

Johann Gross

Molekulare Mechanismen von Schwerhörigkeit und Tinnitus

Liebe Inge, sehr geehrte Festversammlung, liebe Kolleginnen und Kollegen,

Erlauben Sie zunächst einige persönliche Worte.

Ich hatte das Glück, bei beiden Rapoport's lernen zu dürfen: 2 Jahre als wiss. Assistent bei Mitja Rapoport und viele Jahre als Mitarbeiter bei Inge Rapoport. Lernen konnte ich von Mitja's außerordentlichem wissenschaftlichem Scharfsinn und von Inges tiefem Verständnis klinischer Probleme und kluger Ansätze zur Verbindung von klinischer und Grundlagen-Forschung.

Mitja Rapoport hat den naturwissenschaftlichen Charakter in der Medizin der DDR wesentlich geprägt. Das findet seinen Ausdruck z. B. in der Entwicklung der Labormedizin in der DDR. Er unterstützte die Entstehung des Fachgebietes „Pathologische Biochemie und Labordiagnostik“, weil er die Gefahr sah, dass die Labormedizin zu einem Fachgebiet wird, in dem der wissenschaftliche Aspekt nicht ausreichend beachtet wird. Dadurch gelang es, in fast allen Universitäten der DDR Lehrstühle für Pathobiochemie einzurichten. Die Labormedizin ist heute dabei, den Anspruch eines universitären Fachgebietes zu vergessen.

Wir alle haben ihm aber auch zu danken für seine philosophischen, ethischen und moralischen Grundsätze in der Medizin. Für mich bleibt unvergessen sein Artikel „Medizin ohne Menschlichkeit“ aus dem Jahre 1990, als die Charité in der Wendezeit ungerechterweise ins Kreuzfeuer der Medien geriet.

Inge Rapoport gab mir nach zwei Jahren Pflichtassistenten die Chance, auf einer Forschungsstelle in der Neonatologie zu arbeiten. Mit der Gründung des neonatologischen Forschungsbereiches ergab sich für mich und zahlreiche Kolleginnen und Kollegen der Neonatologie, der Kinderklinik und Frauenklinik die Chance für eine fundierte experimentell- angewandte Forschung (Abb.1). Die Arbeiten ermöglichten eine internationale Zusammenarbeit, z. B. mit Forschungsgruppen aus Prag, Warschau und Moskau aber auch mit Ola Saugstad in Norwegen, der vor kurzem Ehrenmitglied der deutschen Ge-

sellschaft für Neonatologie wurde und mit Kurt Andersson vom Karolinska-Institut in Schweden.



Abb. 1: Forschungsgruppe Neonatologie (1982)

Auch nach ihrer Emeritierung arbeitete Inge mit uns im Labor zusammen. Rückblickend darf ich sagen: Die Arbeit in dem neonatologischen Forschungslabor war eine schöne und erfolgreiche Periode gemeinsamer wissenschaftlicher Arbeit, die zu zahlreichen Promotions-Arbeiten, Habilitationen und wissenschaftlichen Publikationen führten. Diese sind bleibende Dokumente einer erfolgreichen Arbeit.

Inge war nicht nur unsere Lehrerin und Chefin, sie war für uns alle eine einfühlsame und menschlich warmherzige Kollegin, die mit uns gemeinsam auch ihre Freizeit verbrachte. Wir denken mit Dankbarkeit an die gemeinsamen Besuche von Berliner Theatern, den Ausflug nach Rostock und Warnemünde, die gemeinsamen Weihnachtsfeiern (die übrigens nicht so waren, wie sie im „Turm“ von Tellkamp beschrieben werden) und ihre Beiträge für unser Brigade-Tagebuch. Dabei zeigten sich ihr Humor und ihre Lust, Anerkennung in Form von Reimen und Zeichnungen auszudrücken.

Liebe Inge, es ist schön, Dich bei uns zu haben. Vielen Dank für alles, was Du uns gegeben hast und viel Gesundheit für die kommenden Jahre.

Aber natürlich war das Wichtigste die Arbeit.

Inge schreibt in ihrem Buch: „Die Fragestellung, der wir uns in unserer ‘neonatologischen Periode’ zuwandten, richtete sich auf den Sauerstoffmangel des Feten und Neugeborenen, vielleicht die größte Bedrohung für sein Überleben und seine spätere Existenz“ (Ingeborg Rapoport, Meine ersten drei Leben, S. 413).

Analysiert man die Ursachen von Schwerhörigkeit und Tinnitus, so stellt man fest, dass Sauerstoffmangel in jedem Lebensalter an der Entstehung beteiligt sein kann (Tab. 1). Es war daher nach meinem Wechsel in die HNO eine Herausforderung, beizutragen zur Klärung der Frage, welche Rolle Sauerstoffmangel bei Schwerhörigkeit und Tinnitus spielt.

Alter	Ursachen	Häufigkeit
Neugeborene	Genetisch, Infekte	1-2 von 1000
Erwachsene, jung	Lärm, Infekte	1 %
Erwachsene, bis 60 Jahre	Lärm, Infekte, Alter, Med.	10 %
Erwachsene, über 60 Jahre	Alter, Hypoxie, Lärm	50 %

Med.-Medikamente

Table 1: Ursachen und Häufigkeit von Schwerhörigkeit

Als ich nach der Wende mit Inge über meine neue Aufgabe sprach, sagte sie: Das Ohr ist ein sehr interessantes Organ, es ist wahrscheinlich einfacher als das ZNS und es ist besser zugänglich. Auch das kennzeichnet gut ihre Denkweise: kein enges egoistisches Herangehen, sondern ein auf Erkenntnisgewinn in grundsätzlichen Fragen gerichtetes Denken.

Hören und Sprechen sind die Grundlage für die Kommunikation und das Zusammenleben der Menschen. Daher führt Schwerhörigkeit (SH) zu Funktionsstörungen, die sich in sozialer Isolierung, vermindertem Selbstvertrauen, im Verlust der Unabhängigkeit bis hin zur Depression äußern. Besonders dramatische Auswirkungen auf die physische, psychische und soziale Entwicklung hat Schwerhörigkeit in der Kindheit. Eine frühe Erkennung des Leidens und eine adäquate Therapie haben daher hohe Priorität. Das Verständnis molekularer Mechanismen von Schwerhörigkeit und Tinnitus (TI) hilft neue Wege für die Diagnostik und Therapie zu entwickeln.

