss von Gemfibrozil besteht zwischen der Prestin- und Gata-3-mRNA-

Expression eine hohe Korrelation (Abbildung 38). Die Korrelation ist bei jeder Konzentration und in jedem Cochlea-Segment signifikant. Die Veränderung der mRNA-Expression von frisch nach 48 Stunden Kultur von Prestin und Gata-3 korreliert am stärksten im apikalen Fragment. Desweiteren steigt die Korrelation unter dem Einfluss von Gemfibrozil konzentrationsabhängig (Tabelle 10).

Tabelle 10: Korrelation der Gemfibrozil induzierten Prestin- und Gata-3-mRNA-Veränderungen.

Konzentration	Regressionsgleichung	Bestimmtheitsmaß R	p-Wert	Anzahl n
50 μ M	$y = 0,72x + 0,43$	0,635	< 0,05	12
250 μ M	$y = 0,55x + 0,92$	0,736	< 0,01	11
1 mM	$y = 1,20x + 0,08$	0,934	< 0,001	10

Lineare Regressionsanalyse der Veränderung des mRNA-Gehalts von Prestin und Gata-3 im Cortischen Organ nach 48 Stunden Kultur unter dem Einfluss von 50 μ M, 250 μ M und 1 mM Gemfibrozil. Achsengleichungen der linearen Regression. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten. Prestin...y; Gata-3...x.

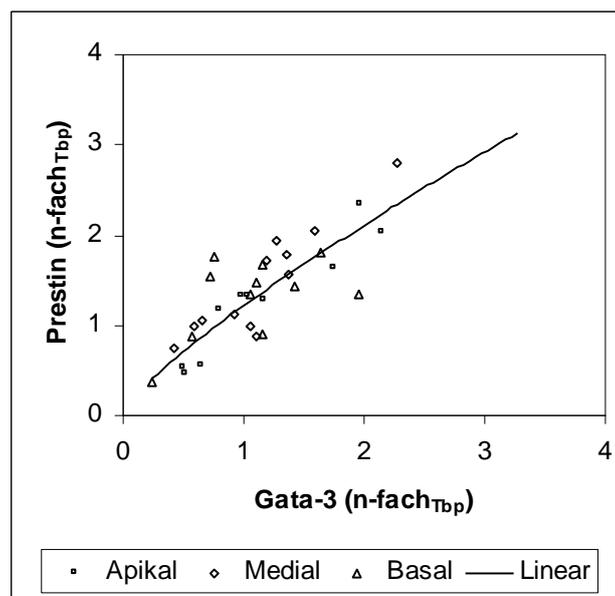


Abbildung 38: Korrelation von Prestin- und Gata-3-mRNA unter dem Einfluss von Gemfibrozil. Anstieg der mRNA-Expression (in RE_{Tbp}) von frisch nach 48 Stunden Kultur ($n\text{-fach}_{Tbp}$). Dargestellt sind die Einzelwerte unter dem Einfluss von Gemfibrozil im apikalen, medialen und basalen Fragment der Cochlea. Die Linie repräsentiert die Gleichung der potenziellen Regression (unabhängig von der Region) $y = 1,19x^{0,81}$; $R = 0,836$; $n = 33$; $p < 0,001$. P-Wert signifikant nach Pearson-Korrelationskoeffizienten. Prestin...y; Gata-3...x.

4.3.5 Einfluss von ausgewählten Wachstumsfaktoren: IGF und TGF- β

Einfluss von IGF: Frühere Microarray-Untersuchungen zeigten, dass sich die mRNA-Expression von IGF in der organotypischen Kultur der Cochlea deutlich erhöht [83]. IGF spielt

eine wichtige Rolle während der Entwicklung von Haarzellen und für den Erhalt der zellulären Intaktheit des Organismus. Daher wurde ein möglicher Einfluss von exogenem IGF auf die Prestin-mRNA-Expression untersucht. Hierzu wurden zwei Gruppen definiert, welche sich lediglich in der Zusammensetzung des Kulturmediums mit und ohne Zusatz von IGF unterscheiden. Ein OC wurde in IGF-haltigem (24 ng/ml) – kompletten – Kulturmedium kultiviert und das kontralaterale OC in Medium ohne IGF. Die Auswertung der Ergebnisse (Tabelle 11, Seite 71) ergab keinen signifikanten Unterschied in der Expression der Prestin-mRNA nach 48 Stunden Kultivierung unter Zugabe von IGF verglichen mit der unbehandelten Gruppe.

Tabelle 11: Einfluss von IGF auf die mRNA-Expression von Prestin in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.

	Apikal	Medial	Basal
+ IGF	8,1 ± 0,9	12,1 ± 3,0	5,2 ± 2,3
- IGF	8,8 ± 1,4	9,6 ± 2,0	4,5 ± 1,0

Dargestellt sind MW ± SD der Prestin-mRNA-Expression bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment. + IGF...Medium komplett mit 24 ng/ml IGF, n = 3. - IGF...Medium ohne IGF-Zugabe, n = 3.

Einfluss von TGF-β: Frühere Studien haben gezeigt, dass TGF-β einen protektiven Einfluss auf das Überleben der äußeren Haarzellen hat [67]. Um dessen Einfluss auf die Prestin-mRNA-Expression zu untersuchen, wurde dem Kulturmedium TGF-β zugesetzt. Zunächst wurden drei TGF-β-Gruppen mit unterschiedlicher Konzentration definiert, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen: 1 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml. Ein OC wurde der Kontrollgruppe, das kontralaterale OC einer TGF-β-Gruppe zugewiesen. Nach 48 Stunden Kultivierung wurde ein Teil der Präparate fixiert und mit Phalloidin gefärbt, in den restlichen Präparaten wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 bestimmt.

Um einen möglichen Effekt auf den Zustand und die Anzahl der Haarzellen zu beobachten, wurden die HZ in den 48-Stunden-TGF-β-Präparaten gezählt und mit den 48-Stunden-Kontrollen verglichen. Die Zugabe von TGF-β hat in der 48-Stunden-Kultur keinen Einfluss auf die Form, Anordnung und Anzahl der Haarzellen. In beiden Gruppen befinden sich auf 100 µm im apikalen, medialen und basalen Fragment etwa 9 innere und 36 äußere Haarzellen. In beiden Gruppen finden sich auf 100 µm keine Verluste von äußeren Haarzellen. Diese Aussage bestätigt sich bei Zählung der Fehlstellen (Daten nicht dargestellt). Die inneren Haarzellen zeigen auf 100 µm unabhängig von der TGF-β-Zugabe eine Fehlstelle im medialen und basalen Fragment und keine Verluste im apikalen Fragment.

Die Auswertung des mRNA-Gehaltes von Prestin nach 48 Stunden Kultivierung (Abbildung 39) deutet unter dem Einfluss von 50 ng/ml TGF-β im medialen Fragment einen

Anstieg der Prestin-mRNA-Expression an: in den Kontrollen beträgt der mRNA-Gehalt von Prestin 10 RE_{Tbp}, in den mit 50 ng/ml TGF- β behandelten Präparaten 14 RE_{Tbp}. Apikal beträgt der mRNA-Gehalt von Prestin 8 RE_{Tbp} in den Kontrollen und zwischen 5 RE_{Tbp} und 8 RE_{Tbp} in den TGF- β -Gruppen, basal in den Kontrollen 5 RE_{Tbp} bzw. 6 RE_{Tbp} in den TGF- β -Gruppen. Um den angedeuteten konzentrationsabhängigen Einfluss von TGF- β auf die mRNA-Expression von Prestin besser darstellen zu können, wird in Tabelle 12 die Veränderung des mRNA-Gehalts der mit TGF- β behandelten Probe zur entsprechenden Kontrolle (unbehandelt, 48 h Kultur) als Vielfaches (n -fach_{Tbp}) dargestellt. Die Auswertung der Veränderung des mRNA-Gehalts von Prestin bestätigt den in den Absolutwerten (RE_{Tbp}) angedeuteten Anstieg unter dem Einfluss von 50 ng/ml TGF- β nicht.

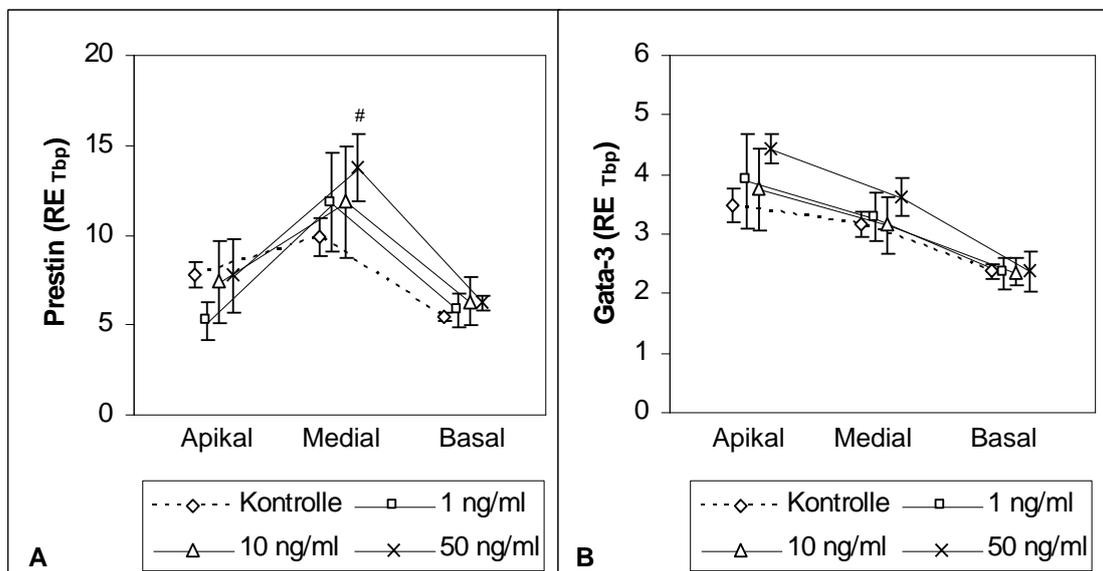


Abbildung 39: Einfluss von TGF- β auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM der mRNA-Expression bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) im apikalen medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs nach 48 Stunden Kultivierung. Kontrollen (n = 9), TGF- β (jeweils n = 3): 1 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml.

Der Gata-3-mRNA-Gehalt beträgt sowohl in den Kontrollen als auch in den mit TGF- β behandelten Präparaten im apikalen Fragment 4 RE_{Tbp}, im medialen Fragment 3 RE_{Tbp} bis 4 RE_{Tbp} und im basalen Fragment 2 RE_{Tbp}.

Tabelle 12: Einfluss von TGF- β auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.

Fragment	1 ng/ml TGF- β		10 ng/ml TGF- β		50 ng/ml TGF- β	
	Prestin	Gata-3	Prestin	Gata-3	Prestin	Gata-3
Apikal	1,0 \pm 0,6	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0
Medial	1,0 \pm 0,3	1,3 \pm 0,6	1,4 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	1,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1
Basal	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,5	1,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	1,1 \pm 0,4

Dargestellt sind MW \pm SD der Veränderung mRNA-Expression (in RE_{Tbp}) nach Behandlung mit TGF- β als Vielfaches der entsprechenden unbehandelten Kontrolle (n-fach_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultivierung (n = 2).

Die exogene Erhöhung der TGF- β -Konzentration hat in der organotypischen Kultur keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3.

4.3.6 Orientierende Untersuchungen zum Einfluss von Neurotransmittern

Die äußeren Haarzellen erhalten efferente Signale aus dem oberen Olivenkomplex. Diese efferente Innervation, vermittelt über den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh), führt zu einer Hyperpolarisation der ÄHZ und Hemmung der Amplifikation. Um einen eventuellen Einfluss von ACh bzw. Agonisten zu untersuchen, wurden eine Reihe von orientierenden Versuchen mit verschiedenem Versuchsaufbau durchgeführt: (1) Zusatz von ACh bzw. ACh-Agonisten zum Medium, (2) gleichzeitiger Zusatz von Strychnin und ACh, (3) Zusatz von ACh-Antagonisten. Desweiteren wurde der Einfluss eines α 1-adrenergen Rezeptor-Agonisten, dem Phenylephrin, geprüft. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen gemeinsam in Tabelle 13 (Seite 76) und Tabelle 14 (Seite 77) dargestellt.

Einfluss von ACh: Dem Kulturmedium wurde ACh in ansteigender Konzentration zugesetzt: 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M und anschließend für 48 Stunden kultiviert. Für die Beurteilung und Zählung der Haarzellen wurde je ein Cortisches Organ unter Standardbedingungen kultiviert und diente als Kontrolle. Das kontralaterale Cortische Organ wurde in Kulturmedium mit 100 μ M ACh kultiviert. Nach 48 Stunden in Kultur wurden die Präparate fixiert und mit Phalloidin gefärbt. Die Behandlung mit ACh hat keinen Einfluss auf die Struktur und die Anzahl der Haarzellen. Sowohl in den Kontrollen als auch in den mit ACh behandelten Präparaten befinden sich pro 100 μ m im apikalen Fragment etwa 9 innere und 36 äußere Haarzellen. Im medialen und basalen Fragment befinden sich in beiden Gruppen jeweils 10 innere Haarzellen. In den Kontrollen befinden sich medial und basal jeweils etwa 38 und in den ACh-Präparaten 36 äußere Haarzellen. Diese Differenz von äußeren Haarzellen zwischen beiden Gruppen, resultiert nicht aus dem Verlust von Haarzellen, wie die Zählung der Haarzell-Fehlstellen zeigt (Daten nicht

dargestellt). In beiden Gruppen finden sich keine signifikanten Verluste von inneren und äußeren Haarzellen.

Die Bestimmung des Prestin-Gehalts nach 48 Stunden in Kultur deutet einen Abfall der Prestin-Expression im apikalen und einen Anstieg im medialen Fragment unter dem Einfluss von ACh an. Die Expression der Gata-3-mRNA reagiert weniger ausgeprägt auf die Behandlung mit ACh (Tabelle 13). Durch den ACh-Zusatz scheint der Gata-2-mRNA-Gehalt im apikalen Fragment abzusinken, im medialen und basalen Fragment bleibt der Gata-2-mRNA-Gehalt hingegen unverändert. Die Expression von Gata-1 fällt, wie bereits beobachtet, *in vitro* stark ab. Die Streuung des Gata-1-mRNA-Gehalts ist sowohl in den ACh-Gruppen als auch in den Kontrollen sehr hoch. Es deutet sich im medialen Fragment bei einer Konzentration von 100 μM ein Abfall der Gata-1-Expression an (Tabelle 14). Zur besseren Darstellung der ACh-induzierten Veränderung der Expression von Prestin, Gata-3, Gata-2 und Gata-1 wurde die Expression nach 48 Stunden Kultur mit der in den entsprechenden Frisch-Präparaten (kontralaterales OC) verglichen. Der Prestin-mRNA-Gehalt steigt nach 48 Stunden Kultur mit ACh-Zusatz ähnlich wie in den Kontrollen an. Ebenso der mRNA-Gehalt der Gata-2 und Gata-3. Die Zugabe von ACh in die organotypische Kultur des Cortischen Organs hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Prestin, Gata-3, Gata-2 und Gata-1 ($n\text{-fach}_{\text{Tbp}}$; Tabelle 13, 14).

