

Der Einfluss von Cholesterin auf die Motilität der
äußeren Haarzellen der Meerschweinchencochlea und
auf das Motorprotein Prestin

Johannes Michael Schmid

Meinen Eltern

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Der Einfluss von Cholesterin auf die Motilität der
äußeren Haarzellen der Meerschweinchencochlea und
auf das Motorprotein Prestin

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johannes Michael Schmid

aus
München

Jahr
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. M. Canis
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Magdalena Götz Prof. Dr. Frank Staub
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	1
1. Bedeutung des Hörens	1
2. Anatomie des Innenohres	2
3. Physiologie der Cochlea	5
3.1 Schallübertragung und Tonotopie	5
3.2 Endocochleäres Potenzial und mechanoelektrische Transduktion.....	5
3.3 Signalverstärkung durch die äußeren Haarzellen	7
3.4 Informationsübertragung durch die inneren Haarzellen.....	11
4. Motorprotein Prestin und Feinaufbau der Zellmembran der äußeren Haarzellen.....	11
4.1 Identifizierung von Prestin	11
4.2 Feinbau der Zellmembran der äußeren Haarzellen	12
4.3 Struktureller Aufbau und Lokalisation von Prestin.....	13
4.4 Funktion von Prestin	15
5. Nichtlineare Kapazität und Elektromotilität von äußeren Haarzellen.....	16
6. Cholesterin und sein Einfluss auf den Hörvorgang	17
6.1 Chemische Struktur und allgemeine Bedeutung	17
6.2 Bedeutung von Cholesterin für die Plasmamembran	19
6.3 Wirkungen von Cholesterin auf das Innenohr.....	20
7. Fragestellung und Zielsetzung.....	24
II. Material und Methoden.....	26
1. Material	26
1.1 Geräte	26
1.2 Verbrauchsmaterial	27
1.3 Chemikalien und Lösungen.....	27
1.3.1 Chemikalien.....	27
1.3.2 Lösungen	28
1.4 Software.....	29

2. Methoden.....	29
2.1 Präparation der Cochlea und der äußeren Haarzellen	29
2.2 Patch-Clamp-Experimente	31
2.2.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik	31
2.2.2 Aufbau und Ausstattung des Messplatzes	33
2.2.3 Herstellung der Messelektroden	35
2.2.4 Befüllung der Messelektroden.....	35
2.2.5 Herstellung der Lösungen	35
2.2.6 Messung des Elektrodenwiderstandes und Offsetkorrektur	37
2.2.7 Whole-cell-Patch-Clamp und Stimulation	38
2.2.8 Videomikroskopische Aufnahmen	39
2.2.9 Statistische Analysen.....	40
III. Ergebnisse	41
1. Charakterisierung der Studie und allgemeine Ergebnisse	41
2. Motilität der äußeren Haarzellen bei physiologischen Bedingungen.....	42
3. Motilität der äußeren Haarzellen unter dem Einfluss von Cholesterin	43
3.1 Cholesterinkonzentration von 0,1 mmol/l	44
3.2 Cholesterinkonzentration von 0,5 mmol/l	44
3.3 Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l	44
3.4 Cholesterinkonzentration von 1,5 mmol/l	45
4. Einfluss von Cholesterin auf das Motorprotein Prestin.....	46
4.1 Motilität der äußeren Haarzellen unter physiologischen Bedingungen bei Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration auf 6 mmol/l	47
4.2 Motilität der äußeren Haarzellen bei Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration auf 6 mmol/l und einer extrazellulären Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l	48
IV. Diskussion	50
1. Verfahren zur Messung der Elektromotilität.....	50
1.1 Allgemeine Betrachtungen	50
1.2 Nichtoptische Methode.....	50
1.3 Optische Methoden.....	51

2.	Motilität der äußeren Haarzellen bei physiologischen Bedingungen.....	53
3.	Einfluss von Cholesterin auf die Motilität der äußeren Haarzellen	55
3.1	Allgemeine Betrachtungen	55
3.2	Abhängigkeit der Motilität der äußeren Haarzellen von der Cholesterinkonzentration.....	56
3.2.1	Einfluss von Cholesterin auf die maximale Verkürzung und maximale Verlängerung	56
3.2.2	Einfluss von Cholesterin auf die maximale Steigung, auf die durchschnittlichen Längenänderungen und auf die Spannung V_{pkc}	58
3.3	Einfluss von Cholesterin auf das Motorprotein Prestin und auf die Zellmembran der äußeren Haarzellen	60
3.3.1	Einfluss von Chlorid auf die Motilität der äußeren Haarzellen.....	60
3.3.2	Einfluss von Cholesterin bei halbmaximaler Prestinfunktion.....	62
V.	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
VI.	Abkürzungsverzeichnis	68
VII.	Abbildungsverzeichnis.....	69
VIII.	Tabellenverzeichnis	71
IX.	Literaturverzeichnis.....	72
X.	Danksagung	78
XI.	Publikationen.....	79
XII.	Lebenslauf.....	81

I. Einleitung

1. Bedeutung des Hörens

Die auditive Wahrnehmung ist für die zwischenmenschliche Kommunikation und die Informationsaufnahme von existenzieller Bedeutung. Mehr als jeder andere Sinn ist das Hören für die menschliche Sprache und ihre Entwicklung verantwortlich (Schmidt 2007). Hörstörungen stellen eine gravierende Einschränkung der Lebensqualität und Arbeitsfähigkeit dar und führen nicht selten zu einer sozialen Isolation. Diesen Sachverhalt gibt auch folgendes Zitat wieder, das dem Philosophen Immanuel Kant zugeschrieben wird: „Nicht Sehen trennt von den Dingen, nicht Hören trennt von den Menschen“ (Suckfüll 2005). Erkrankungen des Innenohres, des Hörnervs und der entsprechenden Bereiche im Gehirn können durch exogene und endogene Faktoren wie Hypoxie, Lärm, Hypertonus, genetische Einflüsse und metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie bedingt sein (Mazurek et al. 2008). Insbesondere bei jungen Menschen mit exzessiven Hörgewohnheiten, z.B. durch Diskothekenbesuche, ist das Risiko für Gehörschäden erhöht. Im Jahr 2005 waren nach Angaben des Deutschen Schwerhörigenbundes etwa 20 % der Bevölkerung von Schwerhörigkeit betroffen (Ständer 2005). Der Gehörsinn ist jedoch auch bei älteren Menschen aufgrund einer Vielzahl an schädigenden Faktoren, die während ihres Lebens aufgetreten sind, vermindert. Neuere Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen einer Schwerhörigkeit und dem Nachlassen der kognitiven Fähigkeiten aufzeigen. So scheinen vor allem bei älteren Patienten die geistigen Kapazitäten nicht auszureichen, um sich gleichzeitig auf das Verstehen und das Memorieren von Inhalten zu konzentrieren (Arthur 2005). Aufgrund der demographischen Entwicklung wird sich dieses Problem in der Zukunft noch weiter verschärfen. Bisher sind kausale Therapiemaßnahmen nur in begrenztem Umfang möglich. Hörgeräte sind sehr teuer und werden von den Patienten häufig nicht adäquat benutzt. Aus diesen Gründen ist die Prävention von Innenohrerkrankungen wie z.B. durch die Vermeidung hoher Lärmbelastigungen oder durch eine adäquate Behandlung von metabolischen Erkrankungen wie der Hypercholesterinämie von großer Bedeutung (Pffannenstiel et al. 2008). Neben präventiven Maßnahmen spielt darüber hinaus die Entwicklung von wirksamen Therapien zur Behandlung von Hörstörungen eine besondere Rolle. Die genaue Kenntnis des komplexen anatomischen Baus des Innenohres und der

physiologischen Vorgänge ist deshalb für die Erforschung der Ursachen und der Behandlung von Hörstörungen von großer wissenschaftlicher Bedeutung.

2. Anatomie des Innenohres

Das Innenohr befindet sich in der Felsenbeinpyramide (Pars petrosa ossis temporalis) und besteht aus zwei Hauptteilen. Dem vestibulären Labyrinth, das für den Gleichgewichtssinn zuständig ist, und der Cochlea, die den auditorischen Teil des Innenohrs bildet (Schmidt 2007; Speckmann et al. 2008). Die Cochlea ist schneckenartig aufgebaut. Beim Menschen besitzt sie $2\frac{1}{2}$, beim Meerschweinchen $4\frac{1}{2}$ Windungen. Die zentrale Achse der Cochlea wird von einem knöchernen Kanal, dem Modiolus, gebildet, durch den die Nerven- und Blutversorgung der Cochlea erfolgt (Abbildung 1 A). Um den Modiolus windet sich ein mit Flüssigkeit gefüllter schlauchartiger Gang, der durch Trennwände in drei voneinander abgegrenzte, parallel verlaufende Kanäle, die so genannten Scalae, unterteilt ist (Abbildung 1 B). Die in dem Gang oben verlaufende Scala vestibuli und die unten verlaufende Scala tympani stehen an der Schneckenspitze (Apex) über eine Öffnung, dem Helicotrema, in Verbindung. Beide Gänge sind mit Perilymphe gefüllt, die eine ähnliche ionale Zusammensetzung wie die normale Extrazellulärflüssigkeit aufweist. Zwischen diesen Gängen befindet sich die Scala media, die eine an K^+ -Ionen reiche Flüssigkeit, die Endolymphe, enthält. Diese wird von der Stria vascularis, einem mehrschichtigen Transportepithel an der seitlichen Schneckenwand, sezerniert. An der Basis der Cochlea enden die Scala tympani an der Membran des runden und die Scala vestibuli an der Membran des ovalen Fensters, auf welches die Gehörknöchelchen die Schallwellen übertragen. Scala vestibuli und Scala media werden durch die Reissner-Membran, Scala media und Scala tympani durch die Basilarmembran getrennt. Die Basilarmembran ist zwischen der knöchernen Lamina spiralis ossea und der lateralen Schneckenwand aufgespannt und trägt den sensorischen Apparat der Cochlea, das Corti-Organ (Klinke et al. 2005; Gröber 2007; Speckmann et al. 2008). Das Corti-Organ enthält, umgeben von Stützzellen, die zwei Typen von Mechanorezeptorzellen des auditorischen Systems, die inneren und äußeren Haarzellen (Klinke et al. 2005; Speckmann et al. 2008) (Abbildung 1 C). Die ca. 3500 birnenförmigen inneren Haarzellen (IHZ) ziehen in einer einzelnen Reihe von der cochleären Basis zum Apex. Parallel dazu verlaufen in drei Reihen die etwa 12000 säulenförmigen äußeren Haarzellen (ÄHZ). Das Corti-Organ wird von der gallertartigen

Tektorialmembran überdeckt, die aus Proteinen und Proteoglykanen besteht. Die Tektorialmembran und die freie Seite des Corti-Organs sind von Endolymphe umgeben. Die Haarzellen verdanken ihren Namen einer Reihe von haarähnlichen Fortsätzen am apikalen Ende der Zelle. Etwa 100 dieser Fortsätze, die als Stereovilli oder Stereozilien bezeichnet werden, bilden ein Haarbündel. Stereovilli enthalten einen dichten Kern aus quer vernetzten Aktinfilamenten, die ihnen die Eigenschaften eines starren Stäbchens verleihen, das bei mechanischer Einwirkung um seinen Ansatzpunkt abgewinkelt wird. Innerhalb des Haarbündels sind die Stereovilli unterschiedlich lang und ähnlich wie Orgelpfeifen in einer Reihe von der einen Seite des Haarbündels zur anderen treppenartig abgestuft (Abbildung 1 C). Von den Spitzen der kürzeren Stereovilli ziehen zu den längeren Stereovilli feine, nur ca. 10 nm dicke Eiweißfäden, die so genannten Tip-links. An deren Ansatzstellen liegen Ionenkanäle, die für den Transduktionsprozess im Innenohr von Bedeutung sind (s. Kapitel I.3.) (Klinke et al. 2005; Breneman et al. 2009). Die Stereovilli sind auf der Kutikularplatte, einer aktinreichen Schicht am apikalen Ende der Haarzellen, befestigt. Über die Spitzen der längsten Stereovilli stehen die ÄHZ, jedoch nicht die IHZ, mit der Unterseite der Tektorialmembran in Verbindung. An ihrem basalen Ende, in dem sich auch der Kern befindet, sind sie mit verschiedenen Arten von Stützzellen, wie z.B. den Deiters-Zellen, verbunden. Am ca. 15 - 70 μm langen zylindrischen Zellkörper bestehen sonst keine Kontakte mit den umliegenden Zellen, was die Beweglichkeit der Zellen erleichtert (Klinke et al. 2005; Ashmore 2008; Speckmann et al. 2008; Breneman et al. 2009). Haarzellen sind sekundäre Sinneszellen, d.h. sie besitzen keine eigenen Nervenfortsätze. Die IHZ sind die eigentlichen sensorischen Zellen, welche fast ausschließlich durch afferente Neuronen des Ganglion spirale innerviert werden. Die ÄHZ hingegen werden hauptsächlich von efferenten Fasern aus dem Hirnstamm versorgt (Klinke et al. 2005; Gröber 2007; Speckmann et al. 2008).

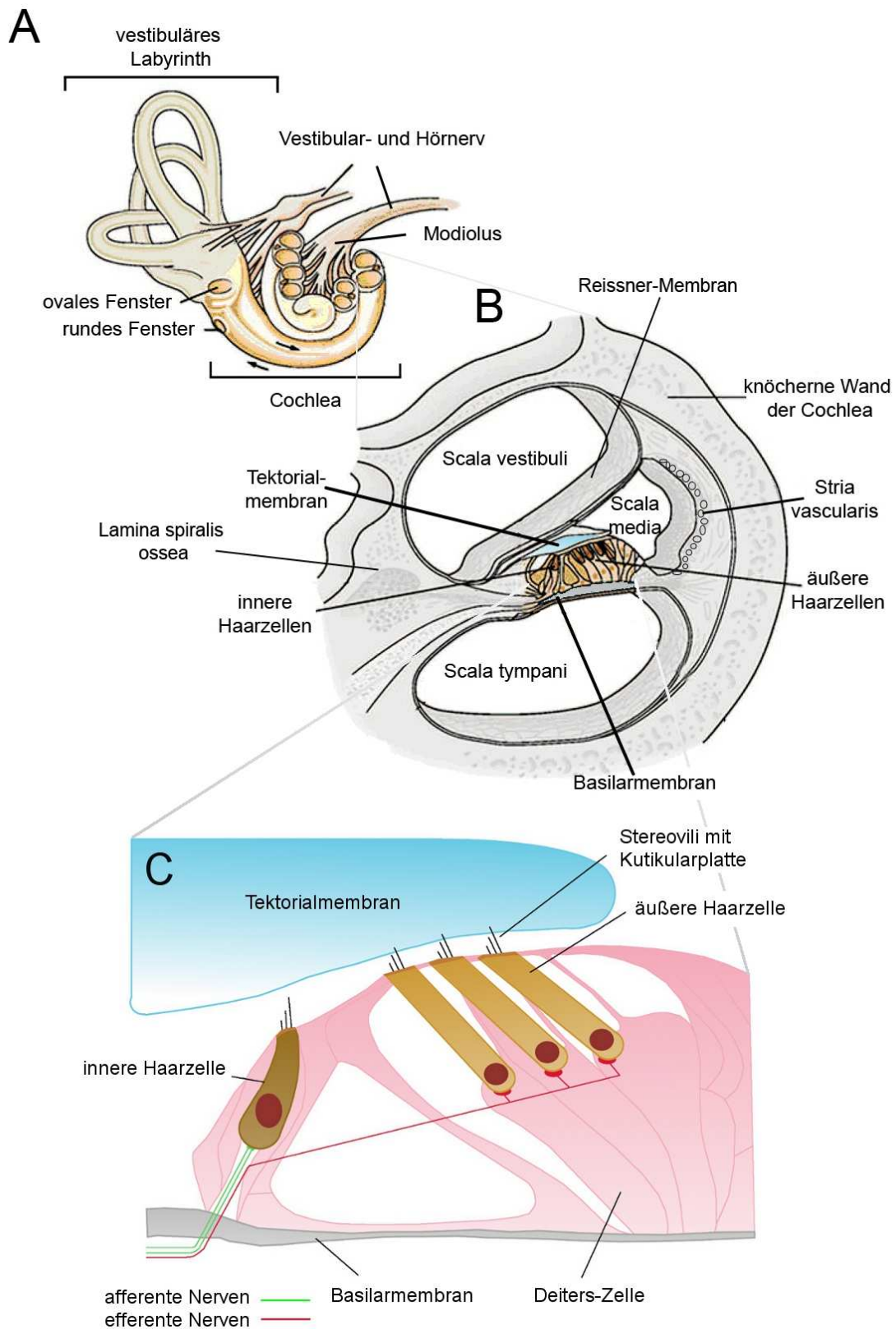


Abbildung 1: Anatomie des Innenohres **A:** Übersicht mit aufgeschnittener Cochlea **B:** Querschnitt durch die Windungen der Cochlea **C:** Schematische Darstellung des Corti-Organes mit den äußeren und inneren Haarzellen (verändert nach Hudspeth 2000 und Knirsch 2007)