1. Das auditorische System

Das Innenohr ist ein äußerst fein reguliertes sensorisches Organ. Die Schallwellen, die auf das äußere Ohr treffen, werden vom Mittelohr weitergeleitet

bis zum Innenohr, der *Cochlea*, einem schneckenartigen Gebilde. Diese Struktur ist verantwortlich für die Transformation der mechanischen Energie der Schallwelle in einen elektrischen Impuls, der in das ZNS übertragen werden kann. Die Cochlea windet sich spiralartig um eine zylinderförmige Achse, den *Modiolus*. Rollt man das flüssigkeitsgefüllte Kanal-System auf, erkennt man, dass der Kanal in drei Kompartimente geteilt ist. Die *Scala media* (enthält Endolymphe) liegt zwischen zwei größeren Kompartimenten, der *Scala vestibuli* und der *Scala tympani* (enthalten Perilymphe). Die Flüssigkeiten in der Cochlea haben eine einzigartige Zusammensetzung. Die Endolymphe hat eine hohe Kalium-Konzentration (150 mM) und eine niedrige Natriumkonzentration. Die Perilymphe hat eine Zusammensetzung, die einer extrazellulären Flüssigkeit entspricht, also eine niedrige Kalium-Konzentration (5 mM) und eine hohe Natrium-Konzentration.

Die *Scala media* enthält das cochleare sensorische Epithel, das *Corti-Organ* (OC), das sich auf der Basilarmembran befindet (Corti, 1851) und das durch die Schall-induzierte Wanderwelle ausgelenkt wird. Das Corti-Organ enthält hochspezialisierte Zellen, die als Haarzellen (HZ) bezeichnet werden. Sie sind angeordnet in drei Reihen von *äußeren Haarzellen* (ÄHZ) und einer Reihe *inneren Haarzellen* (IHZ). In einer Cochlea sind etwa 15000 HZ vorhanden (1). Die Haarzellen sind von der *Tectorialmembran* bedeckt.

Die beiden Typen von Haarzellen haben unterschiedliche Funktionen. Die ÄHZ verstärken frequenzspezifisch die Wanderwelle und die IHZ (die eigentlichen sensorischen Zellen) leiten das Signal weiter an die *Neurone des Spiralganglions* (SGN). Entsprechend diesen Funktionen haben die Zellen eine unterschiedliche Ausstattung. ÄHZ haben ein spezielles Protein in der Membran, das Motorprotein *Prestin*, dieses erlaubt die Verstärkung der Wanderwelle und damit die besonders hohe Sensitivität und Frequenz-Spezifität des Hörorgans. Die IHZ haben als charakteristisches Merkmal besondere synaptische Strukturen, die *Glutamat* als excitatorischen Neurotransmitter nutzen. Die besonderen Strukturen und Funktionen von inneren und äußeren HZ bestimmen auch den molekularen Mechanismus ihrer Schädigung bei Einwirkung von pathogenen Faktoren auf das Hörsystem.

Die apikale Oberfläche jeder Haarzelle hat Bündel von feinen Härchen, die *Stereocilien*. Die Stereocilien haben eine stufenweise Anordnung, die untereinander mit Proteinfäden vernetzt sind und die man als *Tip-links* bezeichnet. Eine mechanische Ablenkung des Haarbündels öffnet *mechanoelektrische Transduktionskanäle* (*MET*), die sich in der Nähe der *Tip-links* befinden. Die Spannung dieser Kanäle wird durch verschiedene Proteine (z.

B. Myosin) reguliert, sie wirken wie eine Feder. Durch die Bewegung der Stereocilien öffnen die MET und es kommt zum Einstrom von K^+ - und Ca^{++} -Ionen und zur Depolarisation der Zelle. Die Depolarisation öffnet Spannungsabhängige Kanäle (voltage-gated Ca^{++} -channels) am basalen Ende der Plasma-Membran, damit strömt Ca^{++} in die Zelle (2). Die ÄHZ reagieren auf die Depolarisation mit der Veränderung ihrer Länge und übermitteln damit mechanische Signale an die IHZ. Die IHZ reagieren mit der Freisetzung von Neurotransmittern, damit wird in den afferenten Nerven-Terminals ein Aktionspotenzial ausgelöst. Das primäre elektrische Signal der IHZ gelangt zu den *Spiralganglien*, d. h. Nervenzellen im Modiolus, die das Signal für die Weiterleitung zum ZNS aufbereiten. Die Synapsen haben eine ganz besondere Struktur, die Vesikel sind perlschnurartig an einem Band angeordnet, man spricht daher von *Ribbon-Synapsen* (ribbon = Band). Diese Anordnung ist wichtig für die zeitlich präzise Übertragung des Schallsignals. Die synaptische Transmission zwischen IHZ und SGN ist Glutamat vermittelt und damit excitatorisch, mit NMDA und Kainate/AMPA-Typ Glutamat-Rezeptoren in den SGN. Daher sind die Synapsen zwischen IHZ und SGN empfindlich gegenüber intra-cochlearer Perfusion mit Glutamat-Agonisten; *in vivo* kommt es zur Degeneration von synaptischen Terminals der SGN an der IHZ. Die Hemmung von Glutamat-Transportern verstärkt die Schädigung der synaptischen Strukturen. IHZ und SGN zeigen wie viele andere neuronale Zellen eine *Spontan-Aktivität*, d.h. sie senden elektrische Impulse ohne Vorliegen eines Reizes. Die mittlere Feuerungsrate beträgt etwa 70 spikes/s, Hypoxie vermindert die Feuerungsrate (3).

Der Ca^{++} -Einstrom ist fundamental sowohl für den Hörprozess, als auch für die Schädigung der neurosensorischen Zellen, obwohl Ca^{++} nur 0,2 % des elektrischen Potentials ausmacht. Die Calcium-Konzentration im unmittelbaren Umfeld der Stereocilien scheint besonders wichtig für den Schutz der HZ bei Lärm zu sein. Sie vermittelt z. B. die Adaptation der HZ an eine anhaltende Deflektion des Haarbündels durch ein negatives Feedback an die MET. Der Auswärts-Transport von Ca^{++} aus der Zelle und den Stereocilien erfolgt durch die *Plasma Membran Calcium ATP-ase* (PMCA) unter Energieverbrauch. Die PMCA Aktivität spielt eine Schlüsselrolle für die Schädigung von HZ.