ACh und Strychnin: ACh wird rasch durch die Acetylcholin-Esterasen (AChE) gespalten und somit inaktiviert. Strychnin ist ein Hemmer der AChE. Um zu prüfen, ob ein Effekt der ACh-Behandlung in der organotypischen Kultur aufgrund der hohen AChE-Aktivität maskiert wurde, setzten wir dem Medium ACh und Strychnin zu. Ein OC diente der Kontrolle und enthielt 100 μM ACh, das kontralaterale OC enthielt ebenfalls 100 μM ACh und zusätzlich 10 nM ($n = 1$), 100 nM ($n = 2$) bzw. 500 nM ($n = 1$) Strychnin. Nach 48 Stunden Kultur wurde das Verhältnis der mRNA-Expression von Prestin und den Gata-Transkriptionsfaktoren der Strychnin-Probe zu jeweils dazugehörigen Kontrolle (Kontralaterales OC) bestimmt. Die Zugabe von Strychnin zum ACh-haltigen Medium hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Prestin-, Gata-3, Gata-2 und Gata-1 ($n\text{-fach}_{\text{Tbp}}$; Tabelle 13, 14).

Carbachol: Ein Struktur analogon des ACh, welches durch die Acetylcholinesterasen nur schlecht gespalten wird und somit eine höhere Halbwertszeit besitzt als das ACh ist Carbachol. Um zu prüfen, ob der fehlende Effekt der ACh-Behandlung Ausdruck einer zu geringen ACh-Konzentration an den Rezeptoren ist, untersuchten wir einen möglichen Carbachol-Effekt auf die Prestin- und Gata-mRNA-Expression. Für die orientierende Untersuchung wurde dem Kulturmedium 1 mM bzw. 10 mM Carbachol zugesetzt. Die RNA des einen OC wurde frisch präpa-

riert, die des kontralateralen OC nach 48 Stunden in Kultur. Der mRNA-Gehalt von Prestin, Gata-1, -2 und -3 streut stark. Im apikalen Fragment deutet sich ein Abfall und im medialen Fragment ein Anstieg der Prestin-mRNA-Expression unter dem Einfluss von Carbachol an. Der mRNA-Gehalt von Gata-3 und Gata-2 verändert sich nicht nach Carbachol-Zugabe. Die Gata-1-mRNA wird im OC auf sehr niedrigem Niveau mit einer starken Streuung exprimiert und ihre Expression fällt wie erwartet in der Kultur weiter ab. Carbachol hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Gata-1. Zusätzlich zum mRNA-Gehalt nach 48 Stunden Kultur, wurde die Veränderung der Expression von frisch nach 48 Stunden analysiert (n -fach_{Tbp}; Tabelle 13, 14). Die im mRNA-Gehalt nach 48 Stunden angedeuteten Expressionsveränderungen bestätigen sich nicht. Carbachol hat in der organotypischen Kultur der Cochlea der neugeborenen Ratte weder einen Einfluss auf die Expression von Prestin noch auf die der Gata-Transkriptionsfaktoren.

Phenylephrin: Phenylephrin gehört zur Gruppe der direkten Sympathomimetika mit teilweiser indirekter Wirkung und wirkt als Agonist am α_1 -adrenergen Rezeptor. Um einen möglichen Einfluss von Phenylephrin auf die Haarzellen und die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 zu untersuchen, wurde ein Cortisches Organ frisch und das kontralaterale nach 48 Stunden in Kultur mit Phenylephrin-haltigem Medium untersucht. Die Auswertung der fixierten und gefärbten Präparate zeigt keinen Unterschied zwischen den Phenylephrin-behandelten und unbehandelten Präparaten in der Anzahl, der Anordnung und der Morphologie der inneren und äußeren Haarzellen (Daten nicht dargestellt). Im apikalen Fragment der Phenylephrin-behandelten Präparate scheint der Prestin-mRNA-Gehalt niedriger zu sein als in den Kontrollen. Im medialen und basalen Fragment zeigt sich kein Unterschied. Der Gata-3- und Gata-2-mRNA-Gehalt verhält sich ähnlich. Im apikalen Fragment scheint die Gata-3- und Gata-2-mRNA-Expression unter dem Einfluss von Phenylephrin zu sinken. Die Phenylephrin-Zugabe hat keinen Einfluss auf die Gata-1-mRNA-Expression. Um den Einfluss von Phenylephrin auf die Expression von Prestin und den Gata-Transkriptionsfaktoren weiter zu untersuchen, analysierten wir die Veränderung der mRNA-Expression in der Kultur (n -fach_{Tbp}; Tabelle 13, 14). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Prestin-Expression im apikalen Fragment verdoppelt sich nach 48 Stunden Kultur sowohl in den Kontrollen als auch in den Phenylephrin-Gruppen. Im medialen Fragment steigt die Prestin-Expression etwa auf das 1,6fache und im basalen Fragment auf das 1,2fache. Die Gata-3-mRNA-Expression steigt im apikalen und medialen Fragment auf das 1,5fache und basal auf das 1,2fache. Die Gata-2-mRNA-Expression verändert sich *in vitro* unabhängig von der Phenylephrin-Zugabe. Die Expression der Gata-1-mRNA fällt während der Kultur unabhängig von der Phenylephrin-Zugabe ab. In der organotypischen Kultur der

Cochlea der neugeborenen Ratte hat Phenylephrin keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Prestin und den Gata-Transkriptionsfaktoren.

Einfluss von ACh-Antagonisten: Um die Wirkung von Neurotransmittern in der organotypischen Kultur der Cochlea der neugeborenen Ratte auf die Expression von Prestin sowie die der Gata-Transkriptionsfaktoren weiter zu charakterisieren, wurde ein möglicher Einfluss der Rezeptor-Blockade mittels Memantine untersucht. Memantine blockiert die Ca^{2+} -permeablen Glutamat- und nikotinergeren ACh-Rezeptoren an äußeren Haarzellen von drei bis sechs Wochen alten Ratten [84]. Um zu prüfen, ob Memantine die mRNA-Expression von Prestin beeinflusst, wurde dem Kulturmedium 10 μM bzw. 50 μM Memantine zugesetzt. Ein Cortisches Organ wurde frisch und das kontralaterale nach 48 Stunden in Kultur mit Memantine-haltigem Medium untersucht. Die Zugabe von Memantine hat keinen Einfluss auf die Struktur und die Anzahl der Haarzellen. Die orientierenden Versuche zeigen keinen signifikanten Unterschied der Prestin-Expression unter Memantine verglichen mit den Kontrollen (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 13: Einfluss von Neurotransmittern auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3.

Neurotransmitter	Prestin			Gata-3			
	Apikal	Medial	Basal	Apikal	Medial	Basal	
Kontrolle (n = 7)	RE _{Tbp}	20,9 ± 7,1	12,2 ± 2,2	7,1 ± 4,3	4,8 ± 0,8	3,0 ± 0,7	2,5 ± 0,7
	n-fach _{Tbp}	2,1 ± 0,6	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,8	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,5
ACh (n = 4)	10 μM	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,5	1,0 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,2
	50 μM	1,7 ± 0,4	2,1 ± 0,7	1,0 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,2 ± 0,5
	100 μM	2,0 ± 0,8	1,6 ± 0,5	0,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,8	1,1 ± 0,2
ACh° + Strychnin (n = 2)	10 nM	1,5	0,9	1,1	0,7	1,1	1,1
	100 nM	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,5	1,1 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2
	500 nM	1,4	0,9	0,9	1,2	1,0	0,9
Carbachol (n = 2)	1 mM	1,8 ± 0,6	2,0 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
	10 mM	3,4	1,5	2,3	2	1,5	1,7
Phenylephrin (n = 2)	1 μM	1,4 ± 0,0	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,4
	10 μM	2,5	1,5	0,8	1,6	1,3	1,2
	100 μM	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,1	1,9 ± 0,7	1,7 ± 0,3

Dargestellt sind MW ± Stabw. der Kontrolle in RE_{Tbp} und als Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) als Vielfaches in n-fach_{Tbp}, sowie MW ± Stabw. bzw. Einzelwerte der orientierenden Versuche der entsprechenden Probe des kontralateralen Cortischen Organs (in RE_{Tbp}). °... 100 μM ACh.

Tabelle 14: Einfluss von Neurotransmittern auf die mRNA-Expression von Gata-2 und Gata-1.

Neurotransmitter		Gata-2			Gata-1		
		Apikal	Medial	Basal	Apikal	Medial	Basal
Kontrolle (n = 6)	RE _{Tbp}	5,0 ± 1,6	2,6 ± 0,8	1,8 ± 0,9	0,11 ± 0,07	0,24 ± 0,26	0,06 ± 0,04
	n-fach _{Tbp}	2,0 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,21 ± 0,06	0,23 ± 0,10	0,09 ± 0,03
ACh (n = 4)	10 µM	1,5 ± 0,9	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,4	0,18 ± 0,13	0,33 ± 0,24	0,17 ± 0,12
	50 µM	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,59 ± 0,45	0,78 ± 0,61	0,34 ± 0,27
	100 µM	1,8 ± 0,6	1,7 ± 0,7	0,9 ± 0,2	0,21 ± 0,18	0,17 ± 0,07	0,06 ± 0,02
ACh° + Strychnin (n = 2)	10 nM	1,1	1,6	1,5	1,96	0,17	2,84
	100 nM	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,2	1,77 ± 0,64	1,14	2,89 ± 2,63
	500 nM	1,1	1,1	1	*	*	0,6
Carbachol (n = 2)	1 mM	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,14 ± 0,06	0,48 ± 0,66	0,17 ± 0,08
	10 mM	2,4	1,5	1,6	0,45	0,37	0,25
Phenylephrin (n = 2)	1 µM	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,9	0,8 ± 0,2	0,16 ± 0,11	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,01
	10 µM	2,8	2,1	0,8	0,25	0,21	0,12
	100 µM	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,6	1,3 ± 0,3	0,61 ± 0,71	0,10 ± 0,06	0,11 ± 0,03

Dargestellt sind MW ± Stabw. der Kontrolle in RE_{Tbp} und als Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) als Vielfaches in n-fach_{Tbp}, sowie MW ± Stabw. bzw. Einzelwerte der orientierenden Versuche der entsprechenden Probe des kontralateralen Cortischen Organs (in RE_{Tbp}). °...100 µM ACh. *...kein Probenmaterial

4.3.7 Einfluss depolarisierender Kaliumkonzentrationen

Um den Einfluss der Kalium-Depolarisation der Haarzellen auf die Prestin-mRNA-Expression zu untersuchen, wurde die Kaliumkonzentration des Kulturmediums mittels Kaliumchlorid-Zugabe verändert. Zunächst wurde eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Es wurden fünf Gruppen unterschiedlicher Konzentration definiert: Medium mit 5 mmol/l (Kontrolle), 10 mmol/l, 20 mmol/l, 35 mmol/l und 55 mmol/l. Alle Gruppen wurden für 48 Stunden kultiviert.

Ein Teil der Präparate wurde nach der Kultivierung fixiert und mit Phalloidin gefärbt, um die Haarzellen hinsichtlich ihrer Morphologie und Anzahl zu untersuchen. Die Haarzellen und deren Fehlstellen wurden jeweils im apikalen, medialen und basalen OC-Fragment pro 100 µm gezählt und als Median mit Angabe der 10er und 90er Perzentile ausgedrückt (Tabelle 15). Eine Erhöhung der Kaliumchlorid-Konzentration im Kulturmedium hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Haarzellen. Die Haarzellzählung in der Kontrollgruppe reproduziert die Ergebnisse der 48-Stunden-Kulturen (Kapitel 4.1.1, Seite 33) sowohl in der Anzahl der vorhandenen Haar-

zellen als auch in der Anzahl der Fehlstellen. Es finden sich vereinzelt Verluste von inneren Haarzellen und keine Verluste von äußeren Haarzellen. Eine Kaliumchlorid-Konzentration von 35 mmol/l schädigt die inneren, aber nicht die äußeren Haarzellen. Eine Endkonzentration von 55 mM wirkt sowohl auf die inneren als auch auf die äußeren Haarzellen zytotoxisch. Insgesamt zeigt sich, dass die inneren Haarzellen vulnerabler auf eine erhöhte Kaliumkonzentration reagieren als die äußeren Haarzellen und sich ein Gradient in der Anzahl der Fehlstellen von apikal nach basal bildet, mit zahlreicheren Defekten in den apikalen Regionen.

Tabelle 15: Einfluss von Kaliumchlorid auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs

HZ		Apikal	Medial	Basal
Kontrolle		n = 5	n = 6	n = 4
IHZ	Vorhanden	8,8 (7,2 - 9,6)	9,6 (4,8 - 10,4)	8,8 (8,0 - 10,4)
	Fehlstellen	0,0 (0,0 - 0,8)	0,8 (0,0 - 4,0)	0,0 (0,0 - 0,8)
ÄHZ	Vorhanden	35,2 (31,2 - 38,4)	36,0 (32,0 - 39,2)	36,0 (34,4 - 36,8)
	Fehlstellen	0,0 (0,0 - 2,4)	0,0 (0,0 - 1,6)	0,0 (0,0 - 0,8)
35 mM KCl		n = 3	n = 2	n = 2
IHZ	Vorhanden	9,6 (7,6 - 10,4)	9,6 (8,0 - 10,4)	10,0 (4,8 - 10,4)
	Fehlstellen	0,8 (0,0 - 1,6)	0,4 (0,0 - 1,6)	0,0 (0,0 - 3,2)
ÄHZ	Vorhanden	38,4 (36,0 - 40,8)	36,0 (33,6 - 37,6)	36,4 (34,4 - 38,4)
	Fehlstellen	0,0 (0,0 - 1,6)	0,0 (0,0 - 2,4)	0,0 (0,0 - 2,4)
55 mM KCl		n = 3	n = 3	n = 3
IHZ	Vorhanden	6,4 (4,0 - 9,6)	6,4 (4,0 - 9,6)	8,8 (4,4 - 9,6)
	Fehlstellen	3,2 (0,8 - 6,4)	2,4 (0,8 - 5,6)	0,8 (0,0 - 4,8)
ÄHZ	Vorhanden	33,6 (28,0 - 36,8)	36,8 (29,6 - 40,8)	35,6 (31,6 - 38,4)
	Fehlstellen	4,8 (1,6 - 7,2)	1,6 (0,0 - 6,4)	2,0 (0,4 - 4,8)

Anzahl der vorhandenen Haarzellen und der Fehlstellen pro 100 µm im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs nach 48 Stunden in Kultur. Dargestellt sind Median (10er - 90er Perzentile), sowie die Anzahl n der ausgewerteten Fragmente. IHZ...innere Haarzellen, ÄHZ...äußere Haarzellen. KCl...Kaliumchlorid.