3. Physiologie der Cochlea

3.1 Schallübertragung und Tonotopie

Die Umsetzung des Schallreizes in elektrophysiologische Signale (Transduktion) im Innenohr erfolgt in mehreren Schritten. Am Anfang dieses Prozesses bringen die Schallwellen durch die Schwingungsübertragung der Gehörknöchelchen auf das ovale Fenster die Basilarmembran zum Schwingen. Diese Schwingungen setzen sich wellenförmig bis zum Apex fort. Sie werden Wanderwellen genannt. Das Amplitudenmaximum der Wanderwelle entsteht in Abhängigkeit von der Frequenz jeweils an einem bestimmten Ort der Basilarmembran. Dieses Schwingungsverhalten ist durch die abnehmende Steifigkeit und zunehmende Breite der Basilarmembran von der Basis bis zum Apex hin bedingt. Das Phänomen, dass jeder Frequenz somit ein bestimmter Ort auf der Basilarmembran zugeordnet werden kann, nennt man Tonotopie (Ortprinzip) und ist die Ursache für die Frequenzselektivität des Gehörs. Die Haarzellen und ihre afferenten Neurone sind jeweils für eine charakteristische Frequenz zuständig. Es werden immer die Haarzellen am Ort des Maximums der Wanderwelle angeregt. Hohe Frequenzen werden basal, also nahe dem ovalen Fenster, und niedrige Frequenzen am Apex wahrgenommen (Klinke et al. 2005; Schmidt 2007; Speckmann et al. 2008).

3.2 Endocochleäres Potenzial und mechanoelektrische Transduktion

Gegenüber der Scala tympani beträgt das Ruhemembranpotenzial ca. -50 mV bei den IHZ und ca. -70 mV bei den ÄHZ. Die Endolymphe der Scala media weist mit ca. 140 mmol/l eine ungewöhnlich hohe extrazelluläre K^+ -Konzentration auf, die durch Ionenpumpen der Stria vascularis erzeugt wird. Das daraus resultierende positive elektrische Potenzial der Scala media gegenüber der Perilymphe der Scala tympani ($[K^+] = 3 \text{ mmol/l}$) wird als endocochleäres Potenzial bezeichnet. Es beträgt ca. +80 mV. Das Membranpotenzial und das endocochleäre Potenzial summieren sich zu einer Potenzialdifferenz von ca. -130 mV bei den IHZ und ca. -150 mV bei den ÄHZ (Abbildung 2). Dieses Potenzialgefälle leitet die

schwankt zwischen -60 mV und -80 mV (Rajagopalan et al. 2007) (Abbildung 3). Treibende Kraft hinter diesen Ionenströmen ist die Potenzialdifferenz zwischen dem Membranpotenzial der Haarzellen und dem endocochleären Potenzial (Klinke et al. 2005; Schmidt 2007; Speckmann et al. 2008).

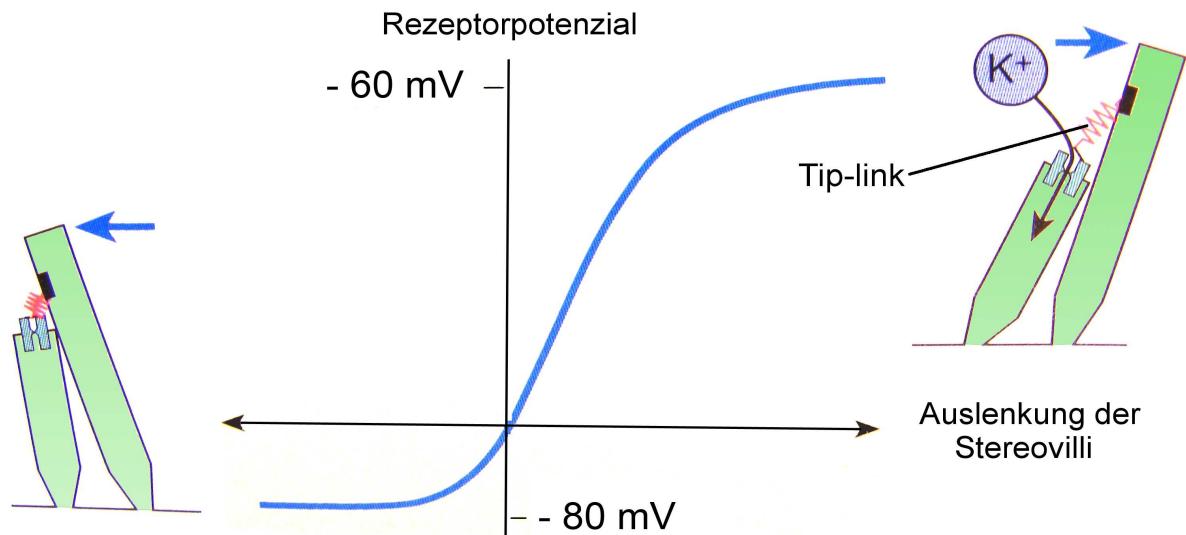


Abbildung 3: Rezeptorpotenzial in Abhängigkeit von der Auslenkung der Stereovilli (verändert nach Speckmann et al. 2008 und Rajagopalan et al. 2007)

3.3 Signalverstärkung durch die äußeren Haarzellen

Durch den Ioneneinstrom in die ÄHZ und die damit verbundenen Potenzialänderungen kommt es zur Aktivierung der Verstärkungsfunktion der ÄHZ (Breneman et al. 2009). Dieser Verstärkungsfunktion liegen zwei Mechanismen zu Grunde, die somatische und die ziliare Motilität. Durch beide Mechanismen werden mit aktiven Bewegungen der ÄHZ die Schwingungen der Wanderwelle bis zu 1000-fach verstärkt (Schmidt 2007; Dallos 2008). Bei der ziliaren Motilität erfolgt dies durch aktive Bewegungen der Stereovilli, während die somatische Motilität auf der Verlängerung und Verkürzung des Zellkörpers beruht. Dieser als cochleärer Verstärker bezeichnete Mechanismus erhöht die Frequenzselektivität und die Sensitivität des Gehörorgans. Werden die ÄHZ durch ototoxisch wirkende Substanzen

I. Einleitung

zerstört, kommt es zu einer Erhöhung der Hörschwelle um etwa 50 - 60 dB und einer Verschlechterung der Frequenzauflösung. Allerdings findet diese Verstärkung besonders bei hohen Frequenzen und am stärksten bei niedrigen Schallpegeln (0 - 5 dB) statt. Die Verstärkung nimmt proportional zum Schalldruckpegel ab und endet bei ca. 80 dB (Zhang et al. 2003; Speckmann et al. 2008). Durch die aktiven Bewegungen der ÄHZ entstehen geringe Schallsignale, die otoakustischen Emissionen (OAE). Diese werden im klinischen Alltag nachgewiesen, um eine Schädigung der ÄHZ darzustellen (Hudspeth 2008). Die somatische Motilität ist durch membranpotenzialabhängige Längenänderungen des Zellkörpers der ÄHZ gekennzeichnet und wird deshalb auch als Elektromotilität bezeichnet. Bei Auslenkung der Stereovilli in die inhibitorische Richtung kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Dies führt zu einer Konformationsänderung eines Motorproteins, das als Prestin bezeichnet wird. Prestin wurde im Jahr 2000 von Zheng et al. entdeckt (Zheng et al. 2000). Damit verbunden ist eine Elongation der ÄHZ (Abbildung 4 A). Eine Auslenkung in die exzitatorische Richtung erzeugt die gegenteilige Wirkung (Speckmann et al. 2008) (Abbildung 4 B).

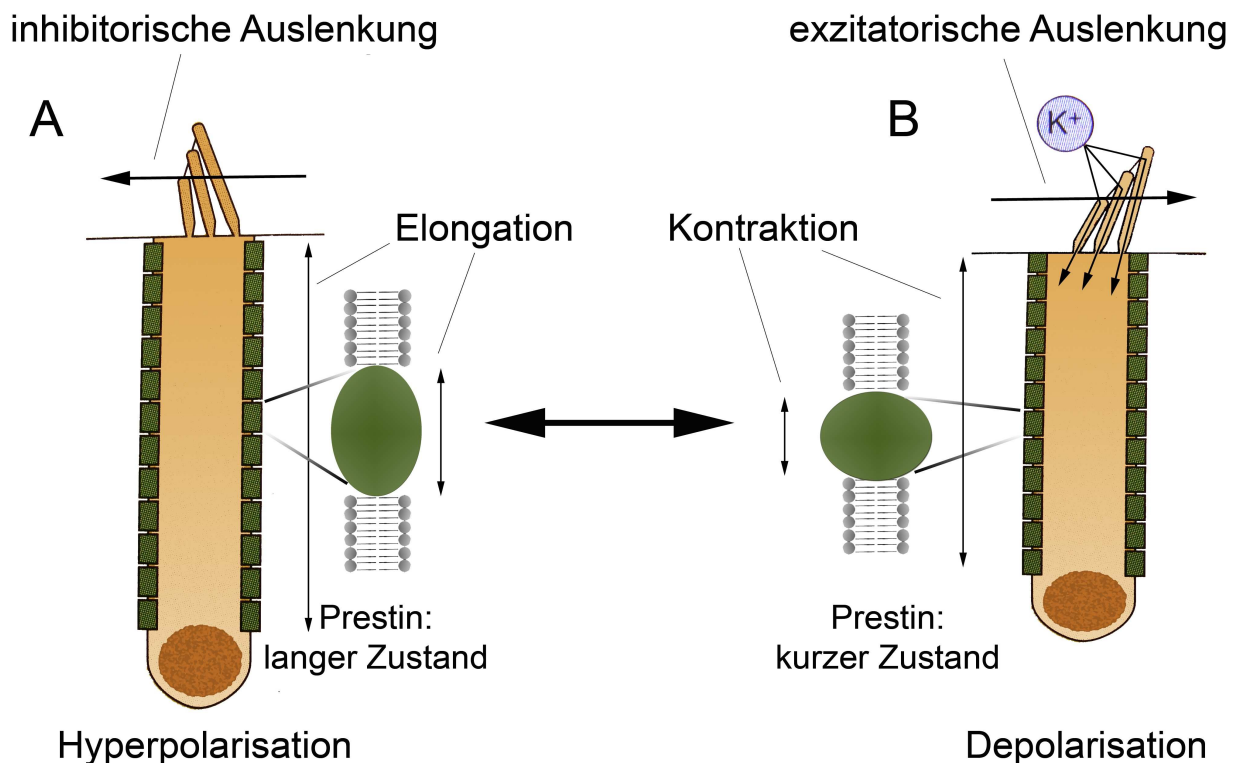


Abbildung 4: Somatische Motilität (verändert nach Speckmann et al. 2008)

Der Gesamtumfang dieser Bewegung beträgt ungefähr 4 % der Zelllänge und entspricht damit bei einer 50 μm langen Zelle einer Bewegung von ca. 2 μm . Die Frequenz der Längenänderungen kann bis zu 100 kHz betragen (Ashmore 2008). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass dieser Verstärkungsmechanismus durch die fast ausschließlich efferente Innervation der ÄHZ gehemmt werden kann (Kong et al. 2006). Diese Hemmung führt zu einer Erhöhung des dynamischen Bereichs und einer Verbesserung der Schallwahrnehmung bei Hintergrundgeräuschen. Sie schützt die Cochlea vor akustischer Überstimulation (Speckmann et al. 2008). Indirekt lassen sich diese durch Hyper- bzw. Depolarisation ausgelösten Zellbewegungen durch Messung der nichtlinearen Kapazität (NLC, nonlinear capacitance) nachweisen. Die NLC ist die Membrankapazität der ÄHZ und entspricht spannungsabhängigen Ladungsbewegungen über der Zellmembran (s. Kapitel I.4.4) (Santos-Sacchi 1991; Dallos et al. 2002).

Der ziliaren Motilität liegen aktive mechanische Reaktionen der Stereovilli auf den Ioneneinstrom durch die MET-Kanäle zugrunde. Bei Abscherung der Stereovilli durch die Schwingungen der Tektorialmembran bewegen sich diese aktiv mit und verstärken diese Wellen. Die physiologischen Details dieses Mechanismus sind noch weitgehend unbekannt. Als Motor dieser Bewegung sind membranpotenzialabhängige Längenänderungen der Stereovilli in der Diskussion. Vermutet wird, dass sich die Strukturproteine der Stereovilli je nach der Polarisierung des Membranpotenzials unterschiedlich anordnen. Die Spannung der Tip-links sowie die Öffnung der MET-Kanäle werden während dieses Vorganges über Ca^{2+} -abhängige Interaktionen des Myosins 1c mit Aktinfilamenten in der Zellmembran reguliert (Abbildung 5 A). Die Öffnung der MET-Kanäle führt zu einer Depolarisation der Stereovillimembran. Dies bewirkt eine Umverteilung der Membranbestandteile und somit eine Verringerung des Radius r des Stereovilli (Abbildung 5 B a)). Da das Stereovillivolumen konstant bleibt, kommt es zu einer Verlängerung des Stereovilli. Bei Hyperpolarisierung vergrößert sich der Radius r , wodurch sich das Stereovilli verkürzt (Abbildung 5 B b)). Dieser Vorgang wird in Anlehnung an ähnliche Beobachtungen bei Kristallmolekülen auch Flexoelektrizität genannt (Fettiplace 2006; Breneman et al. 2009). Während die somatische Elektromotilität nur bei den ÄHZ der Säugetiere auftritt, ist die ziliare Motilität mit aktiven Bewegungen der Stereovilli bei den Haarzellen aller Wirbeltiere möglich (Dallos 2008). Das Zusammenspiel und die Gewichtung der unterschiedlichen Verstärkungsformen sind noch umstritten (Dallos 2008).