Der apikale Teil der Haarzelle ist also verantwortlich für die Umwandlung des mechanischen Signals in ein elektrisches Signal, der basolaterale Teil der Haarzelle ist verantwortlich für die synaptische Transmission. Der Hörnerv leitet die Signale zu mehreren auditorischen Kernen des ZNS: Nucleus coch-

learis dorsalis und ventralis, Colliculus inferior, Corpus geniculatum mediale und primärer und sekundärer auditorischer Cortex. In diesen Kernen werden die Signale decodiert und analysiert. Sowohl die Cochlea als auch die Verbindung zum ZNS sind tonotopisch organisiert.

2. Schwerhörigkeit

Tab. 1 gibt einen Überblick über die Ursachen und die Häufigkeit einer Schwerhörigkeit von etwa 25 dB. Sie können eingeteilt werden in angeborene und erworbene Formen. Im Prinzip entsteht eine Schwerhörigkeit, wenn Proteine des Innenohres so verändert sind, dass sie ihre normale Funktion nicht mehr ausführen können (z. B. durch Mutationen oder oxidative Prozesse bei angeborener SH) oder wenn neurosensorische Zellen des Hörorgans absterben (z.B. durch Altersprozesse, Lärm, toxische Substanzen oder Sauerstoffmangel).

2.1 Angeborene Schwerhörigkeit

Es sind mehr als 100 Gene bekannt, deren Mutationen zu Schwerhörigkeit führen können (4). Viele Formen von SH sind entsprechend den Mendel'schen Gesetzen vererbbar. Gleichzeitig sind sie genetisch sehr heterogen, da die Expression der mutierten Gene durch eine Vielzahl von Modifiziergenen verändert wird (5). Im Prinzip können genetische Defekte die Funktion jeder anatomischen Struktur im Innenohr betreffen (<http://hereditaryhearingloss>; 6).

Exemplarisch sollen drei Mutationen erwähnt werden. Die Öffnung der MET in den Haarbündeln ist ein kritischer Prozess im Hörprozess, etwa 30 genetische Defekte sind Proteinen der Haarbündel zuzuordnen. Darunter sind Gene, die für Myosin, Actin-bindende und -vernetzende Proteine sowie transmembranöse Proteine kodieren (6-9). Ein Gen, das sowohl bei angeborener als auch bei erworbener SH eine Rolle spielt, ist Cadherin 23 (CDH23, auch Otocadherin; 5,10). Die Cadherin-Protein-Familie gehört zu den Adhäsionsproteinen (5). Mutationen von CDH23 sind beteiligt sowohl bei der Entstehung von angeborener SH (DFNB12, autosomal rezessive SH und dem Usher Syndrom Typ1, Subtyp D) als auch der Altersschwerhörigkeit (ASH, Presbycusis). Cadherin ist Bestandteil der Tip-links und steht in Verbindung zu Actin der Stereocilien. Calcium bindende Substanzen schädigen die Bindung zwischen den Tip-links (10).

In ÄHZ hat das Motorprotein *Prestin* (SLC26A5) die Aufgabe, das Schallsignal zu verstärken. Durch einen genetischen Defekt (Transition A-zu-G am Intron 2/Exon 3) entsteht eine sensori-neurale SH, die autosomal rezessiv vererbt wird. Die Amplifikation des akustischen Signals ist nicht möglich und dadurch entsteht eine Verschiebung der Hörschwelle von 40 - 50 dB (11). Wir konnten zeigen, dass die Expression von *Prestin* auch durch äußere Faktoren verändert werden kann (12).

Eine weitere kritische Stelle im Hörprozess ist die Signalübermittlung von IHZ zu SGN und zum Hirnstamm; eine Punktmutation des PJVK (Pejvakin; dt. Echo) Proteins führt zu einer sensori-neuralen SH, die autosomal rezessiv vererbt wird und besonders im Iran, in Marokko und der Türkei vorkommt (13). Hierbei sind die HZ intakt. Die Wirkungsweise des PJVK-Proteins ist noch nicht geklärt.

2.2 Erworbene Schwerhörigkeit

Auf Grund ihrer Häufigkeit sind die Formen von erworbener SH von größter Bedeutung. Häufige Ursachen für eine erworbene SH sind: 1.) Akuter und chronischer Lärm, 2.) Alternsprozesse und 3.) Erkrankungen, die zu einem Sauerstoffmangel im Innenohr führen. Hierzu gehören Herz-Kreislaufkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Hyperlipidämie, Diabetes mellitus oder Erkrankungen mit Beeinträchtigung der Durchblutung wie Schädeltrauma, Entzündungen des Mittelohres, aber auch Menier'sche Erkrankung (14). Sauerstoffmangel kann praktisch bei fast allen Ursachen eine Rolle spielen, wobei die Rolle des Sauerstoffmangels schwer zu definieren ist. 4.) Ototoxische Substanzen (Medikamente, Cisplatin, Salicylate), Schwermetalle, Rauchen, Alkohol und sogar sozio-ökonomische Faktoren können ebenfalls zu SH und TI führen.

Eine bemerkenswerte Besonderheit der erworbenen SH ist die Tatsache, dass genetische Faktoren ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Die ASH zeigt eine familiäre Häufung, wobei etwa 35-55 % der sensorischen Presbyakusis auf genetische Faktoren zurückgeführt werden können, bei Frauen häufiger als bei Männern. Kenntnisse über molekulare Mechanismen von ASH und Lärmschwerhörigkeit (LSH) ergeben sich neben den genetischen Defekten aus humanen Assoziations-Studien (sie assoziieren Krankheiten mit Merkmalen des Genoms), knockout (KO) Studien bei Tieren (selektive Ausschaltung von Genen) und der Analyse des Hörvermögens bei Tieren mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund (vor allem Inzucht-Mäuse (15)).

Assoziationsstudien zeigen Beziehungen zwischen der erworbenen SH und dem Auftreten von Einzelnukleotid-Genpolymorphismen folgender Gene: *GRM7* (kodiert den metabotropen Glutamat-Rezeptor, Typ 7; beeinflusst wahrscheinlich die Empfindlichkeit gegenüber Excitotoxizität); *VGLUT3* (kodiert den vesikulären Glutamat-Transporter-3; Gen ist auch verantwortlich für DFNA25, eine autosomal-dominante Form einer progressiven, Hochton-, nicht-syndromischen Taubheit; *VGLUT3* transportiert Glutamat in die synaptische Vesikel der IHZ, damit diese Glutamat bei einem akustischen Reiz an die afferenten Neurone abgeben können); *GSTM*, *GSTT1* (Glutathione S-transferase) und *NAT* (N-acetyltransferase) gehören zu zwei Klassen von antioxidativ wirkenden Enzymen, die in der Cochlea aktiv sind.