In Abbildung 40 und Abbildung 41 sind die Ergebnisse der RT-PCR dargestellt. Abbildung 40 zeigt den Prestin- und Gata-3-mRNA-Gehalt im apikalen, medialen und basalen Cochlea-Fragment in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration. Abbildung 41 zeigt die Veränderung (n-fachTbp) der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression nach 48 Stunden Kultur, d.h. das Verhältnis des mRNA-Gehaltes des Zielgens nach 48 Stunden in Kultur bezogen auf den Gehalt im dazugehörigen Frischpräparat, ausgedrückt als Vielfaches des Ausgangswertes (frisch).

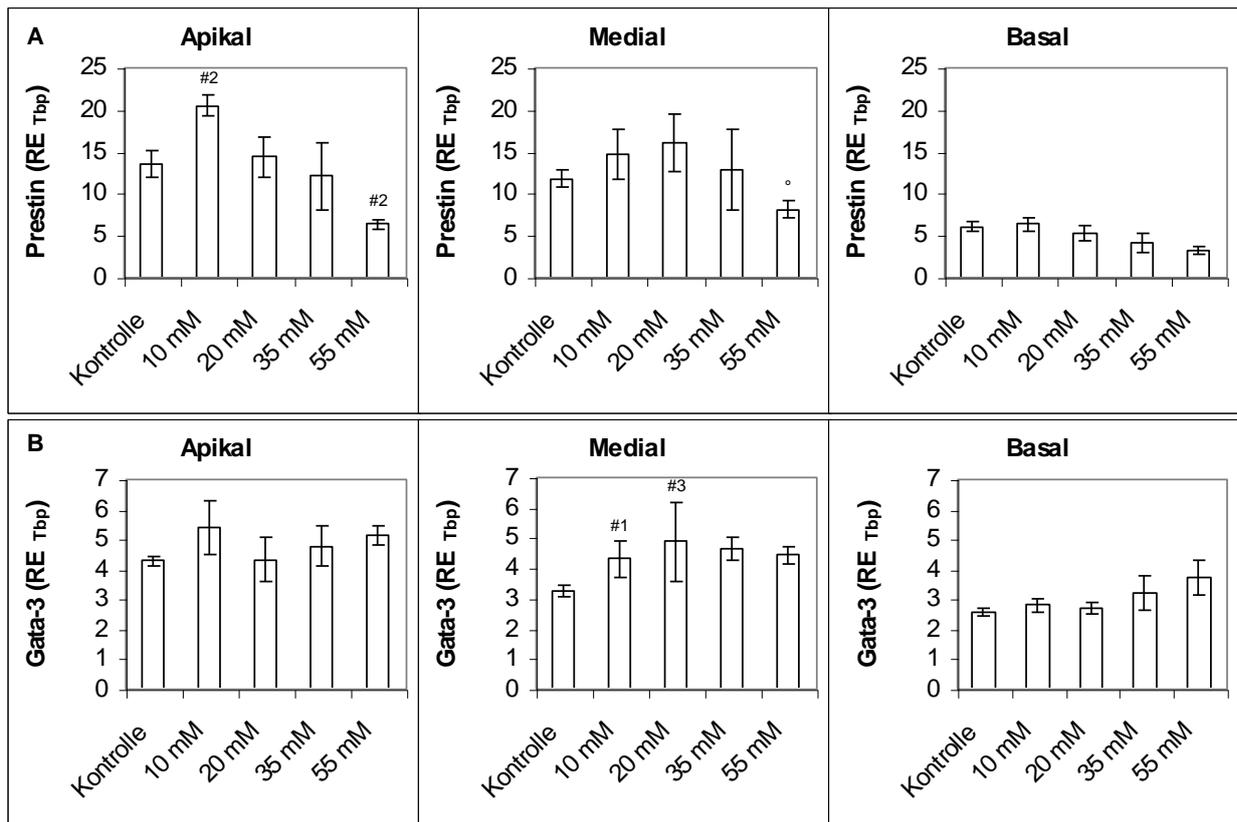


Abbildung 40: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM der Genexpression bezogen auf Tbp (RE_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment der Cochlea nach 48 Stunden in Kultur in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration: Kontrolle (5 mM, n = 25), 10 mM (n = 4), 20 mM (n = 5), 35 mM (n = 3) und 55 mM (n = 4) Kaliumchlorid. Signifikanz nach LSD-Test vs. Kontrolle: *...vs. Kontrolle: *¹...p < 0,005; *²...p < 0,01; *³...p = 0,05; °...p < 0,02 vs. 20 mM.

Die Expression der Prestin-mRNA wird von Kalium beeinflusst und zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit. Eine Erhöhung der Kalium-Konzentration bewirkt einen maximalen Anstieg des Prestin-mRNA-Gehaltes im apikalen Fragment von 13,6 RE_{Tbp} auf 20,5 RE_{Tbp} bei 10 mM und von 11,8 RE_{Tbp} auf 16,0 RE_{Tbp} bei 20 mM im medialen Fragment, während die Expression in den basalen Haarzellen keine Veränderung zeigt. Eine Erhöhung der Kalium-Konzentration auf 55 mM führt apikal zu einem Abfall der Prestin-mRNA auf 6,3 RE_{Tbp} . Im medialen und basalen Fragment deutet sich ebenfalls ein Abfall des Prestin-Gehaltes an. Im apikalen Fragment verändert sich die Prestin-Expression um den Faktor 1,8 in den Kontrollen, steigt auf maximal 2,4 bei 10 mM und fällt auf minimal 0,6 bei 55 mM. Im medialen Fragment beträgt der Faktor (frisch nach 48 Stunden Kultur) in der Kontrollgruppe 1,5 und hat mit 2,1 das Maximum bei 10 mM bis 20 mM, mit 0,9 das Minimum ebenfalls bei 55 mM. Im basalen Fragment ändert sich der Faktor kaum, er fällt von 1,2 in den Kontrollen auf minimal 0,6 bei 55 mM.

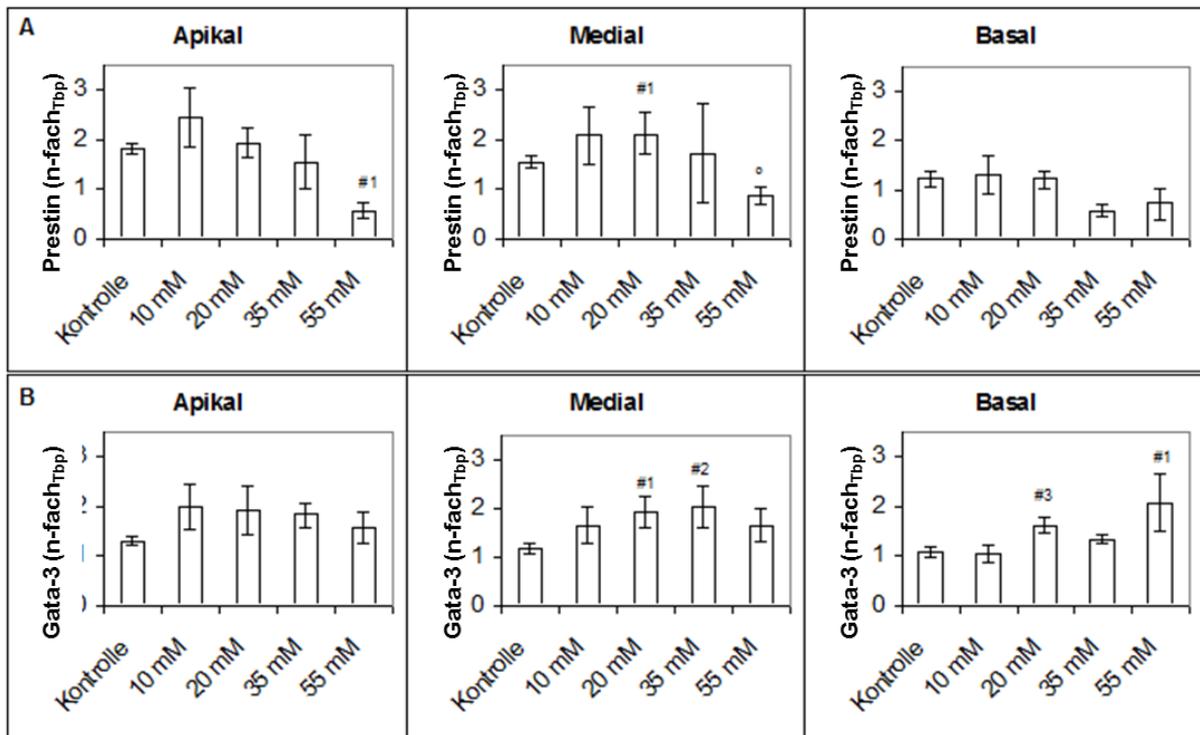


Abbildung 41: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs. A: Prestin. B: Gata-3. Dargestellt sind MW \pm SEM der Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) nach 48 Stunden Kultur als Vielfaches der entsprechenden frisch präparierten Probe (n-fach_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment der Cochlea in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration: Kontrolle (5 mM, n = 25), 10 mM (n = 4), 20 mM (n = 5), 35 mM (n = 3) und 55 mM (n = 4) Kaliumchlorid. Signifikanz nach LSD-Test vs. Kontrolle: *...vs. Kontrolle: *1...p < 0,001; *2...p < 0,005; *3...p = 0,02; °...p < 0,001 vs. 20 mM.

Unter dem Einfluss erhöhter Kalium-Konzentrationen deutet sich ein Anstieg der Gata-3-mRNA-Expression an. Die drei Fragmente reagieren von apikal nach basal sensitiver auf ansteigende Kalium-Konzentrationen. Im apikalen Fragment steigt der Faktor (frisch nach 48 Stunden Kultur) von 1,3 in der Kontrollgruppe auf maximal 2,0 bei 10 mM bis 20 mM, im medialen Fragment von 1,2 in den Kontrollen auf maximal 2,0 bei 20 mM bis 35 mM und im basalen Fragment von 1,1 in den Kontrollen auf maximal 2,1 bei 55 mM. Der GATA-3-mRNA-Gehalt steigt unter dem Einfluss von KCl vor allem im medialen Fragment an: von 3,3 RE_{Tbp} auf 4,9 RE_{Tbp} bei 20 mM bzw. 4,7 RE_{Tbp} bei 35 mM.

Die mRNA-Expression von Gata-1 und Gata-2 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Kaliumchlorid-Gruppen. Die Veränderung der Genexpression von frisch nach 48 Stunden in Kultur von Gata-1 und Gata-2 ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die Gata-1- und Gata-2-mRNA-Expression in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.

KCl-Konzentration	Gata-1			Gata-2		
	Apikal	Medial	Basal	Apikal	Medial	Basal
5 mM	0,15 ± 0,13	0,23 ± 0,19	0,11 ± 0,09	1,8 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,2
10 mM	0,15 ± 0,09	0,18 ± 0,08	0,12 ± 0,05	3,0 ± 2,1	1,7 ± 0,7	1,0 ± 0,8
20 mM	0,14 ± 0,06	0,31 ± 0,06	0,12 ± 0,15	1,9 ± 0,7	0,8 ± 0,5	1,9 ± 0,2
35 mM	0,07 ± 0,05	0,11 ± 0,12	0,09 ± 0,01	1,8 ± 0,7	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,6
55 mM	0,27 ± 0,10	0,16 ± 0,15	0,16 ± 0,06	1,4 ± 0,4	1,7 ± 0,8	1,6 ± 0,9

Dargestellt sind MW ± SD der Veränderung der Genexpression (in RE_{Tbp}) nach 48 Stunden Kultur als Vielfaches der entsprechenden frisch präparierten Probe (n-fach_{Tbp}) im apikalen, medialen und basalen Fragment der Cochlea in Abhängigkeit von der Kaliumchlorid-Konzentration: 5 mM (Kontrolle, n = 12), 10 mM (n = 4), 20 mM (n = 2), 35 mM (n = 3) und 55 mM (n = 4) Kaliumchlorid.

5. Diskussion

5.1 Methodische Aspekte der Untersuchung

5.1.1 Die organotypische Kultur der Cochlea

Vor- und Nachteile des Modells der organotypischen Kultur: In der vorliegenden Arbeit wurde die organotypische Kultur des Cortischen Organs der neugeborenen Ratte verwendet. Die organotypische Kultur der Cochlea ist ein klassisches experimentelles Modell in der Innenohrforschung mit Vor- und Nachteilen. Ein Vorteil gegenüber Einzelzellkulturen ist die *In-Vivo*-Bedingungen ähnelnde Zytoarchitektur des Gewebes. Der intakte Zellverband zwischen Stütz- und Haarzellen ermöglicht eine zelluläre Interaktion, welche von Bedeutung für die Entwicklung, Differenzierung, Adaptation, De- bzw. Regenerierung ist. Ein weiterer Vorteil ist die gute Diskriminierbarkeit der Haarzellen aufgrund ihrer typischen Lage innerhalb des Cortischen Organs. Die inneren und äußeren Haarzellen lassen sich von einander durch ihre typische Lage, Anordnung und Morphologie unterscheiden. Die organotypische Kultur der Cochlea ermöglicht eine direkte experimentelle Manipulation mittels Änderung von Kulturbedingungen und der Zusammensetzung des ernährenden Mediums. Ein Nachteil ist die mögliche mechanische und Hypoxie-bedingte Schädigung des Gewebes während der Präparation. Von Nachteil ist auch die Unreife der Cochlea. Es entsteht die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse, die mit neugeborenen Ratten gewonnen wurden, auf die adulte Ratte bzw. auf den Menschen. Letztlich kann die organotypische Kultur das Tierexperiment nicht ersetzen, wenn die gesamte Komplexität des Hörorgans untersucht werden soll.

Dauer der Kultur: Sowohl die Präparation als auch die Kultivierung bedeuten Schädigung und Stress für das Gewebe. Folgende Kriterien dienten uns als Parameter für die Intaktheit der organotypischen Kultur bei den Untersuchungen der Einflussfaktoren auf die Prestin-Expression: (1) Vitalität von mehr als 95 Prozent der Haarzellen am Ende der Kultur, (2) Anstieg der Prestin-mRNA-Expression in der Kultur. Nach einer Kulturdauer von 48 Stunden fand sich ein ausreichend hoher Anstieg der Prestin-mRNA-Expression, so dass für die Mehrzahl der Untersuchungen die 48-Stunden-Kultur eingesetzt wurde. Ziel war, bei möglichst kurzer Kulturdauer einen signifikanten Anstieg des Prestin-mRNA-Gehalts während der *In-Vitro*-Entwicklung zu erhalten.

Präparation: Es ist bekannt, dass die Präparation des Cortischen Organs unterschiedlich ausgeführt werden kann. Um eine über einen längeren Zeitraum lebende Kultur zu erhalten, muss möglichst atraumatisch und schnell präpariert werden. Wird die Präparation zügig ausge-

führt, ohne explizit auf die Spiralganglien zu achten, kommt es vor, dass sowohl Fragmente mit als auch solche ohne Spiralganglien vorliegen.