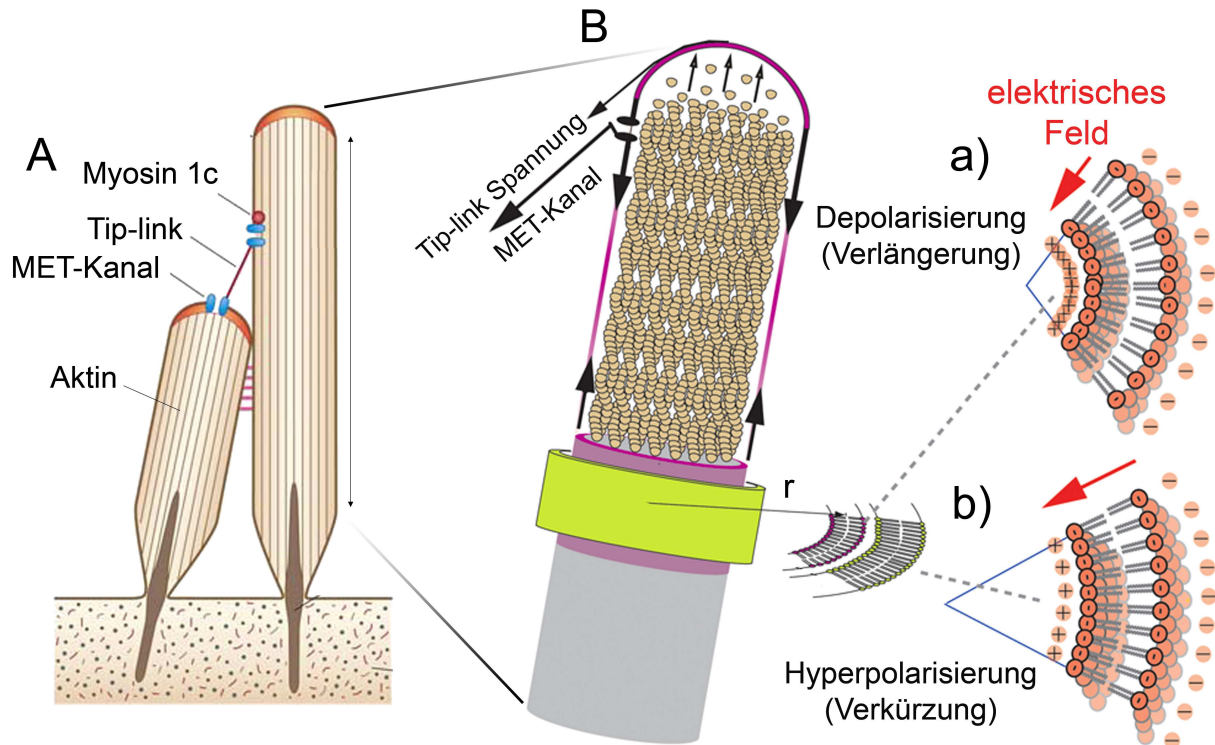


Abbildung 5: Ziliare Motilität (verändert nach Fettplace 2006 und Breneman et al. 2009)

In Zusammenschau der aktuellen Forschungsergebnisse stellte Hudspeth die Theorie auf, dass die ziliare Motilität eine Art Vorverstärker und Frequenzmodulator darstellt, wogegen die somatische Motilität als Endverstärker fungieren könnte (Hudspeth 2008).

Der cochleäre Verstärker arbeitet dynamisch. Er bietet die Möglichkeit, sehr geringe Schallstärken zu verstärken, während große Schallstärken unverstärkt verarbeitet werden. Dadurch werden Schäden im Innenohr verhindert. Eine automatische Verstärkungskontrolle in Form von inhibitorischen Effekten gewährleistet ein mechanisches Gleichgewicht. Der am besten erforschte inhibitorische Effekt wird von dem Neurotransmitter Acetylcholin vermittelt. Acetylcholin ist der wichtigste Transmitter der efferenten Fasern, die die ÄHZ innervieren. Durch die Bindung an spezifische Rezeptoren kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dieser führt zu einem verzögerten K^{+} -Ausstrom und damit zu einer Hyperpolarisierung der Zelle. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Spannungssensitivität der ÄHZ und zu einer Inhibition der Elektromotilität (Frolenkov 2006; Ashmore 2008).

3.4 Informationsübertragung durch die inneren Haarzellen

Durch die Wanderwelle und die Verstärkungsmechanismen der ÄHZ werden im letzten Schritt der Transduktion die eigentlichen Rezeptorzellen des Gehörs, die IHZ, erregt. Obwohl die IHZ keinen direkten Kontakt zur Tektorialmembran besitzen, werden auch ihre Stereovilli - vermutlich durch den Sog einer subtektorialen Endolymphströmung - abgeschert. Ähnlich wie bei den ÄHZ kommt es zu einem K^+ -Einstrom und damit zu einer Depolarisation der Zelle (Schmidt 2007). Dies führt aber nicht wie bei den ÄHZ zu aktiven Längenänderungen, sondern zur Öffnung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen mit Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat am basalen Pol der Haarzelle. Glutamat diffundiert in den synaptischen Spalt und bindet an Rezeptoren der afferenten Hörnervenzelle. Das dabei ausgelöste postsynaptische Signal führt zu Aktionspotenzialen, die über die Hörbahn zum Gehirn weitergeleitet werden (Klinke et al. 2005; Speckmann et al. 2008).

4. Motorprotein Prestin und Feinaufbau der Zellmembran der äußeren Haarzellen

4.1 Identifizierung von Prestin

Die Entdeckung der Elektromotilität der ÄHZ durch Brownell et al. im Jahr 1985 löste eine intensive Forschungstätigkeit zur Aufklärung dieses Phänomens aus (Brownell et al. 1985). Aufgrund physiologischer Untersuchungen wurde vermutet, dass ein transmembraner Ionentransporter eine Rolle spielen könnte (Ashmore 1992; Knipper et al. 1995). Zur Diskussion standen auch der Fruktosetransporter GLUT5 und ein b3p/p 4.1/Ankyrin-Komplex. Im Jahr 2000 gelang es schließlich Zheng et al., das Protein Prestin als das Motorprotein der ÄHZ zu identifizieren (Knipper et al. 1995; Belyantseva et al. 2000; Zheng et al. 2000). Durch subtraktive Klonierung zwischen einer motilen cDNA-Sequenz der ÄHZ und der nichtmotilen cDNA-Sequenz der IHZ konnte Prestin aus cDNA kloniert werden. Da auch die Expression in menschlichen Nierenzellen zu einer spannungsabhängigen Motilität führte, schlossen sie daraus, dass Prestin das Motorprotein der ÄHZ

sein müsse. Liberman et al. konnten im Jahr 2002 diese Theorie bestätigen. Sie zeigten, dass Mäuse bei einer Deletion der Exons 3 - 7 des kodierenden Gens einen Verlust der Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) und der Elektromotilität der ÄHZ sowie eine Erhöhung der Hörschwelle von 40 - 50 dB aufwiesen (Liberman et al. 2002).

4.2 Feinbau der Zellmembran der äußeren Haarzellen

Das Motorprotein Prestin befindet sich fast ausschließlich in der lateralen Zellmembran der ÄHZ (Ashmore 2008) (Abbildung 6).

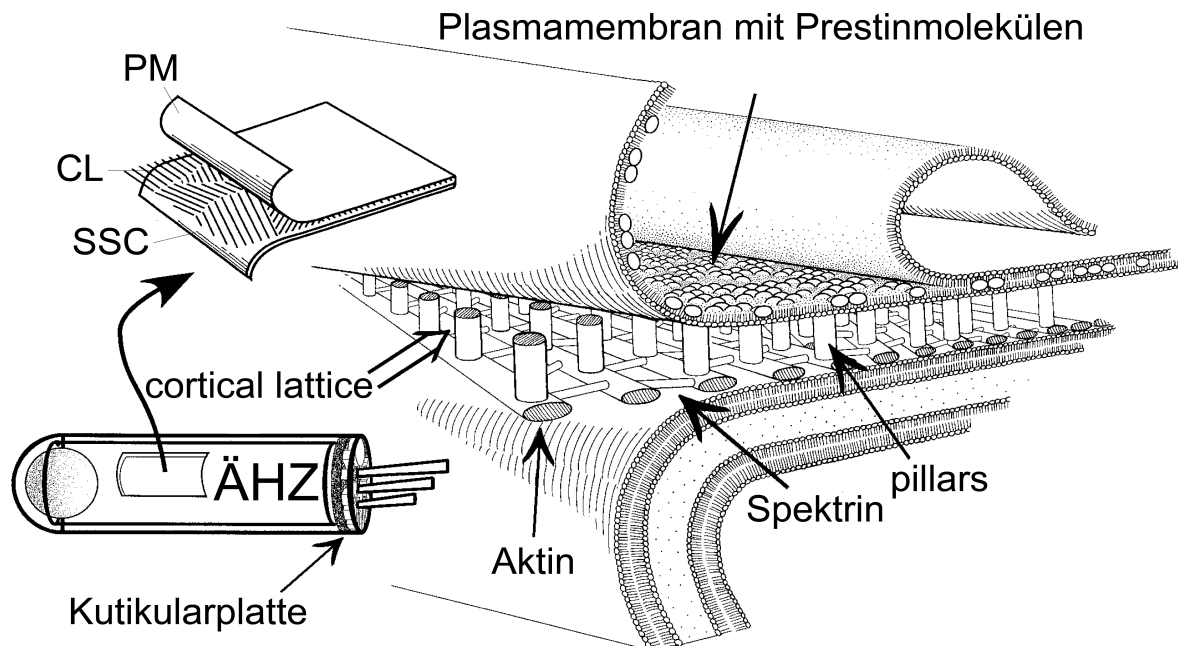


Abbildung 6: Aufbau der lateralen Zellmembran der äußeren Haarzelle (verändert nach Oghalai et al. 1998)

Am apikalen Ende der ÄHZ sind die Stereovilli in der Kutikularplatte befestigt. Der Zellkern befindet sich an der Basis der Zelle. Die Zellmembran der Seitenwand weist eine einzigartige dreischichtige Struktur auf. Die äußere Schicht bildet die Plasmamembran (PM), in welcher 3000 bis 6000 Prestinmoleküle pro μm^2 eingebettet liegen. Die Prestindichte hängt von der Lokalisation der ÄHZ in der Cochlea ab. Apikale ÄHZ, die die

tiefen Schallfrequenzen verstärken, weisen eine geringere Prestindichte auf als die basalen ÄHZ, die für die höheren Frequenzen zuständig sind (Ashmore 2008). Unterhalb der Plasmamembran befindet sich als zweite Schicht das kortikale Netz (CL, cortical lattice). Dieses Netzwerk aus Aktin- und Spektrinfilamenten ist über tausende, 25 nm lange, pfeilerartige Strukturen (pillars) mit der Plasmamembran verbunden (Zhang et al. 2003). Vermutlich fungiert dieses Netz bei Bewegung als eine Art Feder und beeinflusst damit die Steifigkeit der Zellmembran und deren Motilität (Ashmore 2008). Die innere Schicht der Zellwand der ÄHZ wird durch eine Art endoplasmatisches Retikulum gebildet (SSC, subsurface cistern), welches vermutlich durch Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen an der Regulation der Motilität mitwirken könnte (Frolenkov 2006). Der Einbau von Prestin in die Zellmembran erfolgt über Vesikel oder Endosomen, die für den Transport zwischen den Zellkompartimenten und der Zellmembran zuständig sind. In der Plasmamembran liegt Prestin dann zusammen mit anderen Proteinen in cholesterinreichen Lipid-Mikrodomänen vor (Sturm et al. 2007).

4.3 Struktureller Aufbau und Lokalisation von Prestin

Die Struktur von Prestin (744 AS; 81,4 kDa) ist noch nicht vollständig geklärt. Prestin ist mit 12 Transmembrandomänen in der Zellmembran der ÄHZ verankert und besitzt eine sich über weite Teile des Proteins hinziehende hydrophobe Region (Abbildung 7).

Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende liegen intrazytoplasmatisch (Ashmore 2008). Prestin (SLC26A5) ist Mitglied der Genfamilie der Anionen-Transporter SLC26 (SLC, solute carrier). Zehn Mitglieder dieser Genfamilie kommen im Genom der Wirbeltiere vor. Die SLC26-Genfamilie wird durch ein Sulfat-Transportmotiv (sulfate motif) in der zweiten Transmembrandomäne definiert. Die lange intrazelluläre Region mit den Aminosäuren 496 bis 744 und dem C-terminalen Ende enthält Cluster von positiv und negativ geladenen Aminosäureresten und die so genannte STAS (sulfate transporter and antisigma factor antagonist)-Domäne (Mount et al. 2004; Ashmore 2008). Obwohl Mutationen dieser Domäne mit Erkrankungen assoziiert sind, ist ihre Funktion noch unklar (Mount et al. 2004).

I. Einleitung

Die dreidimensionale Rekonstruktion von Prestin durch Mio et al. ergab ein Protein mit den Maßen 7,7 nm x 7,7 nm x 11,5 nm in Form einer Pistolenkugel (bullet-shaped), das innere Hohlräume aufweist (Mio et al. 2008) (Abbildung 8).

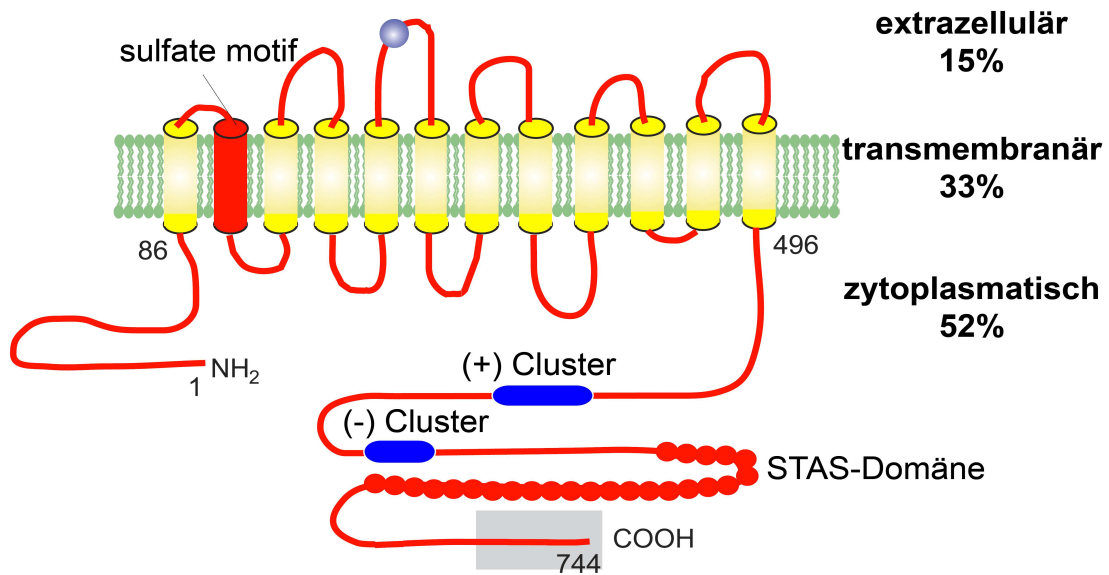


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur und Lokalisation von Prestin in der Plasmamembran der äußeren Haarzellen (verändert nach Ashmore 2008)

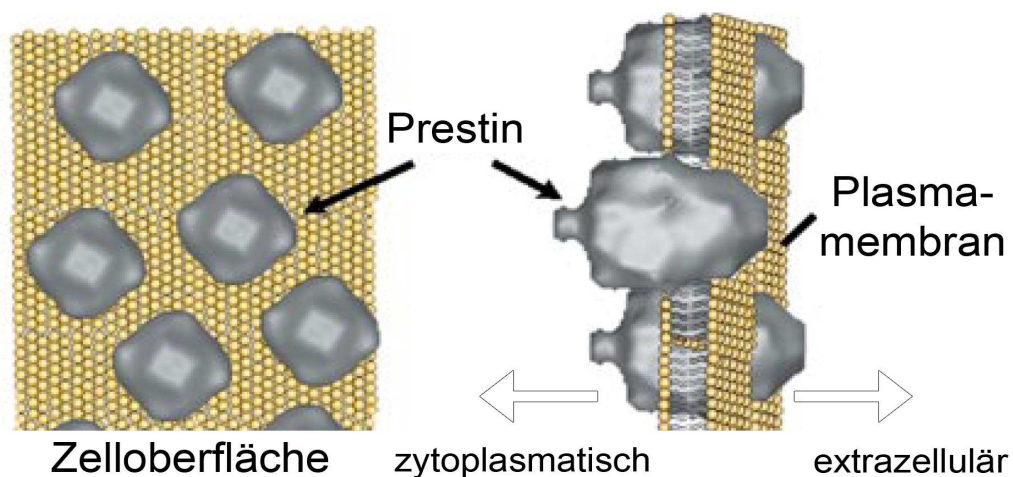


Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung von Prestin in der Plasmamembran (verändert nach Mio et al. 2008)

Mio et al. nehmen an, dass sich die Prestinmoleküle zu drehsymmetrischen Tetrameren zusammenlagern (Mio et al. 2008). Auch wird die Bildung von Dimeren oder Trimeren vermutet (Rajagopalan et al. 2007; Mio et al. 2008). Der Ablauf dieses auch als Selbstassoziation bezeichneten Vorgangs ist noch nicht vollständig geklärt. Trotz dieser Forschungsergebnisse bezüglich der Struktur von Prestin konnten bis heute die für die Elektromotilität verantwortlichen Subsequenzen noch nicht identifiziert werden (Ashmore 2008).