Knockout-Studien bei Tieren zeigen Beziehungen zwischen SH und folgenden Genen: Calcium-Kanäle vom T-Typ, der Plasma Membran Calcium ATPase 2 (PMCA2; transportiert Ca^{++} aus der Zelle), dem *VGLUT3* (s.o.) und dem ApoE-Gen (ApoE-KO Mäuse entwickeln eine deutliche Hyperlipidämie, Atherosklerose, eine endotheliale Dysfunktion und eine SH, besonders für die hohen Frequenzen. Die Stenose von Gefäßen könnte eine Hypoxie/Ischämie des Innenohres erzeugen).

Studien an Inzucht-Mäuse-Stämmen zeigen Beziehungen zwischen SH und verstärkter ROS-Bildung (Fischer Ratten F344), zwischen SH und Hypoxie (CD/1 Mäuse) und zwischen SH und Mutationen des *CDH23* Gens (C57BL/6J Mäuse).

2.3 Hypoxie-induzierte Schwerhörigkeit (HSH)

Klinische Beobachtungen sprechen dafür, dass Hypoxie an der Entwicklung von SH beteiligt ist. Man schätzt, dass etwa 10% der SH von Neugeborenen durch Hypoxie bedingt sind. Auch bei Erwachsenen scheint Hypoxie eine Rolle zu spielen, weil Personen mit Atherosklerose und Schlaganfall, Krankheiten die mit einer Hypoxie oder Ischämie verbunden sind, häufig eine SH aufweisen. Die Mechanismen der Entwicklung einer Hypoxie-bedingten SH sind weitestgehend unklar.

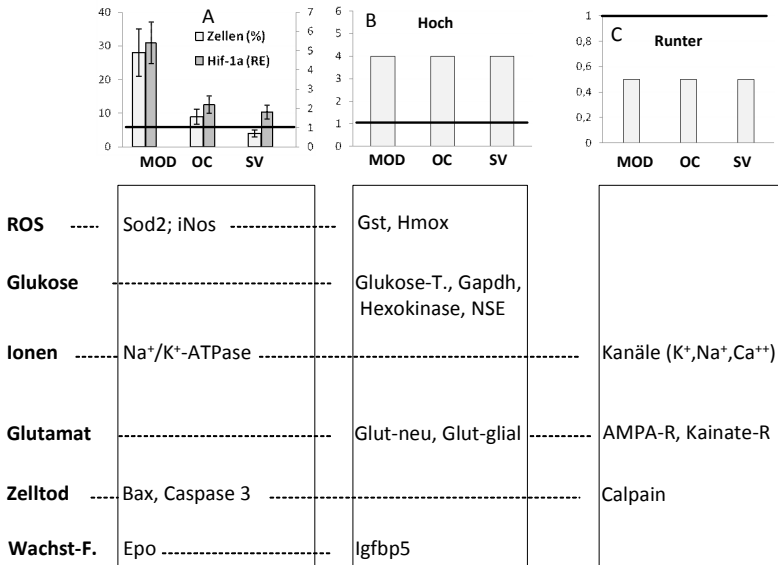
Einen Einblick in molekulare Mechanismen von HSH kann man durch Analyse der Genexpression nach Hypoxie-Einwirkung auf die Strukturen des Innenohres gewinnen. Hierzu können Microarrays eingesetzt werden. Wir nutzten einen Chip mit 1323 Genen. Ein solches Verfahren erlaubt eine hohe Anzahl von Genen zu untersuchen und damit jene Gene zu identifizieren, die bei Hypoxie aktiviert oder gehemmt werden und wahrscheinlich kritische Faktoren für eine gestörte Funktion darstellen (16).

Die anatomische und funktionelle Komplexität des Innenohres erfordert eine differenzierte Analyse der einzelnen Strukturen. Die Cochlea enthält drei wichtige Regionen, die sich in der anatomischen Struktur, der zellulären Zusammensetzung und Funktion grundsätzlich unterscheiden: SV, OC und MOD. Die *Stria vascularis* (SV) ist eine gefäßreiche Region mit verschiedenen endothelialen und epithelialen Zellen, die der Aufrechterhaltung des Ionen-Milieus der Flüssigkeitsräume dienen. Das *Corti-Organ* (OC) enthält die neurosensorischen Zellen *ÄHZ* und *IHZ*, sie transformieren akustische in elektrische Signale. Der *Modiolus* (MOD) enthält SGN und ist zuständig für die Verarbeitung der Signale und ihre Weiterleitung an Kerngebiete des ZNS. In bisherigen Genexpressions-Analysen wurde die Cochlea immer als Ganzes untersucht.

2.3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression in MOD, OC und SV

Ein einfaches Modell, den Einfluss von Sauerstoffmangel auf ausgewählte Strukturen des Innenohres zu untersuchen, sind organotypische Kulturen (OK) des Innenohres von Neugeborenen-Ratten (3-5 Tage alt). Zu diesem Zeitpunkt sind die wesentlichen anatomischen Strukturen ausgebildet. Gegenüber einer Einzelzellkultur hat die OK den Vorteil, dass innerhalb einer Teil-Region des Innenohres die Zell-Zell-Verbindungen erhalten bleiben. Je nach experimentellen Bedingungen können die Kulturen in einem speziellen Behälter (Billupskammer) einer definierten Sauerstoffmangel-Atmosphäre ausgesetzt werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der guten Zugänglichkeit zu den Innenohr-Strukturen. Ein Nachteil besteht darin, dass es sich um Gewebe von Neugeborenen handelt und die Reaktion des Gewebes auf ein Trauma möglicherweise anders ist als das von Erwachsenen-Gewebe.

Abb. 2 zeigt typische Muster von Genveränderungen, die in Beziehung zum Überleben bzw. Tod der Zellen stehen. Diese Gene können in 6 Gruppen eingeordnet werden: a.) Gene, die in Beziehung zur Bildung oder Elimination von Sauerstoff-Radikalen (ROS, reaktive Sauerstoffspezies) stehen; b.) Gene, die in Beziehung zum Transport und Stoffwechsel der Glukose als Haupt-Energie-Lieferant stehen; c.) Gene, die in Beziehung zur Regulation der Ionen-Homöostase stehen, insbesondere von K^+ und Ca^{++} ; d.) Gene, die in Beziehung zur synaptischen Signal-Transduktion von *IHZ* und SGN stehen; e.) Gene, die direkt den Zelltod einleiten; f.) Gene, die in Beziehung zur Regeneration von geschädigten Zellen stehen, das sind vor allem Wachstumsfaktoren.