Bisher ist bekannt, dass die Denervierung mittels mechanischer Eliminierung der Neurone der Spiralganglien das Überleben der Haarzellen nicht beeinflusst [85]. Von uns wurde eine Degeneration der Nervenfasern in Präparaten, in denen die Spiralganglien vollständig entfernt wurden, beobachtet. Das zytoskelettale Strukturprotein Neurofilament reicherte sich perlschnurartig an. Unsere Untersuchungen bestätigen, dass eine Denervierung des Cortischen Organs keinen Einfluss auf das Überleben der Haarzellen hat. Werden die Spiralganglien entfernt, scheint es zu einem Anstieg des Gata-3-mRNA-Gehalts im medialen und angedeutet im basalen Fragment zu kommen, wobei die Prestin-mRNA-Expression nicht beeinflusst wird. Die Hochregulierung von Gata-3-mRNA werten wir als Stressreaktion [86]. Es gibt also Bedingungen bei denen eine Veränderung der Gata-3-Expression nicht immer zu einer Veränderung der Prestin-Expression führt.

5.1.2 Referenzgen

Vorraussetzung für die quantitative mRNA-Bestimmung ist ein stabiles Bezugssystem. Hierfür werden sogenannte Referenzgene oder der Gesamt-RNA-Gehalt benutzt. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA ist schwierig, wenn ihre Menge sehr gering ist. Außerdem wird der gesamte RNA-Gehalt in einem Präparat gemessen und dieser besteht nur zu einem geringen Prozentsatz (weniger als 5 Prozent) aus mRNA und überwiegend aus rRNA-Molekülen (85-90 Prozent) [87]. Es ist bekannt, dass bestimmte biologische Faktoren und Substanzen die Transkription der rRNA beeinflussen können. Derzeit ist die Verwendung von Referenzgenen als Bezugssystem die Methode der Wahl für die Normierung von mRNA [73;75]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Referenzgen-Methode zur relativen Quantifizierung der mRNA der Zielgene verwendet. Zusätzlich wurden in ausgewählten Versuchen beide Methoden, d.h. (1) der Bezug auf den Gesamt-RNA-Gehalt ausgedrückt in RE_{RNA} und (2) der Bezug auf das Referenzgen ebenfalls ausgedrückt in relativen Einheiten (RE_{Tbp}) miteinander verglichen. In allen Fällen, die geprüft wurden, ergab sich ein übereinstimmendes Ergebnis. Die Verwendung der Gapdh als Referenzgen ist weit verbreitet. In unserem Versuchsmodell erwies sich die Gapdh als ungeeignet, da sie durch die Kulturbedingungen hochreguliert wurde. Anstelle der Gapdh nutzten wir Tbp als Referenzgen [79]. Analysen zeigten, dass sich die mRNA-Expression von Tbp weder in der Kultur noch während der postnatalen Entwicklung signifikant verändert. Tbp wird in den drei Regionen des Cortischen Organs auf einem konstanten Niveau exprimiert.

5.1.3 Qualitätskontrolle

Die Untersuchungen zur Qualitätskontrolle zeigen, dass mit einem Tag zu Tag Fehler von etwa 15 bis 20 Prozent gerechnet werden muss. Dies ist für Untersuchungen der Genexpression mittels RT-PCR ein zu erwartender Wert, wenn man die geringen Probenmengen, die zeitliche Spanne und die interindividuelle Variation in Betracht zieht. Der unterschiedliche Variationskoeffizient für die einzelnen Gene hängt wahrscheinlich mit der Stabilität der entsprechenden mRNA und der Expressionshöhe zusammen.

Um die Zuverlässigkeit von Befunden zu prüfen, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verwendet: (1) Bestimmung der Veränderung der Genexpression während der Kultivierung (hierbei wird das OC eines Ohrs frisch untersucht und das OC des kontralateralen Ohrs nach der Kultivierung); (2) Vergleich des Expressionsmusters nach der Kultivierung (das OC des einen Ohrs wächst unter Kontrollbedingungen und das OC des anderen Ohrs dient der Prüfung des Einflusses eines ausgewählten Faktors bzw. einer ausgewählten Bedingung). Mit diesem Vorgehen wurde der Einfluss der interindividuellen Unterschiede, d.h. von Tier zu Tier, vermieden. Es kann davon ausgegangen werden, dass der intraindividuelle Unterschied, d.h. von einem Ohr zum kontralateralen, geringer ist als der interindividuelle von Tier zu Tier.

5.2 Vergleich der *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Entwicklung von Prestin und Gata-Transkriptionsfaktoren

Die molekularen Mechanismen, welche die Genexpression von Prestin regulieren, sind bisher noch weitgehend unbekannt. Die Expression von Prestin und dessen Inkorporation in die Plasmamembran beginnt postnatal und steigt im Laufe der Zeit gleichsinnig mit der Elektromotilität an [20].

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die Expression von Prestin-mRNA und von Prestin-Protein in der neugeborenen Ratte ansteigt. In dieser Arbeit wird gezeigt, (1) dass die Gata-3- und Gata-2-mRNA-Expression einen dem Prestin ähnlichen Apikal-Basal-Gradienten zeigt, der jedoch anders als bei Prestin bereits von Geburt an besteht, (2) dass im Gegensatz dazu Gata-1 keinen Gradienten von apikal nach basal zeigt, (3) dass die mRNA-Expression von Gata-3, Gata-2 und Gata-1 innerhalb der Segmente *in vivo* auf konstantem Niveau erfolgt. Dennoch besteht eine enge Korrelation zwischen der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3. Es bildet sich ein signifikanter Apikal-Basal-Gradient sowohl von Prestin-mRNA als auch von Prestin-Protein. Die *In-Vitro*-Untersuchungen reproduzieren den in früheren Arbeiten [21] gefundenen Anstieg der Prestin-mRNA-Expression in der 48-Stunden-Kultur. Anders

als *in vivo* steigen der Gata-3- und schwächer auch der Gata-2-mRNA-Gehalt *in vitro* an, während der Gata-1-mRNA-Gehalt absinkt. *In vitro* bildet sich ebenfalls ein Apikal-Basal-Gradient, der dem *in vivo* gefundenem Gradienten ähnelt.

Erstmalig wird eine starke Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt von Prestin und dem von Gata-3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. Es bestehen *in vitro* und *in vivo* auffallende Beziehungen zwischen der Prestin- und der Gata-3-mRNA-Expression: (1) Die mRNA-Expression von Gata-3- zeigt einen dem Prestin ähnelnden Apikal-Basal-Gradienten; (2) die Evaluation der Daten mittels Regressionsanalyse zeigt hohe Pearson Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen Gata-3 und Prestin.

Der *in vitro* und *in vivo* beobachtete parallele Apikal-Basal-Gradient von Prestin und Gata-3 kann Ausdruck eines regulatorischen Mechanismus sein. Er kann aber auch einfach Ausdruck morphologischer Eigenschaften der Haarzellen sein. Es ist bekannt, dass in jedem Entwicklungsstadium die apikalen Haarzellen länger sind und ein größeres Volumen haben als diejenigen im basalen Cochlea-Segment [88-90]. Angenommen dass die Haarzellen die Form eines Zylinders haben, kann ein Apikal-Basal-Gradient des Haarzellvolumens im Bereich von zwei errechnet werden. Dies könnte zwar den Apikal-Basal-Gradienten der Prestin-mRNA am zweiten, fünften und achten postnatalen Tag erklären, da das Prestin ausschließlich in den äußeren Haarzellen exprimiert wird, allerdings kann so kaum der Apikal-Basal-Gradient der Gata-3- und der Gata-2-mRNA erklärt werden, da das zelluläre Expressionsmuster von GATA-3-Protein weniger spezifisch ist. Die in der Literatur vorhandenen Daten zur Lokalisation von Gata-3 bzw. GATA-3 und deren Veränderung während der postnatalen Entwicklung bieten Grund zur Kontroverse. Rivolta und Holley [91] beobachteten eine selektive Abnahme der GATA-3-Färbung in den Haarzellen neugeborener Ratten. Van der Wees et al. [44] zeigten eine reichliche Gata-3-mRNA-Expression sogar im adulten Ohr. Sie berichten, dass die GATA-3-Expression in den Haarzellen erhalten ist und dass GATA-3 in verschiedenen angrenzenden Zellen ebenfalls exprimiert wird. GATA-LacZ wurde in Neuronen des Spiralganglions, in den äußeren und inneren Haarzellen und in verschiedensten Stützzellen, beispielsweise den Claudius-Zellen und den Pfeilerzellen, nachgewiesen. Unsere Daten aus RT-PCR und immunhistochemischer Färbung bestätigen das Vorkommen von Gata-3-mRNA und GATA-3-Protein in den Haarzellkernen von acht Tage alten Ratten, allerdings auf einem niedrigeren Niveau als am zweiten postnatalen Tag. Der beobachtete steile Apikal-Basal-Gradient des Prestin-mRNA-Gehalts, der ebenfalls in Meerschweinchen beobachtet wurde [27], führt uns zu der Annahme, dass die Regulationsmechanismen der Prestin-mRNA-Expression in den apikalen und basalen Regionen des Cortischen Organs verschieden sind.

Der Anstieg der Prestin-mRNA während der postnatalen Entwicklungsphase, der Anstieg in der Kultur und die Effekte der untersuchten Substanzen können nicht durch morphologische Veränderungen der Haarzellen erklärt werden. Während der Entwicklung zeigen die äußeren Haarzellen der apikalen und medialen Region eine Längenzunahme und eine Querschnittsabnahme, so dass keine morphologisch bedingten Änderungen des Volumens und des Prestin-Gehalts während der postnatalen Entwicklung angenommen werden können [89]. In unseren Experimenten änderte sich der Gata-3-mRNA-Gehalt während der postnatalen Entwicklung nicht, während er in der Kultur zunahm. Unabhängig davon bilden sich auffällig hohe Pearson Korrelationskoeffizienten zwischen Prestin und Gata-3 in allen Segmenten und innerhalb jeder einzelnen Segmentgruppe des Cortischen Organs, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über den zweiten postnatalen Tag hinaus. Die unterschiedliche Kinetik der Entwicklung von Prestin und Gata-3 bedeutet vermutlich, dass weitere oder andere Transkriptionsfaktoren an der frühen postnatalen Prestin-Entwicklung beteiligt sind. Jenseits des fünften postnatalen Tages liegt eine enge Parallelität von Prestin und Gata-3 vor. Möglicherweise wird in dieser Entwicklungsphase Gata-3 zum dominierenden Transkriptionsfaktor. Dies würde erklären, warum das mechanische Entfernen der Spiralganglien lediglich im medialen und basalen Fragment zum Anstieg der Gata-3-mRNA-Expression führt. Wahrscheinlich ist das apikale Fragment im Reifungsstadium hinter dem medialen und basalen Fragment, wodurch die Gata-3 eher in der medialen und basalen Cochleäreregion stressbedingt hochreguliert wird, während in der apikalen Region weitere bzw. andere Gene verändert sind.

Die signifikante Korrelation von Prestin und Gata-3 unter den gegebenen Versuchsbedingungen deutet daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor Gata-3 an der Regulation der Prestin-Expression beteiligt ist. Es stellt sich die Frage, wie GATA-3 die Prestin-Expression während der postnatalen Entwicklung aktivieren kann, wenn seine eigene Expression in den Haarzellen konstant bleibt. Basierend auf dem Verständnis des Transkriptionsmechanismus und der Struktur des Prestin-Promotors, scheint es nahe liegend zu sein, dass die Prestin-Expression multiple Transkriptionsfaktoren benötigt, z.B. GATA-3 und GATA-2 [58;77]. Der absolute Gehalt des Transkriptionsfaktors scheint nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein, wie das Konzept und die Befunde zu den sogenannten Transkriptionsmodulen belegen [92]. Die exponentielle Regression zwischen Prestin und Gata-3, sowie Gata-2, deutet daraufhin, dass verschiedene Prestin-Spiegel einen unterschiedlichen Gata-3- und Gata-2-Schwellenwert erfordern.

Gata-3 hat mutmaßlich einen doppelten Effekt auf die Prestin-Expression, was die Grundlage der starken Korrelation unter verschiedensten Bedingungen darstellen könnte. Der Promotor

von Prestin enthält mehrere Bindungsstellen für Gata-3. Die Existenz von mehreren RAR-, PPAR- und RXR-Response-Elementen in den Promotoren beider Gene stützt die Annahme, dass das parallele Expressionsmuster beider Gene durch nukleäre Transkriptionsfaktoren bewirkt wird [92]. Gata-3 scheint nicht ausschließlich über die Bindung von Response-Elementen des Zielgens zu agieren, sondern auch über Histon-Acetylierung und Chromatin-Umgestaltung. Beispielsweise induziert eine ektope Expression von Gata-3 eine Histon H3-Hyperacetylierung auf IL-4-, IL-13 und IL-5-assoziierten Nukleosomen [93]. Der differenzierte Effekt der Kalium-Depolarisation auf die Beziehung zwischen Gata-3 und Prestin deutet an, dass weitere Ko-Aktivatoren in die Regulation der Prestin-Expression involviert sind.

Letztlich zeigen unsere Ergebnisse, dass die organotypische Kultur des Cortischen Organs von neugeborenen Ratten gut geeignet ist für die Untersuchung von Faktoren, die die Prestin-Expression beeinflussen.

5.3 Einflussfaktoren auf die Expression von Prestin und Gata-3

5.3.1 Liganden von nukleären Transkriptionsfaktoren

L-Thyroxin: Es ist bekannt, dass die Schilddrüsenhormone die Expression von Prestin über Thyroid-Hormonrezeptoren regulieren. Diese Rezeptoren gehören zur Superfamilie der nukleären Hormon-Rezeptoren. *In-Vivo*-Versuche zeigten, dass Schilddrüsenhormone die Expression von Prestin beeinflussen [59]. Bisher existieren keine Daten darüber, ob Schilddrüsenhormone auch *in vitro* die Prestin-Expression beeinflussen. In unseren *In-Vitro*-Untersuchungen fanden wir einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von Prestin unter dem Zusatz von exogenem T₄. Gleichzeitig beobachteten wir einen Anstieg des Protein-Gehalts von Prestin in den äußeren Haarzellen. Unsere Befunde ähneln den *in vivo* gefundenen Ergebnissen. Somit scheint die organotypische Kultur des Cortischen Organs geeignet, um Einflüsse ausgewählter Faktoren auf die Prestin-Expression zu untersuchen. Parallel dazu konnte erstmals das Verhalten der Expression der Gata-Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Unter dem Einfluss von T₄ steigt der Gata-3-mRNA-Gehalt ähnlich dem von Prestin an. Gata-2 und Gata-1 hingegen verändern sich nicht. Der differenzierte Effekt von T₄ auf Gata-3 und Gata-2 deutet an, dass Gata-3 und Gata-2 unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich an der Prestin-Expression beteiligt sind.