4.4 Funktion von Prestin

Prestin ist das schnellste bekannte Motorprotein. Seinen Namen erhielt es angelehnt an das schnelle Musiktempo Presto. Die Dauer der von ihm hervorgerufenen Größenänderungen liegt im Mikrosekundenbereich (Zheng et al. 2000; Ashmore 2008; Mio et al. 2008). Dabei entfaltet ein Prestinmolekül eine Kraft von ca. 2,4 pN (Zheng et al. 2000). Im Gegensatz zu anderen Motorproteinen sind die Bewegungen von Prestin nicht direkt von ATP und Ca^{2+} -Ionen abhängig. Prestin kann seine Konformation bei einer angelegten elektrischen Spannung verändern. Die Energiequelle für diesen Vorgang scheint das Membranpotenzial zu sein (Ashmore 2008). Oliver et al. konnten zeigen, dass intrazelluläre Chlorid- und Bicarbonationen für die Funktion des Motorproteins Prestin von entscheidender Bedeutung sind. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der SLC26-Genfamilie ist die Funktion von Prestin als Ionentransporter aber umstritten (Muallem et al. 2006). Das einfachste Modell beschreibt Prestin als einen inkompletten Ionentransporter. Durch die Membranpotenzialänderungen bewegt sich Chlorid in eine zytoplasmatische Bindungsstelle, die durch das Prestin gebildet wird. Ob es daraufhin direkt zu einer Konformationsänderung von Prestin kommt (Abbildung 9 A) oder vorher eine Bewegung von Ladungen durch die Zellmembran erfolgt, welche daraufhin die Bewegung von Prestin auslöst (Abbildung 9 B), ist derzeit noch umstritten. In diesem Modell fungieren Chlorid und Bicarbonat somit als eine Art Spannungssensor (Oliver et al. 2001; Dallos et al. 2002; Ashmore 2008). Ersetzt man wie in der vorliegenden Arbeit Chlorid und Bicarbonat durch physiologisch irrelevante Anionen, wie z.B. Pentansulfonat, kommt es zu einem Verlust der Elektromotilität sowie der NLC (Oliver et al. 2001).

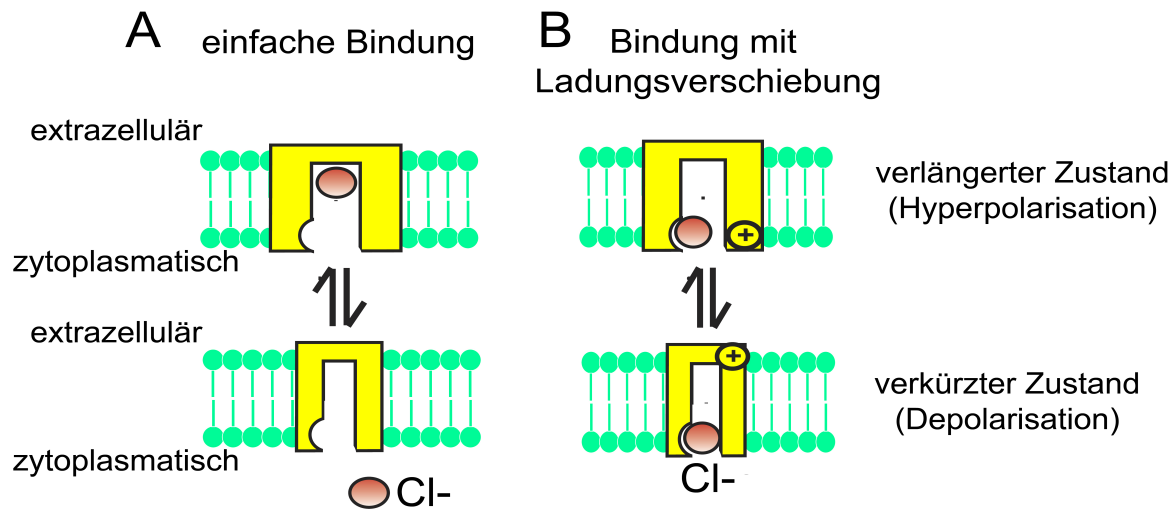


Abbildung 9: Modellhafte Darstellung von Prestin als inkompletter Ionenporter (verändert nach Ashmore 2008)

5. Nichtlineare Kapazität und Elektromotilität von äußeren Haarzellen

Die Elektromotilität kann entweder direkt durch Messung der Längenänderungen oder indirekt durch die Bestimmung der nichtlinearen Kapazität (NLC, nonlinear capacitance) von ÄHZ untersucht werden. Die NLC wird durch die Bewegung von Ladungen hervorgerufen, die durch Änderungen des Membranpotenzials entsteht. Genauso wie die Längenänderungen der ÄHZ ist die NLC spannungsabhängig und ermöglicht deshalb die Messung der Elektromotilität ohne die Verwendung von optischen Verfahren. Die Kurven für die Längenänderung L (L - V -Kurve), für die Ladungsbewegung Q (Q - V -Kurve) und für die NLC (C - V -Kurve) sind in Abhängigkeit vom Membranpotenzial in Abbildung 10 dargestellt. Die Kurven für die Längenänderung L und Ladungsbewegung Q verlaufen sigmoidal. Die C - V -Kurve zeigt eine glockenförmige Abhängigkeit vom Membranpotenzial. Das Maximum der C - V -Kurve (NLC_{\max}) liegt bei der gleichen Spannung, bei der die Steigung der Q - V -Kurve und der L - V -Kurve maximal ist. Diese Spannung, bei der pro Spannungseinheit die größte Ladungsbewegung (peak charge movement) und auch die größte Längenänderung erfolgt, wird als V_{pkc} bezeichnet. V_{pkc} liegt bei unbehandelten ÄHZ bei etwa -50 mV und gibt die Spannung an, bei der die höchste Motilität hervorgerufen wird. Die Messung der NLC ermöglicht damit den

Vergleich mit Untersuchungen der Längenänderungen von ÄHZ mit anderen Methoden, wie z.B. der in dieser Arbeit verwendeten Videomikroskopie (Ashmore 2008).

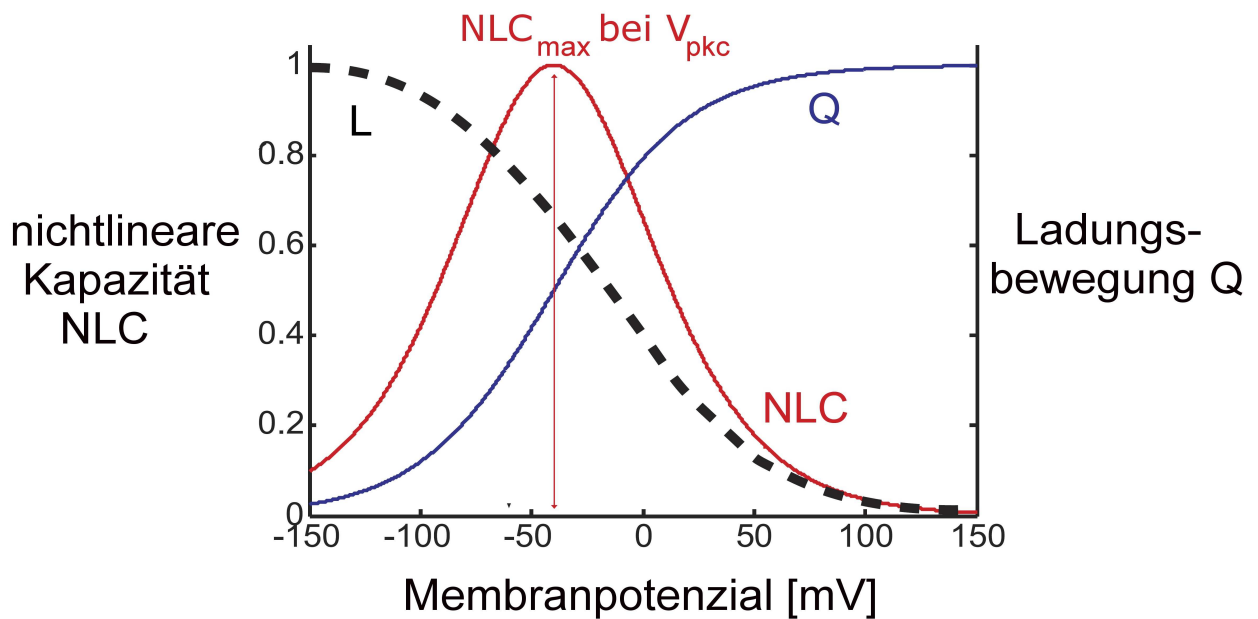


Abbildung 10: Grafische Darstellung der NLC, der Ladungsbewegung und der Längenänderung in Abhängigkeit vom Membranpotenzial (verändert nach Ashmore 2008)

Viele Faktoren, wie z.B. der Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine oder Stoffe wie Chloroform, Gadolinium, Salicylate oder Cholesterin, können diese Vorgänge beeinflussen. Sie verschieben diese Kurven entweder in die depolarisierende oder in die hyperpolarisierende Richtung oder verändern den Betrag der größten Längenänderung bzw. der größten Ladungsbewegung. In dieser Arbeit wurde speziell die Wirkung von Cholesterin auf die Motilität der ÄHZ untersucht (Ashmore 2008).

6. Cholesterin und sein Einfluss auf den Hörvorgang

6.1 Chemische Struktur und allgemeine Bedeutung

Der Nobelpreisträger Michael Brown bezeichnete das Cholesterin als ein janusköpfiges Molekül (Berg et al. 2007). Einerseits ist es ein unverzichtbarer Bestandteil unserer Zellen, andererseits schädigt es den menschlichen Organismus z.B. durch Atherosklerose (Yeagle 1985). Cholesterin stellt einen essentiellen Bestandteil der Plasmamembran der meisten

Zellen der Eukaryonten dar. Cholesterin ist eine wichtige Vorstufe für die Biosynthese von Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren. Drei strukturelle Charakteristika sind wichtig für die funktionellen Eigenschaften von Cholesterin (Abbildung 11).

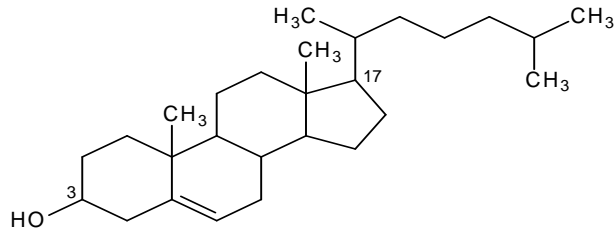


Abbildung 11: Strukturformel von Cholesterin (erstellt mit ACD/ChemSketch)

Ein tetrazyklisches Ringsystem in trans-Konfiguration verleiht dem Molekül eine fast planare Struktur. Am ¹⁷C-Atom befindet sich eine hydrophobe Seitenkette, welche Konformationsänderungen des Moleküls ermöglicht. Diesen hydrophoben Anteilen steht am ³C-Atom eine polare Hydroxygruppe gegenüber, so dass das Molekül insgesamt einen amphipathischen Charakter aufweist. Daraus resultiert die essentielle Bedeutung von Cholesterin als Bestandteil der Plasmamembran und deren regulierende Funktion (Rajagopalan et al. 2007; Sfondouris et al. 2008). Cholesterin wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder in der Membran des endoplasmatischen Retikulums neu synthetisiert. Eine wichtige Regulationsfunktion hat hierbei die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA-Reduktase, deren Aktivität von der intrazellulären Cholesterinmenge abhängig ist. Die HMG-CoA-Reduktase ist aus diesem Grund auch Ansatzpunkt von Medikamenten wie z.B. der Statine. Da Cholesterin wasserunlöslich ist, kann es nur an Lipoproteine gebunden transportiert werden. Die im Blut zirkulierenden Lipoproteine werden nach ihrer Dichte VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) oder HDL (high density lipoprotein) genannt. VLDL transportiert Triglyceride, Cholesterin und Phospholipide von der Leber zu den peripheren Geweben. Durch Abgabe der Triglyceride wird es in LDL umgewandelt. Die Leber und periphere Gewebe nehmen LDL wieder auf. HDL befördert Cholesterin aus den peripheren Geweben zur Leber (Berg et al. 2007). Der intrazelluläre Transport verläuft auch teilweise über Transportproteine, kann aber auch über Vesikel oder durch den Kontakt von Organellen mit der Zellmembran erfolgen (Soccio et al. 2004).

6.2 Bedeutung von Cholesterin für die Plasmamembran

Das Cholesterinmolekül richtet sich in Lipiddoppelschichten parallel zu den Fettsäureketten der Phospholipide aus. Die hydrophile Hydroxygruppe steht in Kontakt mit dem wässrigen Milieu und der hydrophobe Rest ragt in die Mittelzone der Lipiddoppelschicht (Yeagle 1985; Berg et al. 2007) (Abbildung 12).