Abkürzungen vergleiche Text. RE –Relative Einheiten. A-Reaktionstyp ähnlich Zelltod und Hif-1a Expression. Verlust von Zellen und Hif-1a mRNA Expression 24 Stunden nach Präparation der OK und 5-Stunden Hypoxie-Exposition der OK. Bestimmung der abgestorbenen Zellen nach (29) und des Hif-1a Gehaltes nach (30). B – Hochregulation der Genexpression in allen Regionen. C – Runterregulation in allen Regionen.

Abb. 2: Veränderungen der Genexpression in Modiolus, Organ of Corti und Stria vascularis.

Einen ersten Einblick in die Empfindlichkeit der verschiedenen Strukturen des Innenohres kann man erhalten, indem man den Anteil toter und lebender Zellen in der OK bestimmt (Abb. 2A). Der höchste Anteil toter Zellen findet sich in der MOD-Region, am wenigsten empfindlich sind die Zellen der SV, die Empfindlichkeit der Zellen des OC liegt dazwischen. Dieses Muster ist durchaus plausibel, befinden sich doch in dem Modiolus die SGN und im OC die neurosensorischen HZ. Aus Untersuchungen am ZNS ist gut bekannt, dass Neuronen gegenüber Hypoxie empfindlicher sind als andere Zellen.

Die Veränderungen der Genexpression können drei typischen Mustern zugeordnet werden.

Abb. 2A. enthält das Expressionsmuster von *Hif-1a*, einem universellen Regulator der zellulären und molekularen Prozesse, sowohl des Zelltdes als auch des Zellüberlebens. Der Anstieg des Hif-1a mRNA-Gehaltes ist ein guter Indikator für das Vorliegen von Sauerstoffmangel. Es soll betont werden,

dass das Muster der Hif-1a mRNA Expression dem der HIF-1a Aktivität entspricht (17). Von besonderem Interesse ist, dass die Hif-1a mRNA Expression ein ähnliches Muster wie der Zelltod zeigt. HIF-1a (Gene ID: 29560, hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit) ist ein Transkriptionsfaktor (TF), der die Transkription einer Vielzahl von Genen (etwa 100) unter Bedingungen des Sauerstoffmangels reguliert und damit die Anpassung an Hypoxie. Die auffällige Übereinstimmung des Musters von toten Zellen und der Expression des TFs HIF-1a (Abb. 2A) lässt vermuten, dass HIF-1a sowohl in die Regulation der Gene des Zelltodes als auch in die des Überlebens involviert ist.

Zu den Genen, die ein ähnliches Muster wie Hif-1a zeigen, gehören eine Reihe weiterer Gene. Bei *SOD2* (Gene ID 24787, mitochondriale Isoform der Superoxide Dismutase; Abb. 2, unterer Teil) handelt es sich um die mitochondriale Superoxid-Dismutase, ein Enzym, das Sauerstoff-Radikale, die in Mitochondrien entstehen, beseitigt. Die Tatsache, dass es sich gerade um das mitochondriale Enzym handelt, ist nicht zufällig. Inzwischen ist bekannt, dass Mitochondrien die ersten Organellen sind, die auf einen Sauerstoffmangel reagieren. Sowohl die Stärke der Expression als auch die zelluläre Lokalisation der entsprechenden Proteine deuten darauf hin, dass die Bildung von Sauerstoff-Radikalen eine wichtige Rolle für das Schicksal der Zellen bei Hypoxie spielt. Bei *iNOS* (Gene ID: 24599, nitric oxide synthase 2) handelt es sich um die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, das Enzym synthetisiert das Gas Stickstoff-Monoxid/NO. NO hat verschiedene Funktionen im Innenohr: a.) Es wirkt in der Signal-Transduktion über die Beeinflussung der Aktivität der K^+ - und Ca^{++} -Kanäle und der mitochondrialen Atmung; 2.) Niedrige Konzentrationen fördern die Durchblutung; hohe Konzentrationen wirken in Kombination mit Superoxid-Radikalen toxisch durch die Bildung von Peroxinitrit. Die Na^+/K^+ -*Atp-ase* (Gene ID 24211, Atp1a1 ATPase, Na^+/K^+ -transporting, alpha 1 polypeptide) gehört ebenfalls in diese Gruppe. Bei Hypoxie kommt es zum Austritt von K^+ aus den Zellen und zum Einstrom von Na^+ - und Ca^{++} -Ionen und damit zu einer Depolarisation, die verbunden ist mit der Freisetzung von Glutamat an den synaptischen Verbindungen und dem weiteren Einstrom von Calcium in die Zellen. Die Aktivierung und erhöhte Expression von K^+/Na^+ -ATP-ase ist fundamental für die Wiederherstellung der Ionen-Homöostase. *BAX* (Gene ID 24887; Bcl2-associated x-Protein) und *CASPASE 3* (Gene ID 24887; cysteine-aspartic acid protease) sind Proteine, die direkt an der Einleitung des apoptotischen Zelltodes beteiligt sind. Bemerkenswerterweise gehört in die Gruppe der Wachstumsfaktoren *Erythropoietin* (Gene ID: 24335). Inzwischen weiß man, dass

Erythropoietin protektiv für verschiedene neuronale Zellen wirkt. Es ist gut möglich, dass diese Faktoren beteiligt sind an dem charakteristischen Schädigungsmuster der untersuchten Regionen des Innenohres, d. h. der relativ hohen Empfindlichkeit von SGN und HZ gegenüber Hypoxie.

Eine Vielzahl von Genen gehört zu einem *Reaktionstyp*, bei dem es zu einer Hochregulation in allen Regionen kommt, mit und ohne korrelative Beziehung zu Hif-1a oder dem Zelltod (Abb. 2B). Hierzu gehören Enzyme, die antioxidativ wirken, wie die *Glutathion-S-Transferase* (Gene ID: 24421, die *Hämoxxygenase* (Gene ID: 24451, heme oxygenase) verschiedene Enzyme der *Glykolyse* und zahlreiche *Wachstumsfaktoren*. Ein solches Verhalten ist auch nachzuweisen für den neuronalen und glialen *Glutamat Transporter*. Funktion dieser Transporter ist es, Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu entfernen. Steigt die Glutamat-Konzentration an, kommt es zur sogenannten Excitotoxizität, d. h. zum Zelltod durch Überaktivierung der Zellen und den damit verbundenen Einstrom von Calcium-Ionen.