Retinsäure: Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Retinsäure sowohl Gata-3 als auch Prestin direkt regulieren. Bereits eine Konzentration von 1 µM Retinsäure beeinflusst die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3. Dies klassifiziert beide Gene als Zielgene mit hoher

Sensitivität (Kategorie 2 nach Balmer und Blomhoff [94]). Die Autoren fanden weitere 105 Gene in dieser Kategorie, aber nur drei davon wurden herunter reguliert. Mehr als 50 Gene wurden identifiziert, die eine Rolle während des Wachstums, der Differenzierung und für das Überleben von Zellen des Innenohrs spielen [63;61]. Die vorliegenden Daten zeigen, dass der Retinsäure-Signalweg sowohl für die Embryonalperiode als auch später eine entscheidende Komponente darstellt. Die stärkere Reaktion im apikalen Fragment der Cochlea gegenüber dem medialen und dem basalen Fragment, könnte mit der Unreife des apikalen Fragmentes gegenüber dem medialen und basalen Fragment zusammenhängen.

Die Konzentration der Retinsäure scheint entscheidend für die Entwicklung und die Funktion des Innenohrs zu sein. Einerseits senkt ein Vitamin-A-Defizit die Geräuschsensitivität des Innenohrs [96], andererseits ist es möglich, die Regeneration von Haarzellen in der Kultur des Cortischen Organs von jungen Ratten durch Behandlung mit Retinsäure und TGF- α zu induzieren [97]. In einer bedingt unsterblichen Zelllinie führte die Behandlung mit Retinsäure zu einer Hochregulation von Myosin VIIa [98]. Kürzlich wurden zwei weitere Effekte der Retinsäure auf das Innenohr beschrieben, die potentiell in der Zukunft klinische Bedeutung erlangen könnten. Cochleäre Stammzellen, die im Cortischen Organ im Ruhezustand sind, erlangen Bedeutung für die Wiederherstellung von Zelltypen im Cortischen Organ [99]. Ferner wurde *in vitro* in Mäusen die Bedeutung der Retinsäure zusammen mit anderen Faktoren für die Differenzierung von Vorläuferzellen in Haarzellen und Neurone gezeigt. Desweiteren kann eine post expositionelle Behandlung mit Retinsäure Haarzellverluste und Hörschädigung in Mäusen mit permanenter Lärm induzierter Reizschwellenverlagerung reduzieren [100]. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten an, dass Retinsäure-Konzentrationen im μM -Bereich die Prestin-Expression beeinflussen kann.

Eine wichtige Voraussetzung für die Effekte der Retinsäure auf die Zielgene ist die Existenz von Bindungsstellen im Zielgen. Retinsäure bindet an zwei Klassen von nukleären Rezeptor-Proteinen, den Retinoic-acid-Rezeptoren (RAR) und den Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), und vermittelt über diese seine Effekte auf die DNA. Die aktive Form der RAR- und RXR-Rezeptor-Proteine sind RAR:RXR-Heterodimer-Komplexe, welche an sogenannte Retinoic-acid-Response-Elemente (RARE) oder Retinoid-X-Response-Elemente (RXRE) binden und so die Gen-Transkription modulieren [95].

Das Vorhandensein von Bindungsstellen für einen bestimmten Transkriptionsfaktor im Promotor des Zielgens zeigt eine potentielle Rolle dieses Transkriptionsfaktors für die Regulation des Zielgens. *In-Silico*-Analysen zeigen, dass die Promotorregionen von Prestin und auch

GATA-3 verschiedene RAR- und RXR-Bindungsstellen enthalten. Das Prestin-Molekül besitzt 3 putative Promotorregionen [92]. Im Prestin Promotor Set 3 (PS3) wurden sowohl RARE als auch TRE (Thyroid-Response-Elemente) nachgewiesen. Im Prestin PS3 der Ratte wurden 2 putative GATA-3,-2 Bindungsstellen identifiziert. Im GATA-3 Promotor wurden ebenfalls RARE und TRE Bindungsstellen identifiziert, allerdings sind diese heterogen verteilt.

Nukleäre Rezeptoren erkennen meist ein breiteres Spektrum an Hormon-Response-Elementen (HRE) als von mathematischen und *In-Vitro*-Modellen gefunden werden [119]. Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren ist komplex und beinhaltet auch funktionale heterodimere Komplexe zwischen RARs und THR_s [120]. Es bleibt offen, ob die identifizierten Bindungsstellen in den Promotorregionen die entsprechenden Transkriptionsfaktoren binden und funktionelle Bedeutung haben.

Die hydrophobe Retinsäure wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO ist ein weitverbreitetes Lösungsmittel und wird häufig in Studien zum Innenohr verwendet. Trotz alledem sind seine potentiellen Neben- und Wechselwirkungen bisher weitgehend unbekannt. DMSO ist ein Hydroxylradikal-Fänger und es ist möglich, dass DMSO in geringen Konzentrationen protektive Wirkung in Cochlea-Kulturen hat [101]. Studien zu den zytotoxischen Effekten von DMSO zeigen, dass DMSO-Konzentrationen unter 1 Prozent in der organotypischen Kultur der embryonalen Cochlea nicht zu Haarzellverlusten oder -schäden führen. Dagegen fanden Qi et al. [102] ab einer DMSO-Konzentration von 0,5 Prozent zunehmend Schäden an den inneren Haarzellen und ab 0,75 Prozent DMSO Schäden an den äußeren Haarzellen in der basalen Region der Cochlea. In unseren Untersuchungen fanden wir in den mit 0,01 Prozent bis 1 Prozent DMSO behandelten Präparaten keinen signifikanten Anstieg von Haarzellschäden bzw. -verlusten. Die Abwesenheit von DMSO-induzierten Schäden kann durch die Zugabe von IGF begründet sein, welches die Haarzellen vor Schäden schützt, indem es Apoptose und Nekrose induzierende Prozesse reduziert [67].

Gemfibrozil: In der vorliegenden Arbeit wird Gemfibrozil als Substanz ausgewählt, die primär die Gata-3-Expression verändert [64] und um damit zu prüfen, ob und inwieweit auch die Prestin-Expression verändert wird. Das lipidsenkende Fibrat Gemfibrozil ist ein Aktivator des Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Rezeptors alpha (PPAR- α). Jüngst wurde gezeigt, dass PPARs, PPAR- α und PPAR- γ , GATA-3 in verschiedenen Zelltypen des Immunsystems negativ regulieren. Gemfibrozil erhöht die GATA-3-Bindungsaffinität [64]. In unserem Modell induziert es nicht, sondern inhibiert eher die Gata-3- und Prestin-Expression.

5.3.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren wie das IGF und TGF- β haben allgemeine Wirkungen auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen und Geweben. Die vorliegenden Daten zeigen, dass weder IGF noch TGF- β in die spezifische Regulation des Prestin-Proteins bzw. dessen mRNA-Expression involviert sind.

5.3.3 Neurotransmitter

Die äußeren Haarzellen (ÄHZ) werden vorwiegend efferent, mit Acetylcholin (ACh) als Neurotransmitter, innerviert. ACh aktiviert die cholinergen Rezeptoren der ÄHZ und induziert so einen Calcium-Einstrom, dem ein großer Kalium-Ausstrom über nahegelegene Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle folgt. Durch den K⁺-Ausstrom wird die Zelle hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation der ÄHZ ist der schnelle inhibitorische Effekt der efferenten Aktion.

In unseren Untersuchungen zum Einfluss von ACh auf die Expression von Prestin-mRNA wurde die organotypische Kultur der Cochlea von drei bis fünf Tage alten Ratten genutzt. Nach 48 Stunden Kultur fanden wir keinen ACh-Effekt auf die Entwicklung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3.

Neben der Identifizierung des AChR in reifen ÄHZ und der Charakterisierung der ACh-induzierten Membranströme, gelang es He und Dallos [18], das im Laufe der Entwicklung erste Auftreten von auswärts gerichteten Membranströmen zu detektieren. In ihren elektrophysiologischen Untersuchungen an ÄHZ der neugeborenen Wüstenrennmaus konnten sie einen geringen ACh-induzierten Auswärtsstrom erst bei sechs Tage alten Tieren messen. Etwa 12 Prozent der ÄHZ antworteten auf den ACh-Reiz. Mit zunehmendem Alter stiegen der Anteil der antwortenden ÄHZ und die Stärke des Auswärtsstroms. Nach dem elften Lebenstag antworteten vergleichbar viele ÄHZ wie in adulten HZ-Kulturen, ebenso war die Membranstromstärke vergleichbar. Die funktionelle Reifung des AChR der ÄHZ vollzieht sich demzufolge zwischen dem sechsten und zwölften Tag nach der Geburt. Es konnte gezeigt werden, dass die $\alpha 9$ -Untereinheit des AChR bereits vor der Geburt exprimiert wird und die Expression in sich entwickelnden Ratten und Mäusen zwischen dem sechsten und zwölften Tag nach der Geburt den Höchstwert erreicht. Es scheint, dass sich die AChR der ÄHZ unabhängig von einer efferenten Innervation entwickeln. Die Entwicklung der ACh-induzierter Reaktionen scheint gleichzeitig mit der Entwicklung der Haarzellmotilität zu verlaufen, jedoch vor dem Einsetzen der auditorischen Funktion [18;103].

Ein Blocker der nAChR ist das Memantin. Neben den nAChR blockiert es die Ca²⁺-permeablen Glutamat-Rezeptoren. In Untersuchungen an äußeren Haarzellen von drei bis sechs

Wochen alten Ratten konnten diese inhibitorischen Effekte gezeigt werden [84]. Im Gegensatz dazu fanden wir in unseren Untersuchungen an ÄHZ von drei bis fünf Tage alten Ratten keinen Einfluss von Memantine auf die Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression.

Der fehlende Effekt der Behandlung mit ACh bzw. einem AChR-Blocker in unseren Versuchen könnte Ausdruck einer Unreife der ACh-Rezeptoren sein.

5.3.4 Hohe Kaliumkonzentration

Massive Änderungen in der K^+ -Konzentration haben möglicherweise einen toxischen Effekt auf die Strukturen der Cochlea [113]. Die Endolymphe, die die Scala media füllt, besitzt eine auffallend hohe (extrazelluläre) Kaliumkonzentration von etwa 150 mM, wodurch sich gegenüber den übrigen Extrazellulärräumen, wie der Scala vestibuli und der Scala tympani, ein positives elektrisches Potential von etwa + 85 mV ausbildet, das endocochleäre Potential. Die Haarzellen besitzen ein Ruhemembranpotential von etwa – 40 mV (IHZ) bis – 70 mV (ÄHZ). Die endolymphatische und die intrazelluläre Kaliumkonzentration (etwa 140 mM) gleichen sich, so dass sich über der apikalen Haarzellmembran ein Gleichgewichtspotential von 0 mV errechnet. Die treibende Kraft für den depolarisierenden Kaliumstrom in die Haarzellen während des Transduktionsvorgangs stellt demnach die elektrische transmembranale Potentialdifferenz von etwa 125 mV (IHZ) bis 155 mV (ÄHZ) dar. Die apikal einströmenden Kaliumionen verlassen die Haarzelle über kaliumspezifische Ionenkanäle in der basolateralen Membran. Die Kaliumionen werden von den Stützzellen wahrscheinlich über einen Kalium-Chlorid-Kotransport aufgenommen und dann aktiv in die Stria vascularis transportiert [30]. Die Funktion des spannungsgesteuerten Prestins ist vom transmembranen Potential der basolateralen Membran der äußeren Haarzelle abhängig. Ist die Ionenhomöostase gestört, kann ein Zusammenbruch des endocochleären Potentials und damit eine Hörstörung resultieren. Es ist bekannt, dass Funktionsstörungen der Kanäle zur Innenohrschwerhörigkeit führen [31].

Der Einfluss von hohen Kaliumkonzentrationen kann als langanhaltende Depolarisation der äußeren Haarzellen und damit als langanhaltende Aktivierung der äußeren Haarzellen interpretiert werden. Unsere Untersuchungen zeigen, dass der Anstieg des Prestin-mRNA-Gehalts in der organotypischen Kultur von der Kaliumkonzentration des Mediums beeinflusst wird. Kalium-Konzentrationen um 35 mM inhibieren den Kultur-induzierten Prestin-Anstieg. Steigt die Kalium-Konzentration auf 55 mM, kommt es zum Abfall des Prestin-Gehalts. Es stellt sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Konzentrations-abhängigen Prestin-Modulation durch erhöhte Kalium-Konzentrationen. Bei einer auf 30 mM erhöhten extrazellulären Kalium-Konzentration sinkt das Membranpotential auf etwa -30 mV [104]. Verschiedene bisher unter-

suchte Mechanismen antworten mittels Transkriptionsveränderungen auf die Zelldepolarisation [105;106]:

- Proteinkinase A abhängige Aktivierung (Phosphorylierung) von CREB. Sowohl Prestin als auch Gata-3 enthalten eine cAMP-Response-Element-Sequenz (CRE), an welche CREB binden kann. Das cAMP-Response-Element-bindende Protein (CREB) ist ein gut untersuchter Transkriptionsfaktor, der spezifisch an eine cAMP-Response-Element-Sequenz (CRE), eine spezifische Nukleotid-Sequenz im Promotor verschiedener Gene, bindet und so eine verstärkte Transkription bedingt.
- Die Aktivierung von CREB kann auch über Calcium mittels Calmodulin Kinase IV erfolgen.
- Calcium-Einstrom kann Fos und Jun, beides Mitglieder des AP-1-Komplex, aktivieren, die ihrerseits die Transkription aktivieren.
- Es wurde gezeigt, dass das Calcium-Ionophor Ionomycin, welches Calcium durch biologische Membranen transportiert, ebenso wie das Ionomycin lösende DMSO die Elektromotilität beeinflusst [107]. Ob diese Effekte mit Transkriptions- oder Posttranslationsveränderungen assoziiert waren, wurde nicht untersucht.

Unabhängig von den Effekten der Kalium-induzierten Depolarisation könnten Osmolaritäts- oder Chloridkonzentrationsveränderungen die Expression von Prestin beeinflussen [108;109].

5.4 **Schlußfolgerung und Bedeutung der Untersuchungen**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die organotypische Kultur des Cortischen Organs der neugeborenen Ratte gut geeignet ist, die Effekte von Substanzen und Bedingungen auf die Genexpression von Prestin zu untersuchen. Damit steht ein einfaches Modell zur Untersuchung von Mechanismen der Expression des Motorproteins Prestin zur Verfügung. Die organotypische Kultur hat beispielsweise gegenüber gentechnisch veränderten Zellen den Vorteil, dass die Struktur und das Zusammenwirken der einzelnen Zellgruppen erhalten sind. Ein möglicher Nachteil ist die Unreife des Gewebes. Daher muss in jedem Einzelfall untersucht werden, ob die gefundenen Gesetzmäßigkeiten auch im adulten Organismus nachweisbar sind.

Gata-3 und Gata-2 sind Transkriptionsfaktoren, deren Expression eng mit der des Prestins korrelieren. Damit sind Substanzen und Bedingungen, die die Transkriptionsfaktoren Gata-3 und Gata-2 beeinflussen auch potentielle Faktoren für die Expressionsveränderung von Prestin. Hierzu gehören beispielsweise immunologische Erkrankungen. Gata-3 ist ein Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Regulation von TH2 und TH1 Zellen [45].