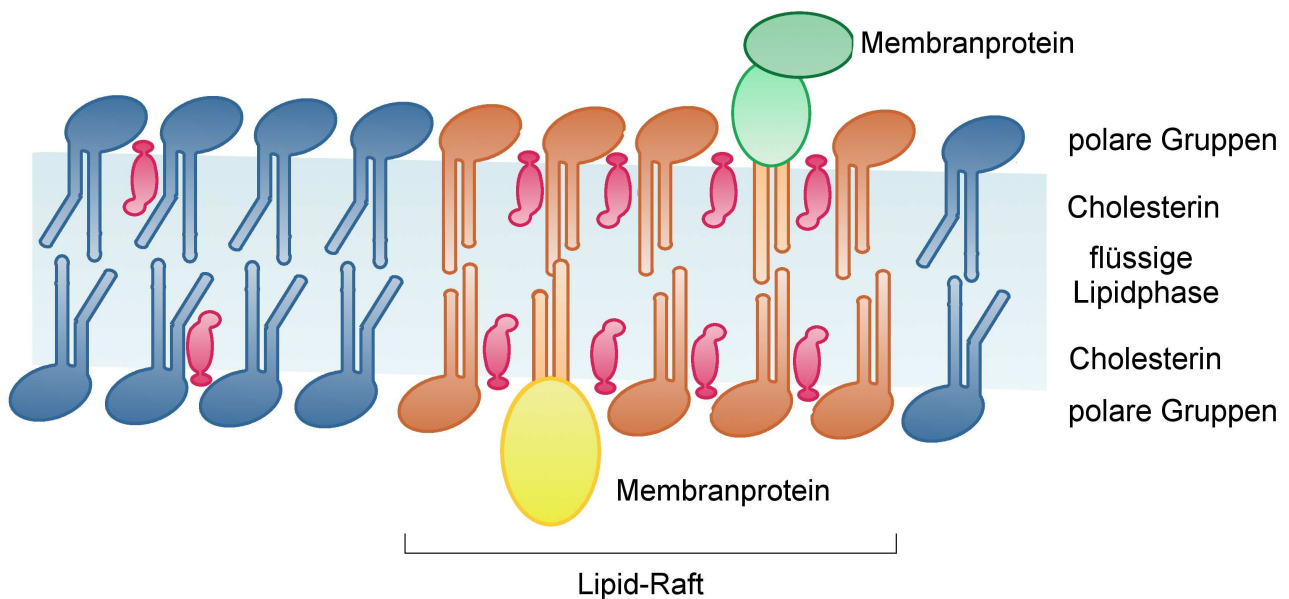


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zellmembran mit Phospholipiden, Cholesterin (rot) und einem Lipid-Raft (verändert nach Harder et al. 1997)

Durch Wechselwirkungen von Cholesterin mit den Phospholipiden und Sphingolipiden verändert es die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran. Cholesterin ist deshalb der Hauptregulator der Membranfluidität (Berg et al. 2007). Es vermindert den Übergang der Lipiddoppelschicht von dem Gel- in den Flüssigzustand und hält es damit in einem stabileren und geordneteren Zwischenzustand. Dies führt zu einer größeren Dichte und Festigkeit der Membran (Ohvo-Rekila et al. 2002). Cholesterin beeinflusst somit die laterale und transversale Diffusion von Molekülen in der Zellmembran. Bei der lateralen Diffusion bewegt sich das Molekül in einer Lipidschicht auf einer Seite der Zellmembran, während es bei der transversalen Diffusion auf die andere Seite der Zellmembran gelangt. Eine hohe Cholesterinkonzentration in der Zellmembran verringert z.B. die Permeabilität der Membran für Proteine, Lipide und auch für Ionen (Yeagle 1985; Brown 1998). Viele integrierte Membranproteine wie Ionenkanäle, Membranrezeptoren und Enzyme reagieren

auf physikalische Veränderungen der Lipiddoppelschicht. Einige benötigen zu ihrer Aktivierung oder Deaktivierung sogar eine direkte Bindung an das Cholesterin über cholesterinspezifische Domänen (Ohvo-Rekila et al. 2002). Cholesterin ist nicht gleichmäßig über die Zellmembran verteilt. In der Zellmembran existieren Mikrodomänen, die sich in ihrem Cholesteringehalt und auch in ihrem Sphingolipid- und Glykolipidgehalt sowie ihrer Proteinzusammensetzung von anderen Membranbereichen unterscheiden. Bei der Interaktion mit integralen Membranproteinen scheinen Mikrodomänen wie die Lipid-Rafts eine Rolle zu spielen. Lipid-Rafts sind 10 - 100 nm große, sich selbst organisierende Mikrodomänen, in denen sich besonders Proteine, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind, anreichern (Berg et al. 2007; Epand 2008) (Abbildung 12). Durch Einstülpung können sich aus manchen Lipid-Rafts Caveolae bilden, die eine wichtige Rolle bei Endozytosevorgängen spielen. Sie sind z.B. in der Lage, Vesikel zu bilden, welche mit Endosomen interagieren (Ohvo-Rekila et al. 2002; Pollard et al. 2008).

6.3 Wirkungen von Cholesterin auf das Innenohr

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang von erhöhten Cholesterinwerten und Innenohrschädigungen ergab im Jahr 1962 eine Untersuchung von Samuel Rosen, welcher die Prävalenz der Presbyakusis bei dem sudanesischen Stamm der Mabaan mit einer Kontrollgruppe aus den USA verglich. Das verminderte Auftreten der Altersschwerhörigkeit bei den Mabaan führte Rosen auf die geringere Lärmexposition und eine cholesterinarme Ernährung zurück (Rosen et al. 1962). Weitere epidemiologische Studien unterstützen diese These (Rosen et al. 1970; Cunningham et al. 1974; Gates et al. 1993). Bei Patienten mit Innenohrerkrankungen lag überdurchschnittlich häufig eine Hyperlipoproteinämie vor (Spencer 1973). Studien, die Patienten mit erhöhten LDL-Werten untersuchten, konnten ein verringertes Hörvermögen besonders bei hohen Frequenzen feststellen. HDL hingegen scheint eher protektiv zu wirken. Durch eine cholesterinarme Diät und lipidsenkende Medikamente konnte eine Verbesserung des Hörvermögens erzielt werden (Strome et al. 1988; Suzuki et al. 2000; Kojima et al. 2001). Thalmann et al. führten mit der Endo- und Perilymphe von Meerschweinchen gelelektrophoretische Untersuchungen durch. Sie konnten verschiedene Proteine wie Apo D und Apo J in relativ

hoher Konzentration nachweisen, die als Lipoproteine eine Transportfunktion für Cholesterin besitzen und bei der Pathogenese der Atherosklerose eine protektive Rolle zu spielen scheinen (Thalmann et al. 1994). Preyer et al. stellten im Jahr 2001 bei Patienten mit Hypercholesterinämie einen Intensitätsverlust der OAE fest und sahen darin einen Hinweis auf die Wirkung von Cholesterin auf die ÄHZ (Preyer et al. 2001). Im Rahmen einer prospektiven klinischen Multicenterstudie untersuchten Suckfüll et al. die Möglichkeiten der Heparin-induzierten extrakorporalen LDL-Präzipitation bei der Behandlung des akuten Hörsturzes. Tonaudiogramme des gesunden, zum Hörsturz kontralateralen Ohres der Patienten haben gezeigt, dass im Vergleich zu einer mit Prednisolon behandelten Kontrollgruppe eine einmalige drastische Senkung des LDL-Cholesterins dauerhaft die Hörschwelle um 1,8 dB verbessern kann. Dieser Befund ist einmalig, da bislang keine Möglichkeit bekannt ist, die Hörschwelle bei Patienten mit chronischer Innenohrschwerhörigkeit zu bessern. Ursache könnte die akute und drastische Senkung des Cholesterins sein, die die Motilität der ÄHZ verbessert (Suckfüll et al. 1999; Suckfüll 2002). Obwohl zahlreiche epidemiologische und klinische Studien vermuten lassen, dass eine Hypercholesterinämie die Entwicklung einer Innenohrschwerhörigkeit begünstigt, sind die pathophysiologischen Grundlagen der Auswirkungen von Cholesterin auf das Innenohr noch weitgehend ungeklärt. Mögliche Pathomechanismen von Cholesterin auf das Innenohr sind die Einlagerung von Cholesterin in Innenohrstrukturen, Störungen der cochleären Durchblutung und eine direkte Wirkung auf die ÄHZ. Nomura beobachtete bereits 1970, dass sich Cholesterin in wichtige Strukturen des Innenohres wie z.B. die Basilarmembran einlagert und deren Funktion beeinträchtigt (Nomura 1970). Gratton et al., Kashiwado et al. und Satar et al. konnten in der Cochlea hyperlipidämischer Tiere mikroskopisch morphologische Veränderungen, wie z.B. Ablagerungen amorphen Materials und ein extrazelluläres Ödem, nachweisen. Diese Veränderungen waren in der Stria vascularis und in den ÄHZ besonders ausgeprägt (Gratton et al. 1992; Kashiwado et al. 1994; Satar et al. 2001). Saito et al. untersuchten bei Meerschweinchen nach einer hyperlipidämischen Diät das Innenohr mit histochemischen, elektronenmikroskopischen sowie hirnstammaudiometrischen Methoden. Sie stellten morphologische Veränderungen der Stria vascularis und des Corti-Organes sowie Störungen des Lipidmetabolismus der ÄHZ fest. Die Veränderungen ließen sich jedoch nicht mit den Befunden der Hirnstammaudiometrie korrelieren, die einen Hörverlust von nur 10 – 20 dB ergaben. Die Autoren vermuten deshalb, dass weitere Faktoren bei der Entwicklung eines Hörschadens

eine Rolle spielen (Saito et al. 1986). Sikora et al. stellten durch Zählung der Haarzellen den Einfluss einer ketotischen Diät auf die Lärmempfindlichkeit von Chinchillas dar. Aufgrund des erhöhten Hörschwellen- und Haarzellenverlustes der Versuchsgruppe vermuteten sie unter Hyperlipidämie eine gesteigerte Vulnerabilität des Innenohres gegenüber akustischen Traumen (Sikora et al. 1986).

Die Einlagerung von Cholesterin in Blutgefäßwände verursacht eine Atherosklerose, die auch die Blutversorgung der Cochlea betreffen kann. Dies führt zu mikrozirkulatorischen Veränderungen sowie zur Degeneration kleiner Gefäße im Bereich des Ligamentum spirale und der Stria vascularis. Durch Ischämie kommt es zur Schädigung der Haarzellen (Berg et al. 2007; Mazurek et al. 2008). McCormick stellte bei an Atherosklerose erkrankten Tauben im Vergleich mit gesunden Tieren einen Hörverlust von 15 - 18 dB fest (McCormick 1972). Cholesterin hat in Form von LDL einen vasokonstriktorischen Effekt, da es die Bildung von Stickstoffmonoxid, das den wichtigsten Vasodilatator der cochleären Blutversorgung darstellt, hemmt (Dart et al. 1999; Ruan 2002; Suckfüll 2002; Nakashima et al. 2003). Es wird auch vermutet, dass Cholesterin durch Veränderung der Blutgerinnung und der Erythrozytenmembran die Flusseigenschaften des Blutes verschlechtern kann (McCormick 1972; Gratton et al. 1992).

Einige Studien zeigen, dass Cholesterin auch die OAE beeinflusst (Preyer et al. 2001; Rajagopalan et al. 2007). Dies weist darauf hin, dass Cholesterin auch eine direkte Wirkung auf die ÄHZ hat.

Cholesterin wirkt bei den ÄHZ vor allem auf die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran und auf das Motorprotein Prestin. Cholesterin scheint auch eine wichtige Funktion im Reifungsprozess der ÄHZ wahrzunehmen. So ist die Cholesterindichte der lateralen Zellmembran der ÄHZ in der frühen Phase der Entwicklung hoch und nimmt parallel zur Entwicklung der Elektromotilität ab (Rajagopalan et al. 2007). Die Lokalisation von Cholesterin in den ÄHZ steht im Zusammenhang mit seiner Funktion. So ist die Cholesterinkonzentration in der für die Elektromotilität verantwortlichen lateralen Zellmembran auffällig gering (Sfondouris et al. 2008). In-vitro-Untersuchungen von Nguyen et al. zeigen, dass sich mit Fluorescein markiertes Cholesterin besonders in der lateralen Zellmembran von ÄHZ einlagert. Dies führt zu einer Erhöhung der Steifigkeit der Zellmembran (Nguyen et al. 1998). Cholesterin scheint auch die laterale Diffusion von Membranmolekülen der ÄHZ zu beeinflussen. Eine erhöhte Cholesterinkonzentration vermindert die laterale Diffusion vor allem in der für die Elektromotilität wichtigen

lateralen Zellmembran der ÄHZ. Bei der basalen und apikalen Zellmembran kommt es hingegen zum gegenteiligen bzw. zu keinem Effekt (Organ et al. 2009). Vermutlich sind die Lipidkomponenten der Plasmamembran der ÄHZ auch an der Summation der Kraftwirkung der einzelnen Prestinmoleküle beteiligt. Bei diesem Vorgang könnte das Cholesterin als Hauptmediator der Membranfluidität von Bedeutung sein (Oghalai et al. 1999; Berg et al. 2007).

Neben den passiven Zelleigenschaften beeinflusst Cholesterin auf vielfältige Weise auch das Motorprotein Prestin. So erhöhen sich mit der Cholesterinmenge in der Zellmembran die Interaktionen zwischen den Prestinmolekülen, die durch vermehrte Selbstassoziation zu Dimeren führen (Rajagopalan et al. 2007). Rajagopalan et al. untersuchten im Jahr 2007 in mehreren In-vitro-Versuchen die Auswirkungen von Cholesterin auf die NLC von normalen ÄHZ im Vergleich mit Prestin-transfizierten HEK-Zellen (HEK, human embryonic kidney). Bei beiden Zellarten zeigte sich bei einer Erhöhung der Cholesterinkonzentration eine Verschiebung der Spannung V_{pkc} in die hyperpolarisierende Richtung. Wird die Cholesterinkonzentration verringert, ist der gegenteilige Effekt zu beobachten. Rajagopalan et al. vermuten, dass Cholesterin die Verstärkungsfunktion von Prestin so einstellt, dass es im Bereich des Ruhepotenzials immer mit der maximalen Leistung arbeitet (Rajagopalan et al. 2007). Ein weiterer Einfluss von Cholesterin auf Prestin zeigt sich bei cholesterinreichen Lipid-Mikrodomänen, mit denen Prestin assoziiert ist. Prestin bildet zusammen mit dem Mikrodomänenmarker Integrin 2α VLA- 2α und dem Cholera-toxin-B-Protein Mikrodomänen in der Plasmamembran der ÄHZ. Das Cholera-toxin-B-Protein bindet an das Glykosphingolipid GM1, welches sich in Lipid-Rafts anreichert. Diese Mikrodomänen sind wichtig für die Modulation von Signaltransduktionswegen, für die Zelladhäsion und für die Anordnung von Membranproteinen (Sturm et al. 2007). Die Cholesterindichte in der Zellmembran verändert den Aufbau und die Anzahl derartiger Mikrodomänen. Die Erhöhung der Cholesterindichte in der Zellmembran führt zu einer Zunahme und die Verringerung zu einer Abnahme von Mikrodomänen in der Zellmembran (Rajagopalan et al. 2007; Sturm et al. 2007). Auch könnten diese Lipid-Rafts an der Endozytose von Prestin beteiligt sein und somit die Prestindichte der Zellmembran verringern (Sfondouris et al. 2008).

7. Fragestellung und Zielsetzung

Bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wiesen erste Untersuchungen auf einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Serumcholesterinspiegel und Hörfunktionsstörungen hin (Rosen et al. 1962). Obwohl seitdem viele epidemiologische und klinische Studien durchgeführt wurden, sind die pathophysiologischen Grundlagen dieser Beobachtung noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand kontrovers geführter Diskussionen. Als Pathomechanismen werden neben Störungen der cochleären Durchblutung und morphologischen Veränderungen der Cochlea auch direkte Einwirkungen von Cholesterin auf die äußeren Haarzellen (ÄHZ) angenommen. Dies zeigen vor allem Untersuchungen, die Veränderungen der otoakustischen Emissionen in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration nachgewiesen haben (Preyer et al. 2001; Mazurek et al. 2008). Die ÄHZ sind in der Lage, durch Eigenbewegungen das Schallsignal um 50 dB zu verstärken und die Frequenzselektivität zu verbessern (Liberman et al. 2002). Dieser Mechanismus wird aufgrund seiner Abhängigkeit vom Membranpotenzial auch als Elektromotilität bezeichnet. Rajagopalan et al. vermuten, dass Cholesterin die Verstärkungsfunktion der ÄHZ modifiziert und somit als eine Art Regulator der Elektromotilität wirkt. Als Wirkungsmechanismen von Cholesterin auf die Elektromotilität der ÄHZ kommt der Einfluss auf die Zellmembran bzw. auf das Motorprotein Prestin in Betracht (Rajagopalan et al. 2007). Eine wichtige Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung von Cholesterin auf die Motilität der ÄHZ zu untersuchen, mit dem Ziel, genauere Aussagen über den Zusammenhang zwischen Cholesterin und den Längenänderungen der ÄHZ machen zu können. In früheren Studien wurde meist versucht, diesen Zusammenhang indirekt durch die Messung der nichtlinearen Kapazität (NLC) zu klären (Rajagopalan et al. 2007; Sfondouris et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit sollten die Längenänderungen der ÄHZ mit einer optischen Methode, der Subpixel Videomikroskopie, gemessen werden. Die Subpixel Videomikroskopie weist im Vergleich mit anderen für derartige Untersuchungen geeigneten optischen Verfahren eine außergewöhnlich hohe Auflösung von wenigen Nanometern auf (Davis 1997). Die Längenänderungen der ÄHZ sollten in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration gemessen und die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe aus ÄHZ unter physiologischen Bedingungen verglichen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die unterschiedliche Wirkung von Cholesterin auf die passive Zellmembran und auf das Motorprotein Prestin zu klären. Um zwischen Effekten von