Zu einem *dritten Reaktionstyp* gehören Gene, die in allen Regionen runter-reguliert werden, (Abb. 2C). Interessanteweise gehören hierzu fast alle Ionenkanäle (Na^+ , K^+ , Ca^{++}), Glutamatrezeptoren (*AMPA*, Gene ID: 171571, glutamate receptor interacting protein 2; *Kainat*, Gene ID 24407, glutamate receptor, ionotropic, kainate 5) und *Calpain 1* (Gene ID: 29156), das am Zelltod über Nekrose beteiligt ist. Alle diese Reaktionen sind Ausdruck der Anpassung an den Sauerstoffmangel.

Diese Reaktionsmuster für sich sind noch kein Kriterium für kausale Beziehungen. Aber in Verbindung mit Beobachtungen aus anderen Hypoxie-Modellen und aus dem Verständnis der molekularen Reaktionen dieser Signalwege, kann man Mechanismen ableiten, die an der Entstehung von Hypoxie-bedingter SH beteiligt sind (Abb. 3). Man nimmt heute an, dass Mitochondrien der erste Sensor für Hypoxie sind (18). Bei Hypoxie ändert sich ihre Funktion. Schlüsselprozesse sind die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Bildung von Stickstoffmonoxyd NO und die Aktivierung von HIF-1a. HIF-1 steuert die Expression von zahlreichen Genen, die geeignet sind, das Überleben der Zellen zu gewährleisten. Dazu gehören die Expression von iNos, Sod2, Glykolyse-Enzymen, von Glukose-Transportern und verschiedenen Wachstumsfaktoren, die das Überleben vieler Zellen sichert. In Zellen, mit ausgeprägter Bildung von Superoxid-Anionen und NO kommt es zur Bildung von toxischem Peroxinitrit, das u. a. Bax und Caspase 3 aktiviert und damit den Tod dieser Zellen einleitet. Ein zweiter Mechanismus ist die sogenannte Excitotoxizität. Infolge Hypoxie-induzierter Depola-

risation kommt es in IHZ zu erhöhter Glutamat-Freisetzung und erhöhtem Calcium-Einstrom, verbunden mit der Aktivierung der Apoptose-Gene Bax und Caspase 3. Beide Prozesse führen vor allem zum Tod von Zellen der SGN und der IHZ.

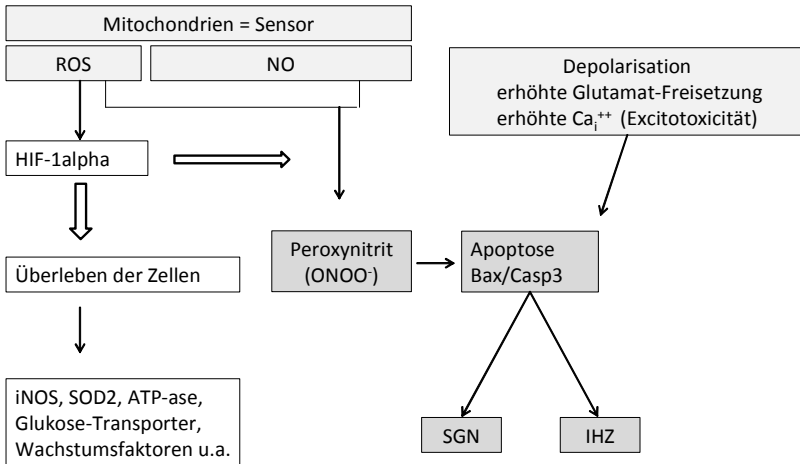


Abb. 3: Mechanismen des Verlustes von Neuronen der Spiralganglien und von inneren Haarzellen infolge Hypoxie (Hypothese). Abkürzungen vergleiche Text. SGN-Spiralganglienneurone, IHZ-innere Haarzellen.

2.3.2 Vulnerabilität von inneren und äußeren Haarzellen

Haarzellen sind die entscheidenden Strukturen bei der mechanisch-elektrischen Signalumwandlung. Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigte, dass IHZ empfindlicher gegenüber Hypoxie sind als ÄHZ (19,20). Für die Untersuchungen der Hypoxie-Empfindlichkeit beider Zell-Typen, sind Genexpressionsanalysen weniger gut geeignet, da bisher IHZ und ÄHZ nicht in ausreichender Menge isoliert werden können. Da IHZ und OHZ durch ihre Lokalisation im OC gut charakterisiert werden können, ist es möglich durch spezifische Inhibitoren die Vulnerabilität in Hypoxie zu untersuchen (21). Eine mögliche Excitotoxizität kann nachgewiesen werden durch Einsatz von Substanzen, die den NMDA-Kanal blockieren. Solche Substanzen sind Mg^{++} - Ionen, die den NMDA-Kanal blockieren und MK801, ein nicht-kompetitiver Antagonist von NMDA-Rezeptoren. Sowohl Mg^{++} als auch MK801 wirken protektiv auf eine Hypoxie-Induzierte Schädigung von Haarzellen, wobei interessant ist, dass IHZ deutlich stärker geschützt werden als ÄHZ.

Da PMCA eine wichtige Rolle für den Calcium-Auswärts-Transport spielt, prüften wir, ob der Einsatz von PMCA-Inhibitoren (z. B. Eosin) die Überlebensrate der Zellen bei Hypoxie verschlechtern (22,23). Tatsächlich beobachteten wir eine Dosis-abhängige Zunahme der Schädigung von Haarzellen bei Hypoxie-Exposition. Alle diese Befunde sprechen dafür, dass IHZ ähnlich wie SGN über excitotoxische Mechanismen geschädigt werden und dann irreversibel verloren gehen.