Der Einfluss von T₄, Retinsäure und Gemfibrozil auf die Gata-3- und Prestin-Expression zeigt, dass die Gruppe der nukleären Transkriptionsfaktoren in die Prestin-Expression involviert ist. Bei Anwendung von auf dieser Ebene wirkenden Pharmaka ist zu prüfen, inwieweit eine Beeinträchtigung des Hörvermögens bzw. Tinnitus vorliegt. Die Tatsache, dass T₄ die Prestin-Expression erhöht, Retinsäure und Gemfibrozil die Prestin-Expression vermindern, zeigt, dass die potentielle Möglichkeit besteht, die Expression von Prestin zu modulieren. In Zukunft könnte ein solcher Ansatz Bedeutung erlangen, um z.B. bestimmte Formen von Hörstörungen bzw. Tinnitus, die in Zusammenhang mit Veränderungen der Prestin-Expression stehen, gezielt behandeln zu können. Der Motortinnitus (nach Zenner [110]) könnte eine Störung sein, für die in Zukunft solche Verfahren Bedeutung erlangen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zu Effekten der Neurotransmitter, ACh und Phenylophrin, tragen orientierenden Charakter. Es ist gut möglich, dass unsere organotypische Kultur der Cochlea der neugeborenen Ratte, wegen der Unreife und der noch verminderten Expression der entsprechenden Rezeptoren für eine Untersuchung der Effekte von ACh und adrenergen Substanzen nicht geeignet ist. Es ist aber auch möglich, dass andere Neurotransmitter wie Glutamat, Dopamin oder GABA Einfluss auf die Prestin-Expression haben. Die Regulation der Prestin-Aktivität erfolgt nicht nur auf der Transkriptions- und Translationsebene sondern auch auf der Posttranslationsebene. Prozesse wie die Phosphorylierung von Aminosäuren des Prestins

haben Einfluss auf die Aktivität und Elektromotilität. Es ist möglich, dass der Einfluss von Neurotransmittern auf der Posttranslationsebene erfolgt.

Eine besondere Bedeutung für die Zukunft könnten die vorliegenden Befunde zur Beeinflussung der Prestin-Expression durch erhöhte Kaliumkonzentrationen erhalten. Sie lassen sich so interpretieren, dass eine chronische Aktivierung der äußeren Haarzellen zur Verminderung der Prestin-Expression führt. Schalleinwirkungen, die nicht primär mit einem Untergang von äußeren Haarzellen einhergehen, könnten zu einer verminderten Prestin-Expression führen und damit Bestandteil der Hörstörungen sein, wie sie bei chronischer Lärmeinwirkung beschrieben sind.

6. Zusammenfassung

Die Sensitivität des Hörorgans von Menschen und Säugetieren ist stark von der Funktion der äußeren Haarzellen im Cortischen Organ abhängig. Sie amplifizieren die Geräusch-induzierten Vibrationen der Basilarmembran. Ihre Elektromotilität beruht auf dem Vorhandensein von Prestin, einem Protein das stark und exklusiv in der lateralen Wand der äußeren Haarzelle exprimiert wird. Die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Regulation der Prestin-Expression und deren Wirkmechanismen erfordert ein experimentelles Modell. Frühere Untersuchungen zeigen, dass die Prestin-Expression in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs der neugeborenen Ratte ähnlich wie *in vivo* erfolgt. Weiterhin ist bekannt, dass Hypoxie und Impulslärm die Expression von Prestin auf der mRNA-Ebene beeinflussen. Basierend auf der Assoziation von GATA-3-Mutationen und Hörverlust im Rahmen des HDR-Syndroms (Hypoparathyreodismus, Hörverlust, renale Dysplasien) und der Rolle, die die GATA-Transkriptionsfaktoren während der Innenohrentwicklung spielen, postulierten wir eine Beteiligung der GATA-Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der mRNA-Expression von Prestin. Hierzu wurde die mRNA-Expression von Gata-3, Gata-2 und Gata-1 parallel zu der von Prestin während der frühen postnatalen Entwicklungsphase und in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs von neugeborenen Ratten untersucht. Die Untersuchung der Genexpression erfordert ein geeignetes Bezugssystem; daher wurde die Eignung von TATA-Box-Binde-Protein (Tbp) als Referenzgen geprüft.

Die Ergebnisse der methodischen Untersuchungen zeigen, dass die organotypische Kultur des Cortischen Organs von neugeborenen Ratten gut geeignet ist für die Untersuchung von Faktoren, die die Prestin-Expression beeinflussen. Tbp ist *in vitro* und *in vivo* als Referenzgen geeignet ist.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen bemerkenswerte Beziehungen zwischen Prestin und Gata-3 bzw. Gata-2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro*: (1) Die mRNA-Expression von Gata-3 und Gata-2 zeigt einen dem Prestin ähnlichen Apikal-Basal-Gradienten. (2) Die mRNA-Expression von Gata-3 und Gata-2 steigt in der organotypischen Kultur an, während sie *in vivo* unverändert bleibt. Die Prestin-mRNA-Expression steigt vom zweiten bis zum achten postnatalen Tag um den Faktor 4 im apikalen und medialen Segment und um den Faktor 2 im basalen Segment. Die Korrelation zwischen Prestin- und Gata-3-mRNA-Gehalt ist hoch signifikant. (3) Unter dem Einfluss von L-Thyroxin, Retinsäure und Gemfibrozil konnten parallele Veränderungen im mRNA-Gehalt von Prestin und Gata-3 beobachtet werden. In ihrer Gesamtheit betrach-

tet, bekräftigen die vorliegenden Ergebnisse eine regulatorische Rolle von Gata-3 für die Prestin-Expression. Unsere Ergebnisse zeigen, dass T₄ auch *in vitro* die Prestin-Expression beeinflusst. Weiterhin beobachteten wir einen Abfall der Prestin-mRNA-Expression nach zwei Tagen Kalium-induzierter Depolarisation (55 mM). In der organotypischen Kultur hatten weder die Wachstumsfaktoren IGF und TGF- β noch die untersuchten Neurotransmitter bzw. die adrenerge Substanz einen Einfluss auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-Transkriptionsfaktoren.

In Anbetracht der engen Korrelation von Prestin- und Gata-3- bzw. Gata-2-mRNA-Expression stellen Substanzen und Bedingungen, die die Transkriptionsfaktoren Gata-3 und Gata-2 beeinflussen, auch potentielle Faktoren für die Expressionsveränderung von Prestin dar. So sollte geprüft werden, inwieweit Hörstörungen im Rahmen von bestimmten (Gata-3-assoziierten) immunologischen Erkrankungen auftreten. Außerdem muss geprüft werden, ob die Anwendung von T₄, Retinsäure oder Gemfibrozil das Hörvermögen moduliert. Es ist gut möglich, dass eine chronische Lärmbelastung nicht ausschließlich zum Verlust von äußeren Haarzellen führt, sondern auch zu einer Verminderung der Prestin-Expression. Die vorliegenden Ergebnisse beziehen sich auf die *In-Vivo*-Entwicklung und die organotypische Kultur von neugeborenen Ratten. Ihre Aussagen bedürfen der Überprüfung der Ergebnisse in adulten Tieren, um Schlußfolgerungen für die Medizin zu ziehen.

Literaturverzeichnis

1. Dallos,P., The active cochlea, *J. Neurosci.*, 12 (1992) 4575-4585.
2. Fettiplace,R. and Hackney,C.M., The sensory and motor roles of auditory hair cells, *Nat. Rev. Neurosci.*, 7 (2006) 19-29.
3. Robles,L. and Ruggero,M.A., Mechanics of the mammalian cochlea, *Physiol Rev.*, 81 (2001) 1305-1352.
4. Dannhof,B.J. and Bruns,V., The innervation of the organ of Corti in the rat, *Hear. Res.*, 66 (1993) 8-22.
5. Dallos,P., Cochlear amplification, outer hair cells and prestin, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 18 (2008) 370-376.
6. Sobkowicz,H.M., August,B.K. and Slapnick,S.M., Synaptic arrangements between inner hair cells and tunnel fibers in the mouse cochlea, *Synapse.*, 52 (2004) 299-315.
7. Fuchs,P.A., Time and intensity coding at the hair cell's ribbon synapse, *J. Physiol.*, 566 (2005) 7-12.
8. Glowatzki,E., Grant,L. and Fuchs,P., Hair cell afferent synapses, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 18 (2008) 389-395.
9. Meyer,A.C., Frank,T., Khimich,D., Hoch,G., Riedel,D., Chapochnikov,N.M., Yarin,Y.M., Harke,B., Hell,S.W., Egner,A. and Moser,T., Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea, *Nat. Neurosci.*, 12 (2009) 444-453.
10. Meyer,J. and Gummer,A.W., [Physiological effects of destruction of the tip links of cochlear hair cells. Significance for noise-induced hearing loss], *HNO*, 48 (2000) 383-389.
11. Nowotny,M. and Gummer,A.W., [Electromechanical transduction: influence of the outer hair cells on the motion of the organ of Corti], *HNO.*, 54 (2006) 536-543.
12. Ashmore,J., Cochlear outer hair cell motility, *Physiol Rev.*, 88 (2008) 173-210.
13. Dallos,P. and Fakler,B., Prestin, a new type of motor protein, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3 (2002) 104-111.
14. Mio,K., Kubo,Y., Ogura,T., Yamamoto,T., Arisaka,F. and Sato,C., The motor protein prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 1137-1145.
15. Sinha,G.P., Sabri,F., Dimitriadis,E.K. and Iwasa,K.H., Organization of membrane motor in outer hair cells: an atomic force microscopic study, *Pflugers Arch.*, 459 (2010) 427-439.
16. Dallos,P., Zheng,J. and Cheatham,M.A., Prestin and the cochlear amplifier, *J. Physiol.*, 576 (2006) 37-42.

17. Schaechinger,T.J. and Oliver,D., Nonmammalian orthologs of prestin (SLC26A5) are electrogenic divalent/chloride anion exchangers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.*, 104 (2007) 7693-7698.
18. He,D.Z. and Dallos,P., Development of acetylcholine-induced responses in neonatal gerbil outer hair cells, *J. Neurophysiol.*, 81 (1999) 1162-1170.
19. Fuchs,P., The synaptic physiology of cochlear hair cells, *Audiol. Neurootol.*, 7 (2002) 40-44.
20. Belyantseva,I.A., Adler,H.J., Curi,R., Frolenkov,G.I. and Kachar,B., Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells, *J Neurosci*, 20 (2000) 1-5.
21. Gross,J., Machulik,A., Amarjargal,N., Fuchs,J. and Mazurek,B., Expression of prestin mRNA in the organotypic culture of rat cochlea, *Hear. Res.*, 204 (2005) 183-190.
22. Judice,T.N., Nelson,N.C., Beisel,C.L., Delimont,D.C., Fritzsche,B. and Beisel,K.W., Cochlear whole mount in situ hybridization: identification of longitudinal and radial gradients, *Brain Res Brain Res Protoc.*, 9 (2002) 65-76.
23. Liberman,M.C., Gao,J., He,D.Z., Wu,X., Jia,S. and Zuo,J., Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier, *Nature.*, 419 (2002) 300-304.
24. Cheatham,M.A., Huynh,K.H., Gao,J., Zuo,J. and Dallos,P., Cochlear function in Prestin knockout mice, *J. Physiol.*, 560 (2004) 821-830.
25. Dallos,P., Wu,X., Cheatham,M.A., Gao,J., Zheng,J., Anderson,C.T., Jia,S., Wang,X., Cheng,W.H., Sengupta,S., He,D.Z. and Zuo,J., Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification, *Neuron.*, 58 (2008) 333-339.
26. Henderson,D., Bielefeld,E.C., Harris,K.C. and Hu,B.H., The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss, *Ear Hear.*, 27 (2006) 1-19.
27. Mazurek,B., Haupt,H., Amarjargal,N., Yarin,Y.M., Machulik,A. and Gross,J., Up-regulation of prestin mRNA expression in the organs of Corti of guinea pigs and rats following unilateral impulse noise exposure, *Hear. Res.*, 231 (2007) 73-83.
28. Cazals,Y., Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate, *Prog. Neurobiol.*, 62 (2000) 583-631.
29. Williams,S.E., Zenner,H.P. and Schacht,J., Three molecular steps of aminoglycoside ototoxicity demonstrated in outer hair cells, *Hear. Res.*, 30 (1987) 11-18.
30. Mistrik,P. and Ashmore,J., The role of potassium recirculation in cochlear amplification, *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 17 (2009) 394-399.

31. Kharkovets,T., Dedek,K., Maier,H., Schweizer,M., Khimich,D., Nouvian,R., Vardanyan,V., Leuwer,R., Moser,T. and Jentsch,T.J., Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness, *EMBO J.*, 25 (2006) 642-652.
32. Brivanlou,A.H. and Darnell,J.E., Jr., Signal transduction and the control of gene expression, *Science.*, 295 (2002) 813-818.
33. Cowling,V.H., Regulation of mRNA cap methylation, *Biochem. J.*, 425 (2009) 295-302.
34. Brookes,E. and Pombo,A., Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states, *EMBO Rep.*, 10 (2009) 1213-1219.
35. Lang,H., Schulte,B.A., Zhou,D., Smythe,N., Spicer,S.S. and Schmiedt,R.A., Nuclear factor kappaB deficiency is associated with auditory nerve degeneration and increased noise-induced hearing loss, *J. Neurosci.*, 26 (2006) 3541-3550.
36. Merchant,S.N., Adams,J.C. and Nadol,J.B., Jr., Pathology and pathophysiology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss, *Otol. Neurotol.*, 26 (2005) 151-160.
37. Nagy,I., Caelers,A., Monge,A., Bonabi,S., Huber,A.M. and Bodmer,D., NF-kappaB-dependent apoptotic hair cell death in the auditory system, *Audiol. Neurootol.*, 12 (2007) 209-220.
38. Cho,Y., Gong,T.W., Kanicki,A., Altschuler,R.A. and Lomax,M.I., Noise overstimulation induces immediate early genes in the rat cochlea, *Brain Res Mol. Brain Res.*, 130 (2004) 134-148.
39. Kirkegaard,M., Murai,N., Risling,M., Suneson,A., Jarlebark,L. and Ulfendahl,M., Different gene expression in the rat cochlea after exposure to impulse noise, *Neuroscience.*, 142 (2006) 425-435.
40. Shizuki,K., Ogawa,K., Matsunobu,T., Kanzaki,J. and Ogita,K., Expression of c-Fos after noise-induced temporary threshold shift in the guinea pig cochlea, *Neurosci. Lett.*, 320 (2002) 73-76.
41. Muroya,K., Hasegawa,T., Ito,Y., Nagai,T., Isotani,H., Iwata,Y., Yamamoto,K., Fujimoto,S., Seishu,S., Fukushima,Y., Hasegawa,Y. and Ogata,T., GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome, *J. Med. Genet.*, 38 (2001) 374-380.
42. Ali,A., Christie,P.T., Grigorieva,I.V., Harding,B., Van Esch,H., Ahmed,S.F., Bitner-Glindzicz,M., Blind,E., Bloch,C., Christin,P., Clayton,P., Gecz,J., Gilbert-Dussardier,B., Guillen-Navarro,E., Hackett,A., Halac,I., Hendy,G.N., Laloo,F., Mache,C.J., Mughal,Z., Ong,A.C., Rinat,C., Shaw,N., Smithson,S.F., Tolmie,J., Weill,J., Nesbit,M.A. and Thakker,R.V., Functional characterization of GATA3 mutations causing the hypoparathyroid-