Cholesterin auf die Zellmembran und auf das Motorprotein Prestin differenzieren zu können, muss die Prestinfunktion von ÄHZ durch Reduktion der intrazellulären Chloridkonzentration auf ca. 50 % verringert werden (Oliver et al. 2001). Die ÄHZ mit halber Prestinfunktion werden anschließend in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wird mit einer extrazellulären Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l, die zweite Gruppe ohne Cholesterinzugabe untersucht. Die Auswertung dieser Experimente sollte dann die Frage beantworten, ob der Einfluss von Cholesterin eher das Ergebnis von Auswirkungen auf die passiven Eigenschaften der Zellmembran darstellt oder mehr auf einem Effekt auf die Funktion des Motorproteins Prestin beruht.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Präparation		
Stereomikroskop	Wild M3C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kaltlichtquelle	KL 1500 electronic	Schott AG, Mainz, Deutschland
Herstellung der Lösungen		
Gefrierpunktsmometer	Osmomat 030	Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland
Pipetten	Reference [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Patch-Clamp-Stimulation		
Glaselektrodenziehgerät	DMZ-Universal Puller	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland
Patch-Clamp-Tisch/ Faradayscher Käfig	Micro-g	TMC, Peabody, MA, USA
Patch-Clamp-Verstärker	Axopatch 200A	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA
Patch-Pipettenhalter/ Vorverstärker	CV-201A headstage	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA

Analog-Digital-Wandler	Digidata 1200	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA
Mikromanipulator	Model XR-6	Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan
Videoaufnahmen		
Mikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
Videokamera	Moticam 2000	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland

1.2 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Borosilikat-Glaskapillaren	GC150TF-10	Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Reading, UK
Petrischale	Poly-L-Lysin beschichtet (Ø 35 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

1.3 Chemikalien und Lösungen

1.3.1 Chemikalien

Natriumpentansulfonat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
wasserlösliches Cholesterin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

II. Material und Methoden

1.3.2 Lösungen

Pipetten-Lösungen (Intrazellulärlösungen) (in mmol/l)

Substanz	Standardlösung	Lösung mit 6 mmol/l Chlorid
KCl	140	6
Natriumpentansulfonat	0	134
MgCl ₂ • 6H ₂ O	2	2
EGTA	11	11
CaCl ₂	0,1	0,1
Hepes	10	10
KOH	zum Einstellen eines pH-Wertes von 7,2	
Glucose	zum Einstellen der Osmolarität von 315 - 320 mOsmol/l	

Badlösungen (Extrazellulärlösungen) (in mmol/l)

Substanz	Standardlösung (HBSS-Lösung)	Lösungen mit 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 1,0 mmol/l, 1,5 mmol/l Cholesterin
Cholesterin	0	
CaCl ₂	1,25	1,25
Glucose	5,55	5,55
KCl	5,4	5,4
KH ₂ PO ₄	0,35	0,35
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,81	0,81
NaCl	137	137
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	0,34	0,34
Hepes	5	5
NaOH	zum Einstellen eines pH-Wertes von 7,2 - 7,4	
Glucose	zum Einstellen der Osmolarität von 300 - 310 mOsmol/l	

1.4 Software

pClamp 8 für Windows	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA
Tracker Version 1.1	Infineon Technologies AG, Neubiberg, Deutschland
Motic MC Camera 1.1	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
SPSS [®] Version 12.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

2. Methoden

2.1 Präparation der Cochlea und der äußeren Haarzellen

Die für die Experimente benötigten ÄHZ wurden erwachsenen Albino-Meerschweinchen mit einem Gewicht von 250 g bis 300 g entnommen. Die Cochlea des Meerschweinchens ist im Prinzip wie die des Menschen aufgebaut. Geringe Unterschiede bestehen z.B. in der Anzahl und der Länge der Haarzellen. Die Cochlea des Meerschweinchens ist relativ groß und eignete sich deshalb sehr gut für die Untersuchungen in dieser Arbeit (Nadol 1988). Nach Lieferung der Tiere durch die Firma Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) wurden die Tiere in vollklimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 23 °C unter einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus im Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin gehalten. Den Tieren standen pelletiertes Futter (Ms-H) der ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Unter Beachtung der Tierschutzrichtlinien wurden die Tiere mit CO₂ betäubt, dekapitiert und die Felsenbeine herauspräpariert. Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurden diese bis zur weiteren Präparation in einem mit Eis gekühlten Kulturmedium (HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) aufbewahrt. Durch Zugabe von NaOH wurde ein pH-Wert von 7,2 - 7,4 erzielt. Mit einem Gefrierpunktsmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland) wurde die Osmolarität durch Zufügen von Glucose auf 300 - 310 mOsmol/l eingestellt. Zur Freilegung der Cochlea wurde die Bulla des Felsenbeins mithilfe einer feinen Zange vom Meatus acusticus externus aus eröffnet. Die weitere Präparation erfolgte mit einer feinen Pinzette in einer mit HBSS-Lösung gefüllten Petrischale unter Verwendung eines Stereomikroskops (Wild M3C, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und

einer Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott AG, Mainz, Deutschland). Die Cupula cochleae wurde von apikal eröffnet und die Lamina spiralis ossea im Bereich aller Windungen entfernt, worauf sich die Stria vascularis sowie das Corti-Organ darstellten. Anschließend wurde mit einem Skalpell die Cochlea im Bereich des Modiolus in toto von dem restlichen Felsenbein getrennt. Da sich auch feine Präparationspinzetten als zu grob für die Präparation des Corti-Organs herausstellten, erfolgte diese mit einer selbst hergestellten Nadel aus Edelstahl. Als Grundmaterial diente ein Edelstahldraht mit einem Durchmesser von 0,5 mm, der mit der Anode einer Gleichstromquelle verbunden und in 40 %ige Salzsäure getaucht wurde. Als Kathode diente eine Kupferelektrode. Durch das Anlegen einer Spannung von 3 V wurde der Draht am Ende elektrolytisch extrem stark angespitzt. Diese feine Präparationsnadel ermöglichte ein besonders exaktes Arbeiten. Nach Entfernen der Stria vascularis lag das Corti-Organ frei. Das Corti-Organ der obersten zwei Windungen wurde von der Basilmembran gelöst und mit einer 10 µl Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Petrischale (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit einem Tropfen (160 µl) HBSS-Lösung eingebracht. Dieser Tropfen enthielt in den verschiedenen Versuchsgruppen jeweils eine unterschiedliche Cholesterinkonzentration. Die einzelnen Haarzellen wurden nicht enzymatisch aus dem Zellverband herausgelöst, sondern unter mikroskopischer Kontrolle durch mehrmalige Tituration mit einer 100 µl Pipette, wie von Brownell beschrieben, vorsichtig mechanisch separiert (Brownell et al. 1985). Nach ca. 5 Minuten setzte sich am Boden der Petrischale eine ausreichende Anzahl isolierter Haarzellen ab. Frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass der Einfluss von Cholesterin erst nach einigen Minuten einsetzt, so dass bis zur Messung der Motilität der mit Cholesterin behandelten Zellen mindestens 10 Minuten gewartet wurde (Rajagopalan et al. 2007). Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) durchgeführt.

2.2 Patch-Clamp-Experimente

2.2.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist eine der wichtigsten neurophysiologischen Arbeitsmethoden. Ihre Entwicklung im Jahr 1976 ermöglicht elektrophysiologische Untersuchungen an Zellmembranen mit einer derart hohen Auflösung, dass sogar die Aktivität einzelner Ionenkanäle beobachtet werden kann. Die Entdecker dieses Verfahrens, Erwin Neher und Bert Sakmann, wurden für ihre bahnbrechenden Arbeiten im Jahr 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet (Numberger 1996). Im Prinzip ist die Patch-Clamp-Technik eine Weiterentwicklung des Voltage-Clamp-Verfahrens. Bei diesen Untersuchungsmethoden wird zur Messung von Membranpotenzialänderungen das Membranpotenzial durch einen gleichgroßen Kompensationsstrom ausgeglichen. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotenzial gemessen und mit einer vom Experimentator vorgegebenen Sollspannung verglichen wird. Die Sollspannung wird auch als Klemmspannung (engl. clamp, Klemme) bezeichnet. Unterschiede zwischen der Sollspannung und dem tatsächlich gemessenen Membranpotenzial aktivieren einen Regler, der einen entgegen gerichteten Strom in die Zelle einbringt (Numberger 1996). Die Messung dieses Kompensationsstroms ermöglicht Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Zellmembran, die unter anderem durch Ionenkanäle und Iontentransporter bestimmt wird. Die Verbesserung des Voltage-Clamp-Verfahrens durch die Patch-Clamp-Technik liegt in der erheblichen Reduktion des Hintergrundrauschens, die zu einer 100 - 1000-fach höheren Auflösung des Verfahrens führt. Die Erhöhung der Auflösung wird dadurch ermöglicht, dass eine sehr dünne, mit Elektrolyt-lösung gefüllte Glaspipette als Messelektrode auf einen Fleck (engl. patch, Fleck) der Zellmembran aufgesetzt wird. Dieser Fleck wird durch einen leichten Unterdruck elektrisch von der Umgebung isoliert, bis sich ein Abdichtwiderstand im Gigaohmbereich (Gigaseal) (engl. seal, Abdichtung, Versiegelung) bildet und sich somit das Hintergrundrauschen minimiert (Numberger 1996). Nach Bildung eines Gigaseals befindet sich das Präparat in der Cell-attached-Konfiguration. Abhängig von der Fragestellung des Experiments kann man zwischen vier verschiedenen Konfigurationen wählen (Abbildung 13).

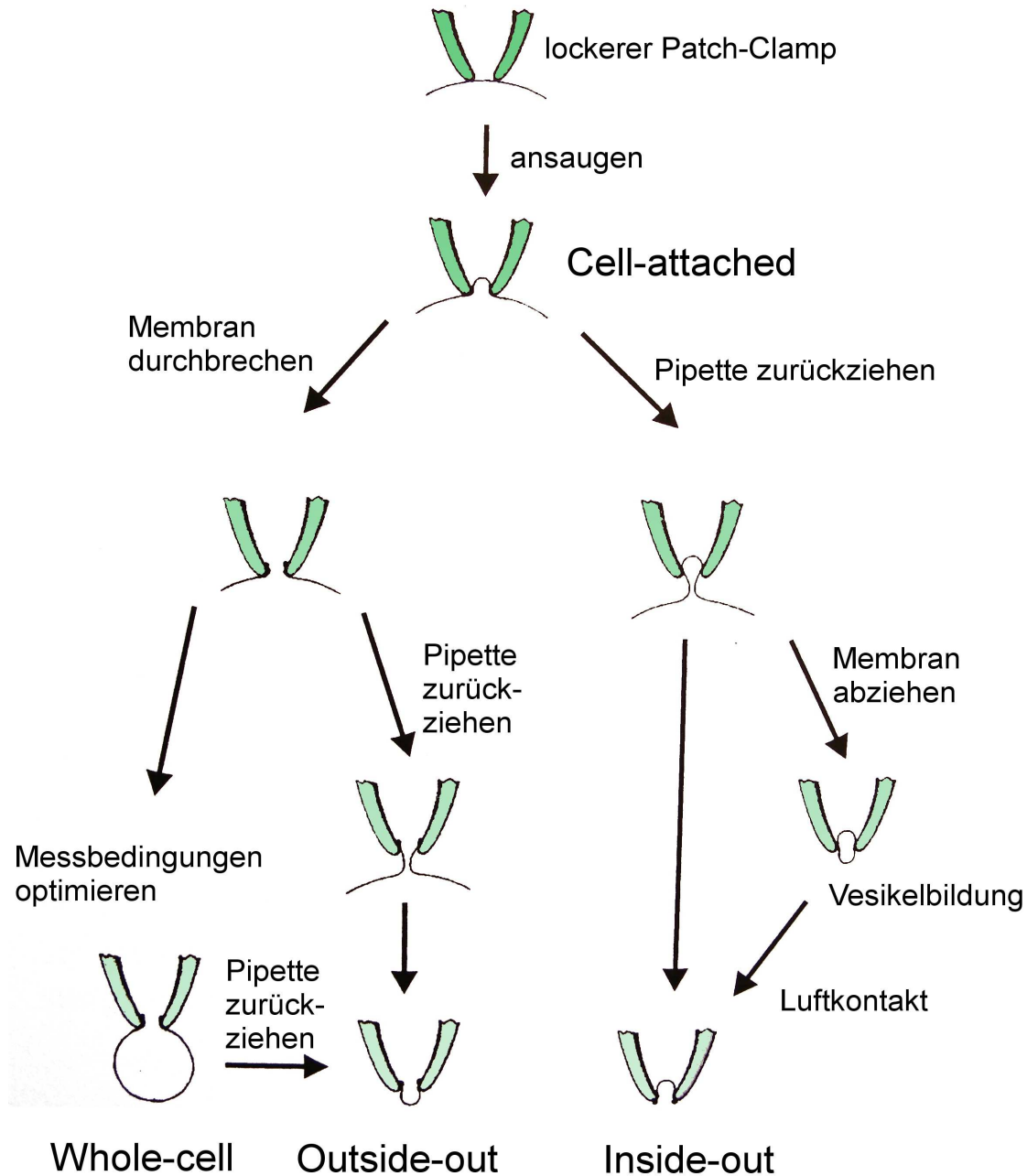


Abbildung 13: Die Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik und ihre Herstellung (verändert nach Numberger 1996)

1. Cell-attached-Konfiguration: Die Cell-attached-Konfiguration entspricht der Ausgangsstellung für alle weiteren Konfigurationen. In dieser Konfiguration ist es nicht möglich, in das intrazelluläre Milieu der Zelle einzugreifen. Die Zelle wird in einem Zustand gemessen, in dem sich auf der intrazellulären Seite der Membran alle Proteine, also auch Ionenkanäle, in ihrer natürlichen Umgebung befinden. Nur der Bereich unterhalb der Pipette, der Patch, wird durch das extrazelluläre Potenzial des Verstärkers kontrolliert.

2. Inside-out-Konfiguration: Durch einen leichten Zug an der Pipette kann nun der Membranfleck herausgetrennt werden. Bei diesem Membranfleck ist das Innere nach außen gekehrt. Dies bedeutet, dass sich jetzt auf der Zytoplasmaseite die Badlösung und auf der Membranaußenseite die Pipettenlösung befinden. Diese Konfiguration nennt man Inside-out-Konfiguration. Hierbei können über Veränderungen der Badlösung zytosolische Einflüsse auf einzelne Ionenkanalaktivitäten erforscht werden (Klinke et al. 2005).

3. Whole-cell-Konfiguration: Ausgehend von der Cell-attached-Konfiguration kann durch Saugen an der Pipette oder durch einen kurzen Spannungsstoß (Buzzing- oder Zap-Modus) der Membranpatch durchbrochen und damit die Whole-cell-Konfiguration erreicht werden. Dadurch entsteht eine durch den Gigaseal elektronisch abgedichtete Verbindung zwischen der Pipette und der Zelle. Im Gegensatz zu den anderen Konfigurationen hat man somit die Möglichkeit, elektrische Ströme über die ganze Zelle zu erfassen bzw. zu induzieren und gleichzeitig das intrazelluläre Milieu durch die Pipettenlösung zu verändern (Numberger 1996). In dieser Arbeit wurde die Whole-cell-Konfiguration zur Veränderung des Membranpotenzials der ÄHZ verwendet.

4. Outside-out-Konfiguration: Von der Ganzzelleableitung gelangt man durch langsamen Zug an der Pipette in die Outside-out-Konfiguration. Wie beim Inside-out-Patch löst sich ein Membranstück aus der Zelle und bildet eine Art Halbvesikel, nur dass nun die Zellmembranaußenseite der Badlösung zugewandt ist. Somit lassen sich die Effekte extrazellulär applizierter Substanzen auf Einzelkanalströme untersuchen (Klinke et al. 2005).