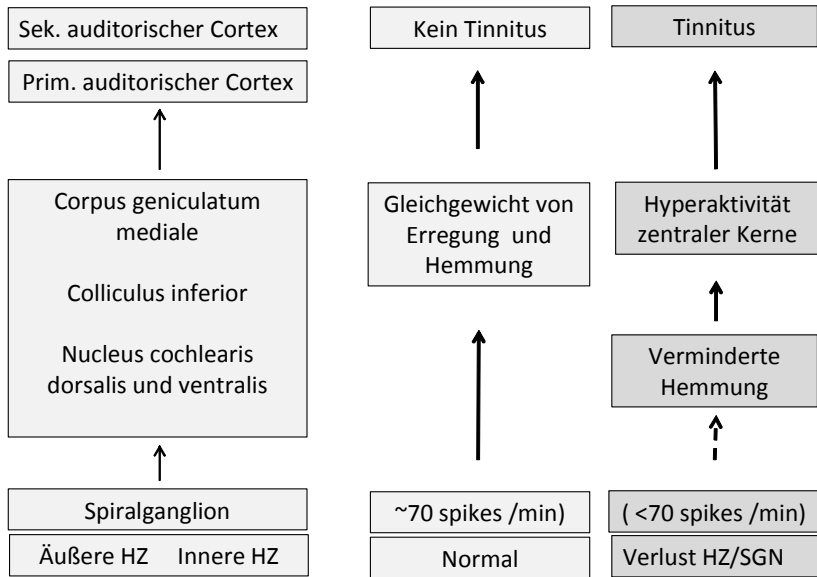
3. Tinnitus

Der *subjektive Tinnitus*, die Wahrnehmung eines Phantom-Geräusches betrifft ungefähr 5-15% der Erwachsenen (24). An einer moderaten oder schweren, chronischen Form, die die Lebensqualität deutlich beeinflusst und zu Stress, Depression, Angst, Schlafstörungen und Einschränkungen der Arbeitsfähigkeit führt, leiden etwa 1-3 % der Erwachsenen. Tinnitus ist oft mit SH assoziiert, die ihre Ursache in Läsionen der Cochlea hat. Der Cochlea-Schaden löst den Tinnitus wahrscheinlich aus, aber die Tinnitus-Entstehung, der Tinnitus-Generator ist zentral lokalisiert. Das wird belegt durch klinische Studien, bei denen der Hörnerv durchtrennt wurde und der Tinnitus trotzdem weiter bestand. Grundlage für die Veränderungen in höheren auditorischen Kernen des ZNS sind spontane Aktionspotentiale, die ständig von der Peripherie ins Zentrum gesendet werden, auch wenn kein akustischer Reiz vorliegt (25). Man nimmt an, dass sie ihren Ursprung in der Glutamat-Freisetzung in IHZ haben.

Sowohl humane als auch Tierstudien belegen, dass der Tinnitus in Beziehung steht zu einer *Hyperaktivität* von zentralen auditorischen Kerne wie dem Dorsal Cochlear nucleus, dem Inferior Colliculus oder dem Auditorischen Cortex (Abb. 4; 24). Typischerweise führen cochleare Pathologien wie akustisches Trauma oder HZ-Degeneration zu einer Verminderung der spontanen Feuerungsrate im auditorischen Nerv. Der Verlust dieser excitatorischen Signale aus der Peripherie reduziert die Hemmung im zentralen auditorischen System, dabei kommt es zentral zu einer Hyperaktivität. Cochlearer Hörverlust stimuliert das Faserwachstum und die Bildung von Synapsen im ventralen cochlear nucleus. Viele dieser Fasern sind excitatorisch.

Die zellulären und molekularen Mechanismen des Tinnitus sind gekennzeichnet durch die Down-Regulation der inhibitorischen oder die Hochregulation der excitatorischen Neurotransmission in den auditorischen Kernen (26). Da die Prozesse des ZNS streng reguliert sind, führen kompensatorische Prozesse in einem System zu Veränderungen in anderen Systemen. Bei Tie-

ren gelingt es tatsächlich, durch Erhöhung der GABA-Konzentration im Corpus geniculatum mediale den Tinnitus zu vermindern. Versuche, mit GABA-Agonisten oder Glutamat-Antagonisten eine Verminderung des Tinnitus beim Menschen zu erreichen, sind fehlgeschlagen. Das ist ein Ausdruck dafür, dass die Prozesse in Wahrheit komplexer sind. Diese Veränderungen der Aktivität von Neurotransmittern sind eng mit Veränderungen der Expression von Wachstumsfaktoren und Zytoskelett-Proteinen verbunden (27,28).



Links: Hörbahn, beginnend in den äußeren und inneren Haarzellen, über neuronale Kerne des Stammhirns bis zum Cortex. Mitte: Gleichgewicht von Erregung und Hemmung in den zentralen Kernen; Rechts: Verlust von SGN und Haarzellen mit dem Ergebnis verminderter Signalbildung im Innenohr.

Abb. 4: Mechanismen, die zur Entstehung des Tinnitus beitragen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Analyse von Genmutationen, die mit angeborener Schwerhörigkeit verbunden sind, und die Analyse von Veränderungen der Genexpression von erworbenen Formen von Schwerhörigkeit haben Einblicke in molekulare Mechanismen von Schwerhörigkeit und Tinnitus gewährt. Es sind mehr als 100 Gene bekannt, deren Mutationen zu angeborener Schwerhörigkeit füh-

ren. Diese kommt zustande, weil Proteine des Innenohres so verändert sind, dass sie ihre normale Funktion nicht mehr ausführen können. Sehr viel häufiger als die angeborene SH ist die erworbene Schwerhörigkeit. Sie entsteht durch den irreversiblen Verlust von neurosensorischen Zellen des Innenohres (Spiralganglien-Neurone und Haarzellen). Ursachen für eine erworbene SH sind u.a. akuter und chronischer Lärm, Alternsprozesse und Erkrankungen, die zu einem Sauerstoffmangel führen.

Ein einfaches Modell, den Einfluss von Sauerstoffmangel auf das Hörorgan zu untersuchen sind Organo-typische Kulturen (OK) des Innenohres von Neugeborenen-Ratten (3-5 Tage alt). Die Zellen der Modiolus-Region erwiesen sich als besonders empfindlich gegenüber Hypoxie, am wenigsten empfindlich waren Zellen der Stria vascularis, die des Corti-Organs lagen dazwischen. Innere Haarzellen sind deutlich empfindlicher als äußere Haarzellen. Das Verteilungsmuster von toten Zellen korreliert eng mit dem Expressionsmuster von Hif-1a, einem universellen Regulator der zellulären und molekularen Prozesse in Hypoxie. Die Expressionsmuster von Genen, die mit dem Zelltod und Zell-Überleben in Beziehung stehen, lassen vermuten, dass zwei wesentliche Prozesse zum Zelltod unter Hypoxie führen: a) Die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO), die zum toxischen Peroxynitrit reagieren. b) Ein zweiter Mechanismus ist die Excitotoxizität und die Ca^{++} -Überladung der Zellen.