- ism-deafness-renal (HDR) dysplasia syndrome: insight into mechanisms of DNA binding by the GATA3 transcription factor, *Hum. Mol. Genet.*, 16 (2007) 265-275.
43. Van Esch,H. and Devriendt,K., Transcription factor GATA3 and the human HDR syndrome, *Cell Mol. Life Sci.*, 58 (2001) 1296-1300.
 44. Van der Wees,J., van Looij,M.A., de Rooter,M.M., Elias,H., van der,B.H., Liem,S.S., Kurek,D., Engel,J.D., Karis,A., van Zanten,B.G., de Zeeuw,C.I., Grosveld,F.G. and van Doorninck,J.H., Hearing loss following Gata3 haploinsufficiency is caused by cochlear disorder, *Neurobiol. Dis.*, 16 (2004) 169-178.
 45. Ho,I.C. and Pai,S.Y., GATA-3 - not just for Th2 cells anymore, *Cell Mol. Immunol.*, 4 (2007) 15-29.
 46. Patient,R.K. and McGhee,J.D., The GATA family (vertebrates and invertebrates), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12 (2002) 416-422.
 47. Crawford,S.E., Qi,C., Misra,P., Stellmach,V., Rao,M.S., Engel,J.D., Zhu,Y. and Reddy,J.K., Defects of the heart, eye, and megakaryocytes in peroxisome proliferator activator receptor-binding protein (PBP) null embryos implicate GATA family of transcription factors, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 3585-3592.
 48. Moriguchi,T., Takako,N., Hamada,M., Maeda,A., Fujioka,Y., Kuroha,T., Huber,R.E., Hasegawa,S.L., Rao,A., Yamamoto,M., Takahashi,S., Lim,K.C., and Engel,J.D., Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation, *Development.*, 133 (2006) 3871-3881.
 49. Tong,Q., Tsai,J., Tan,G., Dalgin,G. and Hotamisligil,G.S., Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation, *Mol. Cell Biol.*, 25 (2005) 706-715.
 50. Woerly,G., Honda,K., Loyens,M., Papin,J.P., Auwerx,J., Staels,B., Capron,M. and Dombrowicz,D., Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation, *J. Exp. Med.*, 198 (2003) 411-421.
 51. Yamane,H., Zhu,J. and Paul,W.E., Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment, *J. Exp. Med.*, 202 (2005) 793-804.
 52. Hong,S.J., Huh,Y., Chae,H., Hong,S., Lardaro,T. and Kim,K.S., GATA-3 regulates the transcriptional activity of tyrosine hydroxylase by interacting with CREB, *J. Neurochem.*, 98 (2006) 773-781.

53. Karis,A., Pata,I., van Doorninck,J.H., Grosveld,F., de Zeeuw,C.I., de Caprona,D. and Fritsch,B., Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear, *J. Comp Neurol.*, 429 (2001) 615-630.
54. Lillevali,K., Matilainen,T., Karis,A. and Salminen,M., Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development, *Dev. Dyn.*, 231 (2004) 775-781.
55. Lillevali,K., Haugas,M., Matilainen,T., Pussinen,C., Karis,A. and Salminen,M., Gata3 is required for early morphogenesis and Fgf10 expression during otic development, *Mech. Dev.*, 123 (2006) 415-429.
56. Lillevali,K., Haugas,M., Pituello,F. and Salminen,M., Comparative analysis of Gata3 and Gata2 expression during chicken inner ear development, *Dev. Dyn.*, 236 (2007) 306-313.
57. Gross,J., Stute,K., Moller,R., Fuchs,J., Amarjargal,N., Pohl,E., Angerstein,M., Smorodchenko,A. and Mazurek,B., Expression of prestin and Gata-3, -2, -1 mRNA in the rat organ of Corti during the postnatal period and in culture, *Hear. Res.*, 261 (2010) 9-21.
58. Zheng,J., Long,K.B., Matsuda,K.B., Madison,L.D., Ryan,A.D. and Dallos,P.D., Genomic characterization and expression of mouse prestin, the motor protein of outer hair cells, *Mamm. Genome*, 14 (2003) 87-96.
59. Weber,T., Zimmermann,U., Winter,H., Mack,A., Kopschall,I., Rohbock,K., Zenner,H.P. and Knipper,M., Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (2002) 2901-2906.
60. Forrest,D., Erway,L.C., Ng,L., Altschuler,R. and Curran,T., Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function, *Nat. Genet.*, 13 (1996) 354-357.
61. Dolle,P., Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs), *Nucl. Recept. Signal.*, 7 (2009) e006.
62. Mark,M., Ghyselinck,N.B. and Chambon,P., Function of retinoic acid receptors during embryonic development, *Nucl. Recept. Signal.*, 7 (2009) e002.
63. Romand,R., Dolle,P. and Hashino,E., Retinoid signaling in inner ear development, *J. Neurobiol.*, 66 (2006) 687-704.
64. Gocke,A.R., Hussain,R.Z., Yang,Y., Peng,H., Weiner,J., Ben,L.H., Drew,P.D., Stuve,O., Lovett-Racke,A.E. and Racke,M.K., Transcriptional modulation of the immune response by peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists in autoimmune disease, *J. Immunol.*, 182 (2009) 4479-4487.
65. Chen,X., Matthews,J., Zhou,L., Pelton,P., Liang,Y., Xu,J., Yang,M., Cryan,E., Rybczynski,P. and Demarest,K., Improvement of dyslipidemia, insulin sensitivity, and energy bal-

- ance by a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, *Metabolism.*, 57 (2008) 1516-1525.
66. Organ,L.E. and Raphael,R.M., Lipid lateral mobility in cochlear outer hair cells: regional differences and regulation by cholesterol, *J. Assoc. Res Otolaryngol.*, 10 (2009) 383-396.
 67. Andreeva,N., Nyamaa,A., Haupt,H., Gross,J. and Mazurek,B., Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti, *Neurosci. Lett.*, 396 (2006) 86-90.
 68. Zheng,W.H., Kar,S. and Quirion,R., Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons, *Mol Pharmacol.*, 62 (2002) 225-233.
 69. Hu,T., Ramachandrarao,S.P., Siva,S., Valancius,C., Zhu,Y., Mahadev,K., Toh,I., Goldstein,B.J., Woolkalis,M. and Sharma,K., Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells, *Am. J. Physiol Renal Physiol.*, 289 (2005) F816-F825.
 70. Lowenheim,H., Kil,J., Gultig,K. and Zenner,H.P., Determination of hair cell degeneration and hair cell death in neomycin treated cultures of the neonatal rat cochlea, *Hear. Res.*, 128 (1999) 16-26.
 71. Sobkowicz,H.M., Loftus,J.M. and Slapnick,S.M., Tissue culture of the organ of Corti, *Acta Otolaryngol. Suppl. Stockh.*, 502 (1993) 3-36.
 72. Steenbergen,R.D., OudeEngberink,V.E., Kramer,D., Schrijnemakers,H.F., Verheijen,R.H., Meijer,C.J. and Snijders,P.J., Down-regulation of GATA-3 expression during human papillomavirus-mediated immortalization and cervical carcinogenesis, *Am. J. Pathol.*, 160 (2002) 1945-1951.
 73. Pfaffl,M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29 (2001) 2002-2007.
 74. Gross,J., Machulik,A., Amarjargal,N., Moller,R., Ungethum,U., Kuban,R.J., Fuchs,F.U., Andreeva,N., Fuchs,J., Henke,W., Pohl,E.E., Szczepek,A.J., Haupt,H. and Mazurek,B., Expression of apoptosis-related genes in the organ of Corti, modiolus and stria vascularis of newborn rats, *Brain Res*, 1162 (2007) 56-68.
 75. de Jonge,H.J., Fehrmann,R.S., de Bont,E.S., Hofstra,R.M., Gerbens,F., Kamps,W.A., de Vries,E.G., van der Zee,A.G., te Meerman,G.J. and ter Elst,A., Evidence based selection of housekeeping genes, *PLoS. ONE.*, 2 (2007) e898.

76. Bustin,S.A., Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *J. Mol. Endocrinol.*, 29 (2002) 23-39.
77. Tamura,T., Konishi,Y., Makino,Y. and Mikoshiba,K., Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression, *Neurochem. Int.*, 29 (1996) 573-581.
78. Li,Y.L., Ye,F., Hu,Y., Lu,W.G. and Xie,X., Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.*, 394 (2009) 110-116.
79. Jung,M., Ramankulov,A., Roigas,J., Johannsen,M., Ringsdorf,M., Kristiansen,G. and Jung,K., In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR, *BMC. Mol. Biol.*, 8 (2007) 47.
80. Ohl,F., Jung,M., Radonic,A., Sachs,M., Loening,S.A. and Jung,K., Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer, *J. Urol.*, 175 (2006) 1915-1920.
81. Nagashima,R., Sugiyama,C., Yoneyama,M. and Ogita,K., Transcriptional factors in the cochlea within the inner ear, *J. Pharmacol. Sci.*, 99 (2005) 301-306.
82. Mazurek,B., Machulik,A., Amarjargal,N., Kuban,R., Ungethüm,U., Fuchs,F., Haupt,H., Gross,J., Gene expression of organ of Corti (OC), modiolus (MOD) and stria vascularis (SV) of newborn rats, Gene expression Omnibus (GEO) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ID GSE54462006 (2006).
83. Gross,J., Machulik,A., Moller,R., Fuchs,J., Amarjargal,N., Ungethuem,U., Kuban,R.J., Szczepek,A.J., Haupt,H. and Mazurek,B., mRNA expression of members of the IGF system in the organ of Corti,the modiolus and the stria vascularis of newborn rats, *Growth Factors.*, 26 (2008) 180-191.
84. Oliver,D., Ludwig,J., Reisinger,E., Zoellner,W., Ruppertsberg,J.P. and Fakler,B., Memantine inhibits efferent cholinergic transmission in the cochlea by blocking nicotinic acetylcholine receptors of outer hair cells, *Mol. Pharmacol.*, 60 (2001) 183-189.
85. Sobkowicz,H.M., Slapnick,S.M. and August,B.K., Apoptosis of inner hair cells caused by laser ablation of their spiral ganglion neurons in cultures of the mouse organ of Corti, *J. Neurocytol.*, 28 (1999) 939-954.
86. van Hamburg,J.P., Mus,A.M., de Bruijn,M.J., de Vogel,L., Boon,L., Cornelissen,F., Asmawidjaja,P., Hendriks,R.W. and Lubberts,E., GATA-3 protects against severe joint inflammation and bone erosion and reduces differentiation of Th17 cells during experimental arthritis, *Arthritis Rheum.*, 60 (2009) 750-759.

87. Bustin,S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J. Mol. Endocrinol.*, 25 (2000) 169-193.
88. Mu,M.Y., Chardin,S., Avan,P. and Romand,R., Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 99 (1997) 29-37.
89. Sato,M., Leake,P.A. and Hradek,G.T., Postnatal development of the organ of Corti in cats: a light microscopic morphometric study, *Hear. Res.*, 127 (1999) 1-13.
90. Roth,B. and Bruns,V., Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements, *Anat. Embryol. (Berl)*, 185 (1992) 571-581.
91. Rivolta,M.N. and Holley,M.C., GATA3 is downregulated during hair cell differentiation in the mouse cochlea, *J. Neurocytol.*, 27 (1998) 637-647.
92. Cartharius,K., Frech,K., Grote,K., Klocke,B., Haltmeier,M., Klingenhoff,A., Frisch,M., Bayerlein,M. and Werner,T., MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, *Bioinformatics*, 21 (2005) 2933-2942.
93. Yamashita,M., Ukai-Tadenuma,M., Kimura,M., Omori,M., Inami,M., Taniguchi,M. and Nakayama,T., Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 42399-42408.
94. Balmer,J.E. and Blomhoff,R., Gene expression regulation by retinoic acid, *J. Lipid Res.*, 43 (2002) 1773-1808.
95. Chandra,V., Huang,P., Hamuro,Y., Raghuram,S., Wang,Y., Burris,T.P. and Rastinejad,F., Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA, *Nature*, 29 (2008) 350-356.
96. Biesalski,H.K., Wellner,U. and Weiser,H., Vitamin A deficiency increases noise susceptibility in guinea pigs, *J. Nutr.*, 120 (1990) 726-737.
97. Lefebvre,P., Malgrange,B., Van de,W.T. and Moonen,G., Jean Marquet Award. Regeneration of the neurosensory structures in the mammalian inner ear, *Acta Otorhinolaryngol. Belg.*, 51 (1997) 1-10.
98. Helyer,R., Cacciabue-Rivolta,D., Davies,D., Rivolta,M.N., Kros,C.J. and Holley,M.C., A model for mammalian cochlear hair cell differentiation in vitro: effects of retinoic acid on cytoskeletal proteins and potassium conductances, *Eur. J. Neurosci.*, 25 (2007) 957-973.
99. Lin,J., Feng,L., Fukudome,S., Hamajima,Y., Huang,T. and Levine,S., Cochlear stem cells/progenitors and degenerative hearing disorders, *Curr. Med. Chem.*, 14 (2007) 2937-2943.

100. Joon,S.H., Hee,K.H., Ho,A.J. and Woo,C.J., Retinoic acid applied after noise exposure can recover the noise-induced hearing loss in mice, *Acta Otolaryngol.*, 129 (2009) 233-238
101. Repine,J.E., Pfenninger,O.W., Talmage,D.W., Berger,E.M. and Pettijohn,D.E., Dimethyl sulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron/hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.*, 78 (1981) 1001-1003.
102. Qi,W., Ding,D. and Salvi,R.J., Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures, *Hear. Res.*, 236 (2008) 52-60.
103. He,D.Z., Zheng,J. and Dallos,P., Development of acetylcholine receptors in cultured outer hair cells, *Hear. Res.* 162 (2001) 113-125.
104. Patuzzi,R., The Goldman-Hodgkin-Katz equation and graphical 'load-line' analysis of ionic flow through outer hair cells, *Hear. Res.*, 125 (1998) 71-97.
105. Hahm,S.H., Chen,Y., Vinson,C., et al., A calcium-initiated signaling pathway propagated through calcineurin and cAMP response element-binding protein activates proenkephalin gene transcription after depolarization, *Mol. Pharmacol.*, 64 (2003) 1503-1511.
106. Bok,J., Wang,Q., Huang,J., and Green,S.H., CaMKII and CaMKIV mediate distinct pro-survival signaling pathways in response to depolarization in neurons, *Mol. Cell Neurosci.*, 36 (2007) 13-26.
107. Szonyi,M., He,D.Z., Ribari,O., Sziklai,I. and Dallos,P., Intracellular calcium and outer hair cell electromotility, *Brain Res*, 922 (2001) 65-70.
108. Santos-Sacchi,J., Song,L., Zheng,J. and Nuttall,A.L., Control of mammalian cochlear amplification by chloride anions, *J. Neurosci.*, 26 (2006) 3992-3998.
109. Marcon,S. and Patuzzi,R., Changes in cochlear responses in guinea pig with changes in perilymphatic K⁺. Part I: summing potentials, compound action potentials and DPOAEs, *Hear. Res.*, 237 (2008) 76-89.
110. Zenner,H.P. and Ernst,A., Cochlear-motor, transduction and signal-transfer tinnitus: models for three types of cochlear tinnitus, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 249 (1993) 447-454.
111. Altschul,S.F., Madden,T.L., Schäffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,M. and Lipman,D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acid Res.*, 25 (1997) 3389-3402.
112. Yu,N., Zhu,M.-L., Johnson,B., Liu,Y.P., Jones,R.O. and Zhao,H.B., Prestin up-regulation in chronic salicylate (aspirin) administration: An implication of functional dependence of prestin expression, *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 (2008) 2407-2418.