2.2.2 Aufbau und Ausstattung des Messplatzes

Ein Patch-Clamp-Messplatz besteht im Allgemeinen aus einem Mikroskop mit Kamera, aus mechanischen Bauteilen wie dem Mikromanipulator und einem Pipettenhalter (Abbildung 14). Für die Messung und Stimulation werden noch ein Verstärker, ein Vorverstärker und ein Computer benötigt (Numberger 1996). Da die Patch-Clamp-Messungen mit einer extrem sensiblen Technik durchgeführt werden, sind diese sehr empfindlich gegenüber den geringsten mechanischen und elektromagnetischen Störungen. Deshalb wurde der Messplatz durch einen Faradayschen Käfig elektromagnetisch abgeschirmt und mit einem zentralen Erdungsblock verbunden. Ein schwingungsgedämpfter Tisch (Micro-g, TMC, Peabody, MA, USA) diente zur Entkopplung mechanischer Erschütterungen aus der Umgebung. Zur Identifizierung und Selektion der Zellen wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) verwendet, welches mit einem

II. Material und Methoden

beweglichen Mikroskopiertisch ausgestattet war. Das vergrößerte Bild wurde mit einer digitalen Videokamera (Moticam 2000, Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen und digital auf einem Computer gespeichert. Zur Positionierung der Patch-Pipette diente ein hydraulischer Mikromanipulator (Model XR-6, Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan). Die Badelektrode innerhalb der Patch-Pipette war mit einem Vorverstärker (CV-201A headstage, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) verbunden.

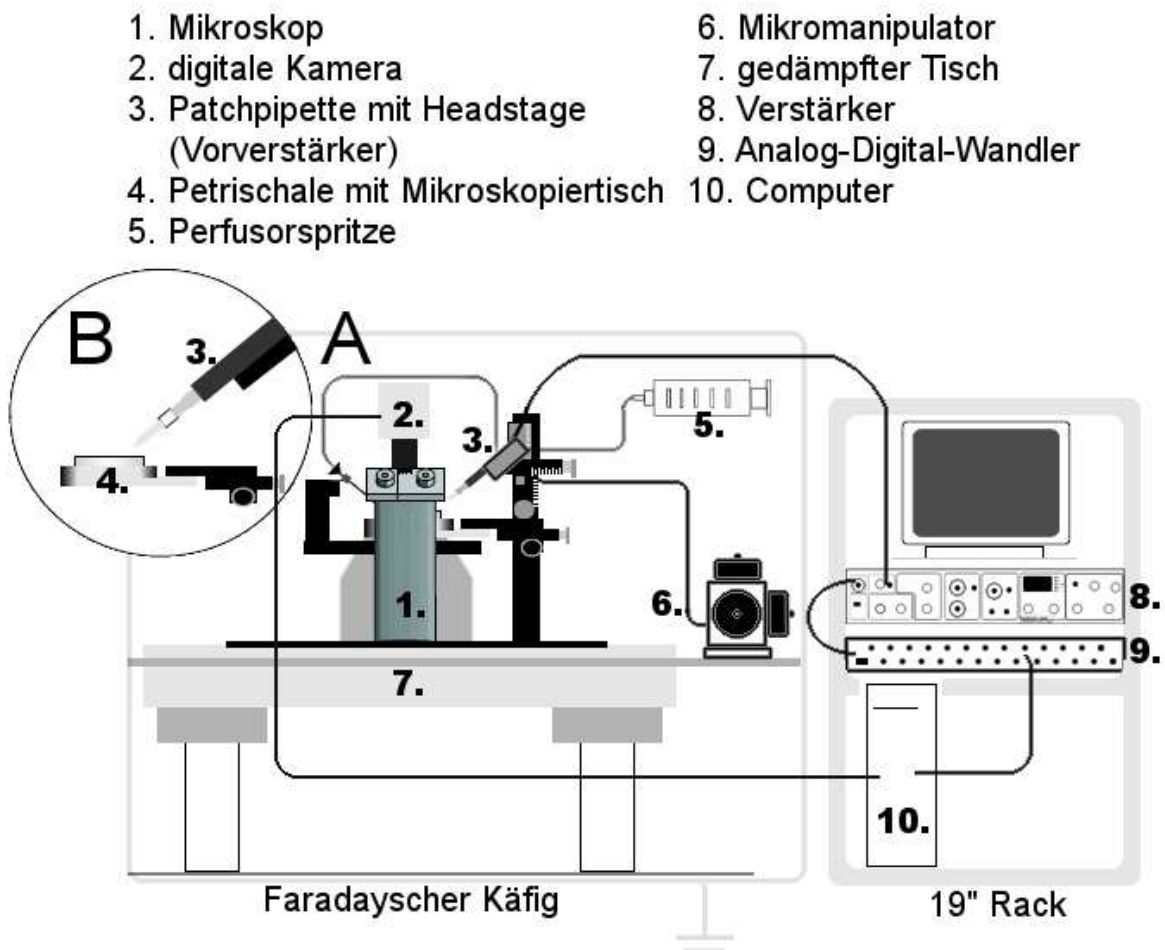


Abbildung 14: **A:** Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes **B:** Vergrößerung des Mikroskopiertisches mit Petrischale und Patch-Pipette (verändert nach Scheel 2002)

Der zum Ansaugen der Zellen benötigte Unterdruck wurde durch eine mit dem Pipettenhalter verbundene Perfusorspritze hergestellt. Der Vorverstärker war mit einem Verstärker (Axopatch 200A, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) verbunden, der

das gewünschte Membranpotenzial aufrechterhielt und den dazu benötigten Kompensationsstrom maß. Der Verstärker stand über einen Analog-Digital-Wandler (Digidata 1200, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) mit einem Computer (Genuine Intel 200 MHz, System Windows NT) in Verbindung. Zur Stimulation wurde das Programm pClamp 8 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) verwendet.

2.2.3 Herstellung der Messelektroden

Die Patch-Elektroden wurden jeweils direkt vor Versuchsbeginn hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienten Kapillaren aus Borosilikatglas (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Reading, UK) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 1,17 mm. Um die erforderliche Pipettenöffnung mit einem Spitzendurchmesser von 1 μm zu erreichen, wurden die Kapillaren mit einem Glaselektrodenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland) erhitzt und in die Länge gezogen. Verletzungen der Zellmembran durch zu spitze Elektroden wurden durch Polierung der Pipetten vermieden. Der Widerstand lag bei den verwendeten Pipetten zwischen 3 M Ω und 6 M Ω . Für die Messelektrode und die Bad-elektrode wurde Silberdraht mit einem Durchmesser von 0,5 mm benutzt. Unterschiede im Redoxpotenzial zwischen beiden Elektroden wurden durch gemeinsames Chlorieren in einer Silberchloridlösung verhindert (Numberger 1996).

2.2.4 Befüllung der Messelektroden

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Pipetten mit Hilfe einer Spritze von der Rückseite befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass der Elektrodendraht gerade noch in die Flüssigkeit eintauchte, da ein Überfüllen Leckströme hervorrufen kann. Auch wurde die Bildung von Luftbläschen in der Pipettenlösung vermieden, weil dies fälschlicherweise zu einem zu hohen Widerstand führen kann (Numberger 1996).

2.2.5 Herstellung der Lösungen

Um physiologische Versuchsbedingungen sicherzustellen und um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurde bei den verwendeten Lösungen auf physiologische Ionenkonzentrationen geachtet. Vor jedem Versuch wurden außerdem der pH-Wert und die Osmolarität auf physiologische Werte eingestellt.

II. Material und Methoden

Als Standardbadlösung diente die schon bei der Präparation beschriebene HBSS-Lösung. Weitere Badlösungen zur Messung des Einflusses von Cholesterin auf die Motilität der ÄHZ enthielten Cholesterin in den Konzentrationen 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 1,0 mmol/l und 1,5 mmol/l. Hierfür wurde wasserlösliches Cholesterin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in der HBSS-Lösung gelöst und der pH-Wert mit NaOH-Lösung auf 7,2 - 7,4 und die Osmolarität mit Glucose auf 300 - 310 mOsmol/l eingestellt.

Wird die Zellmembran perforiert, kommt es zu einem Austausch der intrazellulären Flüssigkeit mit dem wesentlich größeren Volumen der Pipettenlösung (Numberger 1996). Dies ist von Nachteil, da das Zytoplasma durch den Verlust von Proteinen seine natürliche Zusammensetzung verliert. Andererseits hat der Experimentator die Möglichkeit, das intrazelluläre Milieu genau zu kontrollieren und Substanzen einzubringen. Dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration und zur Einbringung des Chloridersatzstoffes Natriumpentansulfonat genutzt. Die Versuchsreihen unterschieden sich in der Zusammensetzung ihrer intrazellulären Lösungen. Die physiologische Pipettenlösung setzte sich wie folgt zusammen: [KCl] = 140 mmol/l, [MgCl₂] = 2 mmol/l, [EGTA] = 11 mmol/l, [CaCl₂] = 0,1 mmol/l, [Hepes] = 10 mmol/l. Mit einer einmolaren KOH-Lösung wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,2 gebracht. Die Osmolarität wurde durch Zugabe von Glucose unter Verwendung eines Gefrierpunktsmometers auf Werte zwischen 315 und 320 mOsmol/l eingestellt. Aufgrund der Wirkung des Chlorids als Spannungssensor für das Prestin ist man in der Lage, durch Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration die Prestinfunktion zu beeinflussen. Nach Oliver et al. verringert eine Chloridkonzentration von ca. 6 mmol/l die Prestinfunktion auf die Hälfte (Oliver et al. 2001). Diese Chloridkonzentration diente dazu, die Auswirkungen von Cholesterin bei halbmaximaler Prestinfunktion zu untersuchen. Um die Osmolarität und das Ionengleichgewicht konstant zu halten, wurde das entzogene Chlorid durch Natriumpentansulfonat ersetzt. Die Pipettenlösung enthielt somit eine Chloridkonzentration von 6 mmol/l sowie eine Natriumpentansulfonatkonzentration von 134 mmol/l. Insgesamt wurden zwei Messreihen mit einer intrazellulären Chloridkonzentration von 6 mmol/l untersucht. Eine Messreihe wurde ohne Cholesterin und eine weitere Messreihe mit einer extrazellulären Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l durchgeführt.

2.2.6 Messung des Elektrodenwiderstandes und Offsetkorrektur

Die Pipette wurde befüllt und so in den Pipettenhalter eingespannt, dass die Pipettenspitze in die Badlösung eintauchte. Durch einen leichten Überdruck konnte das Verstopfen der Pipette durch eingesaugte Partikel vermieden werden. Mit dem Programm pClamp 8 wurde ein negativer Testimpuls mit einer Spannung von 5 mV über einen Zeitraum von 5 ms generiert. Aus der daraus resultierenden Stromantwort wurde mit dem Programm der vorliegende Elektrodenwiderstand auf der Basis des Ohmschen Gesetzes berechnet. Dieser Widerstand lag bei den Versuchen zwischen 3 M Ω und 6 M Ω (Abbildung 15 A).

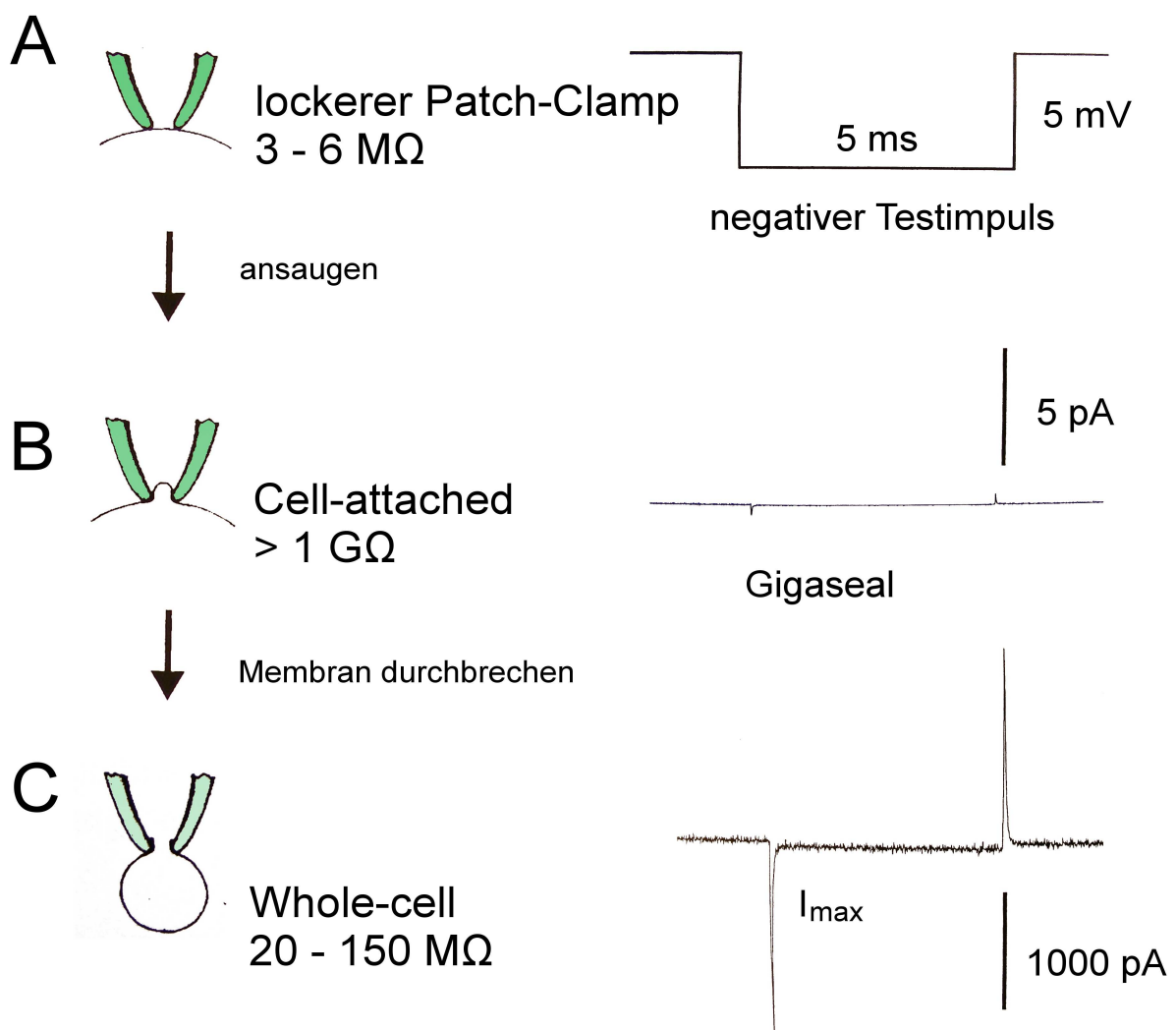


Abbildung 15: Änderung von Widerstand und Stromantwort auf den durch die Patch-Pipette induzierten Testimpuls in Abhängigkeit von der Konfiguration der Patch-Clamp-Apparatur (verändert nach Numberger 1996)

Spannungen, die nicht von der Zelle oder vom Testimpuls stammen, werden Offsetpotenziale genannt (Numberger 1996). Diese durch Polarisierungen der Silber/Silberchlorid-Elektroden und durch Übergangspotenziale zwischen verschiedenen Elektrolytkonzentrationen in Bad und Pipette ausgelösten Potenziale können die Messergebnisse verfälschen. Diese Potenziale müssen vor jeder Messung mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers kompensiert werden und sollten 10 mV nicht überschreiten (Numberger 1996).

2.2.7 Whole-cell-Patch-Clamp und Stimulation

Unter dem Mikroskop wurden bei geringer Vergrößerung geeignete vitale Zellen ausgewählt. Zur Beurteilung der Zellen wurden die Vitalitätskriterien von Zajic und Schacht (Zajic et al. 1987) herangezogen. Die Zellen wiesen steif aussehende Stereovilli, einen am basalen Pol lokalisierten Zellkern, leichte, zufällige Bewegungen der zytoplasmatischen Partikel sowie eine durchgängig intakte Zellmembran auf (Abbildung 16).