Sowohl humane als auch Tierstudien belegen, dass Tinnitus in Beziehung steht zu einer Hyperaktivität der zentralen auditorischen Kerne (Dorsal Cochlear nucleus, Inferior Colliculus, Auditorischer Cortex). Typischerweise führen cochleare Pathologien wie akustisches Trauma oder Haarzell-Degeneration zu einer Verminderung der spontanen Feuerungsrate im auditorischen Nerv. Der Verlust dieser excitatorischen Signale aus der Peripherie reduziert die Hemmung im zentralen auditorischen System, dadurch kommt es zentral zu einer Hyperaktivität, die als Geräusch wahrgenommen wird.

Die Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen von Schwerhörigkeit und Tinnitus können beitragen, neue Therapien für SH und Tinnitus zu entwickeln. Die neurosensorischen Zellen werden nur einmal in der embryonalen Entwicklung gebildet, wenn Sie absterben, können sie nicht ersetzt werden. Heute wird eine Schwerhörigkeit behandelt, indem man den Schall mit Hörgeräten verstärkt. Zweifelsohne wäre es sehr gut, wenn diese Zellen regeneriert werden könnten, so wie bei Vögeln oder Amphibien. Bei ihnen bilden sich aus Stützzellen neue Haarzellen, wenn diese (z. B. bei Vögeln durch Sauerstoffmangel in der Höhenluft) verloren gehen. Tatsächlich ist das

Innenohr ein bevorzugtes Organ für die Gentherapie beim Menschen, weil es gut zugänglich ist und ein abgeschlossenes Kompartiment darstellt. Die Gentherapie des Innenohres ist z.Z. Gegenstand der experimentellen Forschung. Kernpunkt ist, HZ und Neurone der SG wiederherzustellen.

Literatur

1. Stover, T. and Diensthuber, M. (2011) *Laryngorhinootologie* 90 Suppl 1, S22-S34
2. Giacomello, M., De, M. A., Primerano, S., Brini, M., and Carafoli, E. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 679-683
3. Manley, G. A. and Robertson, D. (1976) *J. Physiol* **258**, 323-336
4. Petit, C. and Richardson, G. P. (2009) *Nat. Neurosci.* **12**, 703-710
5. McHugh, R. K. and Friedman, R. A. (2006) *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **288**, 370-381
6. Richardson, G. P., de Monvel, J. B., and Petit, C. (2011) *Annu. Rev. Physiol* **73**, 311-334
7. Raviv, D., Dror, A. A., and Avraham, K. B. (2010) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1214**, 168-179
8. Op de, B. K., Schacht, J., and Van, C. G. (2011) *Hear. Res.* **281**, 18-27
9. Petit, C. (1996) *Nat. Genet.* **14**, 385-391
10. Schultz, J. M., Bhatti, R., Madeo, A. C., et al. (2011) *J. Med. Genet.* **48**, 767-775
11. Dallos, P. (2008) *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 370-376
12. Gross, J., Angerstein, M., Fuchs, J., Stute, K., and Mazurek, B. (2011) *Cell Mol. Neurobiol.* **31**, 1089-1101
13. Delmaghani, S., del Castillo, F. J., Michel, V., Leibovici, M., et al. (2006) *Nat. Genet.* **38**, 770-778
14. Shea, P. F., Richey, P. A., Wan, J. Y., and Stevens, S. R. (2012) *Laryngoscope* **122**, 204-211
15. Chen, G. D. and Fechter, L. D. (2003) *Hear Res* **177**, 81-90
16. Lu, C. C., Appler, J. M., Houseman, E. A., and Goodrich, L. V. (2011) *J. Neurosci.* **31**, 10903-10918
17. Mazurek, B., Rheinlander, C., Fuchs, F. U., Amarjargal, N., Kuban, R. J., Ungethum, U., Haupt, H., Kietzmann, T., and Gross, J. (2006) *HNO.* **54**, 689-697
18. Brune, B. and Dehne, N. (2012) *Antioxid. Redox. Signal. (in press)*
19. Mazurek, B., Winter, E., Fuchs, J., Haupt, H., and Gross, J. (2003) *Hear. Res.* **182**, 2-8
20. Mazurek, B., Amarjargal, N., Haupt, H., and Gross, J. (2006) *Hear. Res.* **215**, 31-38
21. Gross, J., Machulik, A., Amarjargal, N., et al. (2007) *Brain Res* **1162**, 56-68
22. Amarjargal, N., Mazurek, B., Haupt, H., Andreeva, N., Fuchs, J., and Gross, J. (2008) *Physiol. Res.* **57**, 631-638

23. Amarjargal, N., Andreeva, N., Gross, J., Haupt, H., Fuchs, J., Szczepek, A. J., and Mazurek, B. (2009) *Physiol Res.* **58**, 895-902
24. Kraus, K. S., Ding, D., Jiang, H., Lobarinas, E., Sun, W., and Salvi, R. J. (2011) *Neuroscience* **194**, 309-325
25. Trapani, J. G. and Nicolson, T. (2011) *J. Neurosci.* **31**, 1614-1623
26. Brozoski, T., Odintsov, B., and Bauer, C. (2012) *Front Syst. Neurosci.* **6(9)**, 1-12
27. Wang, H., Brozoski, T. J., Ling, L., Hughes, L. F., and Caspary, D. M. (2011) *Neuroscience* **172**, 453-459
28. Tan, J., Ruttiger, L., Panford-Walsh, R., Singer, W., Schulze, H., Kilian, S. B., Hadjab, S., Zimmermann, U., Kopschall, I., Rohbock, K., and Knipper, M. (2007) *Neuroscience* **145**, 715-726
29. Gross, J., Machulik, A., Moller, R., Fuchs, J., Amarjargal, N., Ungethuem, U., Kuban, R. J., Szczepek, A. J., Haupt, H., and Mazurek, B. (2008) *Growth Factors.* **26**, 180-191
30. Gross, J., Rheinlander, C., Fuchs, J., Mazurek, B., Machulik, A., Andreeva, N., and Kietzmann, T. (2003) *Hear Res* **183**, 73-83