113. Zenner,H.P., Reuter,G., Zimmermann,U., Gitter,A.H., Fermin,C. and LePage,E.L., Transitory endolymph leakage induced hearing loss and tinnitus: depolarization, biphasic shortening and loss of electromotility of outer hair cells, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 251 (1994) 143-153.
114. Stöver,T., Wissel,K., Averbeck,T., Lenarz,T. and Altschuler,R.A., [Characterisation of the gene expression profiles in the inner ear and the colliculus inferior of normal and deafened rats by gene-array-technology], *Laryngorhinootol.*, 83 (2004) 597-605.
115. Hildebrand,M.S., Newton,S.S., Gubbels,S.P., Sheffield,A.M., Kochhar,A., de Silva,M.G., Dahl,H.H., Rose,S.D., Behlke,M.A. and Smith,R.J., Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss, *Mol. Ther.*, 16 (2008) 224-236.
116. Vallabhapurapu,S. and Karin,M., Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system, *Annu. Rev. Immunol.*, 27 (2009) 693-733.
117. Yu,Y., Wan,Y. and Huang,C., The biological functions of NF-kappaB1 (p50) and its potential as an anti-cancer target, *Curr. Cancer Drug Targets*, 9 (2009) 566-571.
118. Zhang,Z., Schwartz,S., Wagner,L. and Miller,W., A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol*, 7 (2000) 203-214.
119. Lee,S. and Privalsky,M.L., Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties, *Mol Endocrinol*, 19 (2005) 863-878.
120. Weston,A.D., Blumberg,B., Underhill,T.M., Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more, *J Cell Biol*, 161 (2003) 223-228.

Abkürzungsverzeichnis

a	apikal
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholin-Esterasen
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
ÄHZ	äußere Haarzelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary unit
b	basal
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSG	gepufferte Salz-Glukose-Lösung, buffer saline glucose
Ca ²⁺	Calciumion
cDNA	complementary DNA
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Crossing Point
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DID	differential integrated density
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphate; Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DPOAE	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentäres Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
GITC	Guanidinisothiocyanat
H ₂ O	Wasser
HDR-Syndrom	Syndrom aus Hypoparathyreoidismus, sensorineuraler Taubheit und Nierendefekten (h ypoparathyroidism, d eafness, r enal dysplasia)
HZ	Haarzellen

IGF	Insulin-artige Wachstumsfaktor, insuline like growth faktor
IHZ	innere Haarzelle
K ⁺	Kaliumion
KI	Knock-in (Die Veränderung von definierten Bereichen im Zielgen führt zur unveränderten Expression eines manipulierten Zielgens. Angewandt in Studien zur Funktion.)
KO	Knock-out (Die Eliminierung von Genbereichen und/oder die Einführung eines Stoppkodon verhindern die Expression des Zielgens.)
LSD	Least Significant Difference (LSD-Test)
m	medial
MD	Median
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit
nAChR	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NFκB	nukleärer Transkriptionsfaktor kappaB
OC	Cortisches Organ, Organ of Corti
PB	Phospaht Puffer, phosphat buffer
PBS	Phospaht gepufferte Salz-Lösung, phosphat buffer saline
PPAR-α	Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor alpha
RAR, RXR	Retinoic-acid-Rezeptor, Retinoid-X-Rezeptor
RARE, RXRE	Retinoic-acid-Response-Element, Retinoid-X-Response-Elemente
RLT	GITC-haltiger Lysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Zweiter Waschpuffer (RNA-Isolation)
RT	Reverse Transkription, Reverse Transkriptase
RTH	Schilddrüsenhormonresistenz (resistance to thyroid hormone)
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
RW1	Erster Waschpuffer (RNA-Isolation)
SCL26	solute carrier proteins 26
SCL26A5	Prestin
SD	Standardabweichung

SEM	Standardfehler der Mittelwerte
STAS	sulphate transporters and antisigmafactor antagonists
T ₃ , T ₄	Trijodthyronin, Tetrajodthyronin (Thyroxin)
Tbp	TATA-box binding protein
TFIID	Transkriptionsfaktor der Polymerase II, Fraktion D
TGF-β	Transforming growth factor beta
TH	Thyroidhormon
TR	Thyroidhormonrezeptoren
TRE	Thyroid-Response-Element
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
vs.	versus
zzgl.	zuzüglich

Einheiten

°C	Grad Celcius	Temperatur
AU	arbitrary unit	Relative Einheit
bp	Basenpaare	
Da	Dalton	atomare Masseneinheit (1 Da = 10 ⁻³ kDa)
dB	Dezibel	Schalldruckpegel
g	Gramm	Masse (1 ng = 10 ⁻³ µg = 10 ⁻⁶ mg = 10 ⁻⁹ g = 10 ⁻¹² kg)
h	Stunde	Zeit (1 h = 60 min = 3600 s)
Hz	Hertz	Frequenz (1 Hz = 10 ⁻³ kHz)
l	Liter	Volumen (1 µl = 1 mm ³ = 10 ⁻⁶ l)
m	Meter	Länge (1 nm = 10 ⁻³ µm = 10 ⁻⁶ mm = 10 ⁻⁹ m)
M	Molar	Molarität = Stoffmengenkonzentration (mol/l)
min	Minute	Zeit (1 min = 60 s = 1/60 h)
mol	Mol	Stoffmenge
Osmol/l	Osmolarität	osmotischer Druck
RE _{RNA}	Relative Einheit	normiert auf die Gesamt-RNA
RE _{Tbp}	Relative Einheit	normiert auf Tbp (Referenzgen)
s	Sekunde	Zeit (1 s = 1/60 min)
V	Volt	elektrische Spannung (1 V = 10 ³ mV)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Schallübertragung im menschlichen Ohr.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Haarzell-Typen.	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwei Modelle der spannungsabhängigen Prestin-Steuerung.	8
Abbildung 4: CP-Werte der Prestin-, Tbp-, Gata-3-, Gata-2- und Gata-1-mRNA des Calibrators während der experimentellen Arbeit.	31
Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der Phalloidin-gefärbten Haarzellen.	33
Abbildung 6: Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.	34
Abbildung 7: RNA-Konzentration frisch und nach 72 Stunden Kultur im apikalen, medialen und basalen Fragment.	36
Abbildung 8: Gapdh-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment frisch und nach 72 Stunden in Kultur.	37
Abbildung 9: Tbp-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment frisch und nach 72 Stunden in Kultur.	38
Abbildung 10: mRNA-Gehalt der Transkriptionsfaktoren im apikalen, medialen und basalen Fragment frisch und nach 72 Stunden in Kultur.	40
Abbildung 11: In-vitro-Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs.	42
Abbildung 12: Einfluss der Dauer der Kultur auf die Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression im Cortischen Organ.	43
Abbildung 13: In-vitro-Entwicklung der Gata-1 und Gata-2-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs.	45
Abbildung 14: Apikal-Basal-Gradient der Prestin-, Gata-3- und Gata-2-mRNA-Expression in vitro im Cortischen Organ.	45
Abbildung 15: In-Vivo-Entwicklung der Tbp-mRNA-Expression in vivo am zweiten, fünften und achten postnatalen Tag im apikalen, medialen und basalen Fragment.	46
Abbildung 16: In-vivo-Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs.	47
Abbildung 17: In-vivo-Entwicklung der Prestin- und Gata-3-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs.	48

Abbildung 18: In-vivo-Entwicklung der Gata-mRNA-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment im zwei, fünf und acht Tage alten Cortischen Organ.	50
Abbildung 19: Apikal-Basal-Gradient der Prestin-, Gata-3- und Gata-2-mRNA-Expression in vivo im zwei, fünf und acht Tage alten Cortischen Organ.	51
Abbildung 20: Prestin-Protein-Färbung im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei, fünf und acht Tage alten Ratten.	52
Abbildung 21: In-Vivo-Entwicklung von Prestin-Protein im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei, fünf und acht Tage alten Ratten.	52
Abbildung 22: GATA-3-Färbung der Zellkerne im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von zwei und acht Tage alten Ratten.	53
Abbildung 23: GATA-3-Färbung der Zellkerne im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten frisch präpariert und nach 48 Stunden Kultur.	55
Abbildung 24: Neurofilamentfärbung.	56
Abbildung 25: Tbp-mRNA im apikalen, medialen und basalen Fragment nach 72 Stunden Kultur in Abhängigkeit von der Präparationsart.	57
Abbildung 26: Einfluss der Präparationsart auf die Prestin-mRNA-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment.	58
Abbildung 27: Einfluss der Präparationsart auf die Gata-3-mRNA-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment.	58
Abbildung 28: Einfluss von L-Thyroxin auf die mRNA-Expression von Prestin und den Gata-Transkriptionsfaktoren im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs.	60
Abbildung 29: Korrelation von Prestin- und Gata-3-mRNA unter dem Einfluss von L-Thyroxin.	61
Abbildung 30: Prestin-Protein-Färbung im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten nach 48 Stunden Kultur mit und ohne L-Thyroxin.	62
Abbildung 31: Einfluss von L-Thyroxin auf die Prestin-Protein-Expression im apikalen, medialen und basalen Fragment des Cortischen Organs von drei bis fünf Tage alten Ratten nach 48 Stunden Kultur.	62

Abbildung 32: Einfluss von DMSO auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea.....	64
Abbildung 33: Einfluss von Retinsäure auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea.....	65
Abbildung 34: Einfluss von Retinsäure auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea.....	66
Abbildung 35: Korrelation von Prestin und Gata-3 unter dem Einfluss von Retinsäure.	67
Abbildung 36: Einfluss von Gemfibrozil auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 im apikalen , medialen und basalen Fragment nach 48 Stunden Kultur.	68
Abbildung 37: Einfluss von Gemfibrozil auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur der Cochlea.....	69
Abbildung 38: Korrelation von Prestin- und Gata-3-mRNA unter dem Einfluss von Gemfibrozil.	70
Abbildung 39: Einfluss von TGF- β auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3.	72
Abbildung 40: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.....	79
Abbildung 41: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ähnlichkeit von Prestin zwischen dem Menschen und ausgewählten Säugetierspezies.	6
Tabelle 2: Verwendete Primer.....	21
Tabelle 3: Primer-spezifische Annealing-Temperaturen und Effizienzen.....	28
Tabelle 4: cDNA-Einsatz in PCR.....	29
Tabelle 5: Anzahl der vorhandenen inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.	35
Tabelle 6: Anzahl der fehlenden inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.	35
Tabelle 7: Veränderung der Prestin- und Gata-3-mRNA-Expression in vivo im apikalen, medialen und basalen Fragment.	49
Tabelle 8: Korrelation der L-Thyroxin induzierten Prestin- und Gata-3-mRNA-Veränderungen.	61
Tabelle 9: Korrelation der Retinsäure induzierten Prestin- und Gata-3-mRNA-Veränderungen.	67
Tabelle 10: Korrelation der Gemfibrozil induzierten Prestin- und Gata-3-mRNA-Veränderungen.	70
Tabelle 11: Einfluss von IGF auf die mRNA-Expression von Prestin in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.	71
Tabelle 12: Einfluss von TGF- β auf die Veränderung der mRNA-Expression von Prestin und Gata-3 in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.....	73
Tabelle 13: Einfluss von Neurotransmittern auf die mRNA-Expression von Prestin und Gata-3.....	76
Tabelle 14: Einfluss von Neurotransmittern auf die mRNA-Expression von Gata-2 und Gata-1.....	77
Tabelle 15: Einfluss von Kaliumchlorid auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.....	78
Tabelle 16: Einfluss der Kaliumkonzentration auf die Gata-1- und Gata-2-mRNA-Expression in der organotypischen Kultur des Cortischen Organs.....	81

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationen

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

Gross,J., Stute,K., Fuchs,J., Angerstein,M., Amarjargal,N. and Mazurek,B., Effects of retinoic acid and butyric acid on the expression of prestin and Gata-3 in organotypic cultures of the organ of Corti of newborn rats, *Develop Neurobiol*, 71 (2011) 650–661.

Gross,J., Angerstein,M., Fuchs,J., Stute,K. and Mazurek,B., Expression Analysis of Prestin and Selected Transcription Factors in Newborn Rats, *Cell Mol Neurobiol*, 31 (2011) 1089-1101.

Mazurek,B., Fuchs,J., Stute,K., Angerstein,M., Amarjargal,N., Olze,H. and Gross,J., Decrease of prestin expression by increased potassium concentration in organotypic cultures of the organ of Corti of newborn rats, *Neurosci Lett*, 499 (2011) 52-56.

Poster

Gross,J., Stute,K., Moller,R., Fuchs,J., Amarjargal,N. and Mazurek,B., Expression of Gata-1,-2,-3 and prestin mRNA in the organ of Corti during early postnatal development of rats, 45th Inner Ear Biology Workshop, Ferrara, Italy, 2008.

Gross,J., Angerstein,M., Fuchs,J., Stute,K. and Mazurek,B., Expression analysis of prestin and selected transcription factors in newborn rats, 47th Inner Ear Biology Workshop, Prague, Czech Republic, 2010.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Zeit der Promotion auf verschiedenste Weise unterstützt haben.

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Mazurek für das Ermöglichen dieser Arbeit, für ihr Vertrauen und ihre Geduld, sowie die Gespräche und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Gross möchte ich für die Einführung in wissenschaftliches Denken und Arbeiten danken. Für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und für seine aufmunternde, freundschaftliche Betreuung.

Ich danke den Mitarbeiterinnen des Molekularbiologischen Forschungslabors (Charité Campus Mitte), die mich mit ihrem reichlichen Erfahrungsschatz und praktischen Ratschlägen tatkräftig unterstützt haben.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre liebevolle Fürsorge und bedingungslose Unterstützung.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Kerstin Stute, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einflussfaktoren auf die Prestin-Expression im Cortischen Organ der neugeborenen Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, November 2010

Kerstin Stute