Abbildung 16: Isolierte äußere Haarzelle mit Resten von Stützgewebe und Patch-Pipette

Eine den Kriterien entsprechende Zelle wurde bei 320-facher Vergrößerung im Sichtfeld fixiert und die Pipettenspitze mit dem Mikromanipulator auf die Zellmembran im basalen Drittel der Zelle aufgesetzt (Abbildung 16). Um die Zellmembran nicht zu schädigen, musste vorher der Überdruck auf ein Minimum reduziert werden. An der Ansatzstelle der Pipettenspitze war an der Zelle das so genannte Dimpling (engl. dimple, eindellen) zu erkennen. Dabei handelt es sich um einen charakteristischen Lichtreflex, der durch die Eindellung der Membran aufgrund der aus der Pipette strömenden Flüssigkeit entsteht. Durch leichtes Ansaugen erhöhte sich der Widerstand bis zur Ausbildung eines Gigaseals mit einem Widerstand von über 1 G Ω . Die Stromantwort des Testimpulses verlief nun bis auf kleine kapazitive Artefakte am Anfang und Ende nahezu horizontal (Abbildung 15 B). Um von der vorliegenden Cell-attached-Konfiguration zu der gewünschten Whole-cell-Konfiguration zu gelangen, wurde der Patch mit einem kurzen Spannungsimpuls (Zap) zerstört. Zuvor war ein dem Ruhemembranpotenzial von -70 mV entsprechendes Haltepotenzial eingestellt worden. Durch die Perforation der Zellmembran fiel der gemessene Widerstand auf Werte zwischen 20 M Ω und 150 M Ω . Da nun Umladungen nicht nur im Bereich des Patches, sondern über die gesamte Zellmembran stattfinden, verändert sich das Bild der Stromantwort. Es entsteht ein fast senkrecht ansteigender kapazitiver Ladestrom I_{\max} , der anschließend exponentiell abfällt, bis nur noch ein geringes negatives Offsetpotenzial erhalten bleibt (Numberger 1996) (Abbildung 15 C). In der Whole-cell-Konfiguration konnte durch die Software pClamp 8 das Membranpotenzial fast verlustfrei durch ein vorher festgelegtes Programm modifiziert werden. Ausgehend von einem Ruhemembranpotenzial von -70 mV wurde zuerst die Zelle auf -170 mV hyperpolarisiert. Anschließend erfolgte in 10 mV-Schritten eine Depolarisation bis zu einem Membranpotenzial von +30 mV. Die Dauer dieser schrittweisen Potenzialveränderungen betrug jeweils 500 ms.

2.2.8 Videomikroskopische Aufnahmen

Während der Stimulation wurde die Zelle mit einer digitalen Videokamera gefilmt. Die erstellten AVI-Videodateien hatten eine Auflösung von 1600 x 1200 Pixel mit einer Bildfrequenz von 10 Bilder/s. Zur Filmanalyse diente die Software Tracker Version 1.1 (Infineon Technologies AG, Neubiberg, Deutschland). Am apikalen Ende der Haarzelle wurde ein bestimmter Bereich (ROI, region of interest) ausgewählt, dessen Bewegungen von der Software Tracker Version 1.1 im Subpixelbereich gemessen wurden. Die

Subpixelanalyse (engl. subpixel, Teilbildpunkt) ist ein mathematisches Verfahren zur Erhöhung der Bildinformation über das Niveau von einzelnen Pixel (Davis 1997). Die Ergebnisse wurden als Anzahl der Subpixel mit einer Genauigkeit von 1/1000 Pixel ausgegeben. Über die Pixelgröße (4,2 µm) und die Vergrößerung (320-fach) konnten die Längenänderungen mit der Formel [(Anzahl der Subpixel x Pixelgröße) / Vergrößerung] berechnet werden. Mit Hilfe der Subpixelteilung kann die maximale Auflösung von 13 nm bis auf wenige nm herabgesetzt werden (Davis 1997).

2.2.9 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung der Statistiksoftware SPSS[®] Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Längenänderungen unter dem Einfluss der Chloriddeletion und der Cholesterinzugabe wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student-T-Tests für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als signifikant und ein p-Wert von < 0,01 als hoch signifikant angesehen. Die Werte wurden in Mittelwert ± Standardfehler aufgeführt.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Studie und allgemeine Ergebnisse

Für die Untersuchung über die Auswirkungen von Cholesterin auf die Elektromotilität der ÄHZ und das Motorprotein Prestin wurden insgesamt 77 Zellen verwendet. Mit diesen Zellen wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst wurden die Längenänderungen von 12 ÄHZ unter physiologischen intra- und extrazellulären Bedingungen gemessen. Diese Zellen dienten zugleich als Kontrollgruppe. Um den Einfluss von Cholesterin auf die Motilität der ÄHZ zu quantifizieren, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die ÄHZ steigenden Cholesterinkonzentrationen ausgesetzt. Dabei wurden die Längenänderungen von 12 Zellen mit 0,1 mmol/l, 10 Zellen mit 0,5 mmol/l, 12 Zellen mit 1 mmol/l und von 7 Zellen mit 1,5 mmol/l Cholesterin gemessen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Cholesterin auf das Bewegungsverhalten der Zellen bei halbmaximaler Prestinfunktion untersucht, indem bei 12 Zellen das Motorprotein Prestin durch Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration gehemmt und extrazellulär 1 mmol/l wasserlösliches Cholesterin appliziert wurde. Als Vergleichsgruppe für die dritte Versuchsreihe dienten 12 ÄHZ mit halbmaximaler Prestinfunktion, bei denen kein Cholesterin zugegeben wurde. Die Längenänderungen der ÄHZ zeigten alle das in der Literatur beschriebene Muster einer Boltzmannfunktion (Ashmore 2008). Hyperpolarisierende Spannungen im Bereich von -70 mV bis -170 mV erzeugten eine Verlängerung der Zellen, während depolarisierende Spannungen im Bereich von -70 mV bis +30 mV zu einer Verkürzung der Zellen führten. Das Ausmaß der Längenänderungen war bei Spannungen gegensätzlicher Polarität asymmetrisch. Die durch Hyperpolarisation ausgelöste Verlängerung war geringer als die durch Depolarisation ausgelöste Verkürzung. Der Vergleich der einzelnen Gruppen ergab Veränderungen bei der maximalen Elongation und Verkürzung, der durchschnittlichen Längenänderung in Depolarisations- und Hyperpolarisationsrichtung, dem Betrag der größten Steigung der L-V-Kurve und der an dieser Stelle angelegten Spannung V_{pkc} .

2. Motilität der äußeren Haarzellen bei physiologischen Bedingungen

Durch Messung der Längenänderungen von 12 ÄHZ mit physiologischer intra- und extrazellulärer Flüssigkeitszusammensetzung konnte das Bewegungsverhalten unter weitgehend physiologischen Bedingungen gemessen werden. Die maximale Verkürzung bei einer Spannung von +30 mV betrug -1208 ± 96 nm, die maximale Elongation bei einer Spannung von -170 mV 281 ± 44 nm. Die durchschnittliche Längenänderung ergab bei Depolarisation von -70 mV bis +30 mV ca. 12 nm/mV und bei Hyperpolarisation von -70 mV bis -170 mV ca. 3 nm/mV. Die größte Steigung der L-V-Kurve, also der Bereich der größten Längenänderung in Abhängigkeit von der Spannung, betrug 27 nm/mV. Dieser Wert wurde bei einer Spannung V_{pkc} von -50 mV gemessen (Abbildung 17, Tabelle 1).

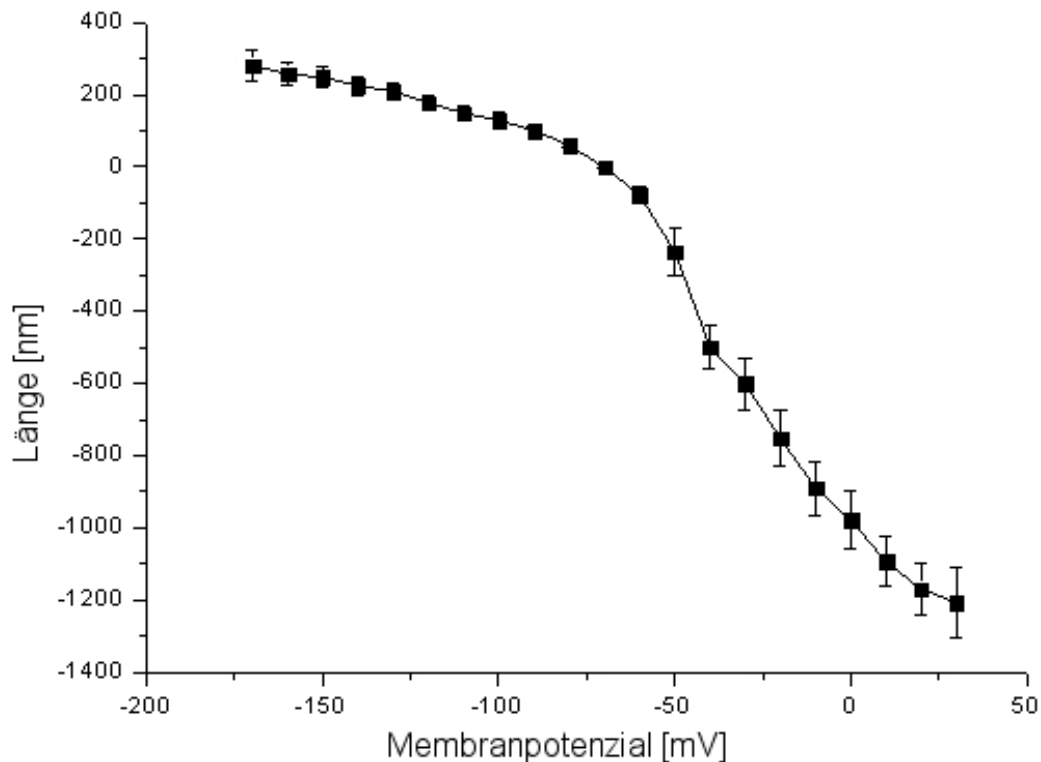


Abbildung 17: Motilität der äußeren Haarzellen unter physiologischen Bedingungen (140 mmol/l Chlorid, 0 mmol/l Cholesterin)

3. Motilität der äußeren Haarzellen unter dem Einfluss von Cholesterin

Um den Einfluss von Cholesterin auf die Motilität der ÄHZ zu untersuchen, wurden die Messungen mit Badlösungen mit den Cholesterinkonzentrationen von 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 1,0 mmol/l und 1,5 mmol/l durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 und Tabelle 1 aufgeführt.

		<u>Kontrollgruppe</u>	0,1 mmol/l Cholesterin (12 Zellen)	0,5 mmol/l Cholesterin (10 Zellen)	1,0 mmol/l Cholesterin (12 Zellen)	1,5 mmol/l Cholesterin (7 Zellen)
1. Steigung	Maximale Steigung (nm/mV)	27	21	16	24	19
	Spannung bei der maxi- malen Steigung (V_{pke}) (mV)	-50	-50 bis -60	-60 bis -70	-70	-60
2. Maximale Längenänderung	Verlängerung bei -170 mV (nm)	281 ± 44	265 ± 35 (-6 %)*	255 ± 22 (-9 %)*	256 ± 19 [§] (-9 %)*	212 ± 19 [§] (-25 %)*
	Verkürzung bei +30 mV (nm)	-1208 ± 96	-1196 ± 95 (< 1 %)*	-1068 ± 66 (-12 %)*	-859 ± 91 [§] (-29 %)*	-769 ± 63 [§] (-36 %)*
3. Durchschnittl. Längenänderung	bei Depolarisation -70 mV bis +30 mV (nm/mV)	12	12	10	9	8
	bei Hyperpolarisation -70 mV bis -170 mV (nm/mV)	3	3	3	4	4
<p>* Veränderung in % relativ zur Kontrollgruppe</p> <p>§ p < 0,01 vs. Kontrollgruppe</p> <p>\$ p < 0,05 vs. Kontrollgruppe</p>						

Tabelle 1: Untersuchungsergebnisse bei verschiedenen extrazellulären Cholesterinkonzentrationen

3.1 Cholesterinkonzentration von 0,1 mmol/l

Bei einer Badlösung mit einer Cholesterinkonzentration von 0,1 mmol/l konnten bezüglich der untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Die maximale Verkürzung bei einer Spannung von +30 mV und die maximale Verlängerung bei einer Spannung von -170 mV verringerten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils nicht signifikant auf die Werte -1196 ± 95 nm bzw. 265 ± 35 nm. Die durchschnittliche Längenänderungen von 12 nm/mV bei Depolarisation und von 3 nm/mV bei Hyperpolarisation entsprechen den bei ÄHZ in physiologischer Lösung gemessenen Werten. Die größte Steigung der L-V-Kurve betrug 21 nm/mV bei einer Spannung V_{pkc} zwischen -50 mV bis -60 mV (Abbildung 18 B, Tabelle 1).

3.2 Cholesterinkonzentration von 0,5 mmol/l

Eine Badlösung mit einer Cholesterinkonzentration von 0,5 mmol/l führte zu einer weiteren Verringerung der Beweglichkeit. Die maximale Verkürzung bei einer Spannung von +30 mV betrug -1068 ± 66 nm, die maximale Verlängerung bei einer Spannung von -170 mV 255 ± 22 nm. Die durchschnittliche Längenänderung verringerte sich bei Depolarisation gegenüber der Kontrollgruppe von 12 nm/mV auf 10 nm/mV, wogegen sie sich bei Hyperpolarisation mit 3 nm/mV nicht von der Kontrollgruppe unterschied. Die maximale Steigung der L-V-Kurve bei einer Spannung V_{pkc} zwischen -60 mV und -70 mV ergab 16 nm/mV. Diese Veränderungen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant (Abbildung 18 C, Tabelle 1).

3.3 Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l

Die Versuchsreihe mit einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l zeigte bei einer Spannung von +30 mV im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante ($p < 0,01$) Verringerung der maximalen Verkürzung um 29 % auf -859 ± 91 nm. Die maximale

Verlängerung bei -170 mV reduzierte sich um 9 % signifikant ($p < 0,05$) auf 256 ± 19 nm. Die durchschnittliche Längenänderung betrug bei Depolarisation ca. 9 nm/mV und bei Hyperpolarisation ca. 4 nm/mV. Der Vergrößerung der durchschnittlichen Längenänderung bei Hyperpolarisation lag eine Verschiebung der L-V-Kurve in die hyperpolarisierende Richtung zugrunde. V_{pkc} verschob sich bei dieser Cholesterinkonzentration nicht signifikant von -50 mV bei der Kontrollgruppe auf -70 mV. Die maximale Steigung betrug bei dieser Spannung 24 nm/mV (Abbildung 18 D, Tabelle 1).

3.4 Cholesterinkonzentration von 1,5 mmol/l

Sieben weitere ÄHZ wurden bei einer extrazellulären Cholesterinkonzentration von 1,5 mmol/l untersucht. Dabei konnte bei einer Spannung von +30 mV eine weitere Abnahme der maximalen Verkürzung auf -769 ± 63 nm und bei einer Spannung von -170 mV eine weitere Abnahme der maximalen Verlängerung auf 212 ± 19 nm beobachtet werden. Dies entspricht einer signifikanten Bewegungsverringering im Vergleich zur Kontrollgruppe um 36 % bei Verkürzung ($p < 0,01$) und um 25 % bei Verlängerung ($p < 0,05$). Die Zellen liegen bei einem Ruhemembranpotential von -70 mV schon deutlich verkürzt vor. Eine Depolarisation führt dann noch zusätzlich zu einer reduzierten Verkürzung, so dass sich der Gesamtbetrag der Verkürzung noch deutlicher von der maximalen Verkürzung unter physiologischen Bedingungen unterscheidet. Dies gilt in abgeschwächtem Maß auch für die Cholesterinkonzentrationen von 0,5 mmol/l und von 1,0 mmol/l. Die durchschnittliche Längenänderung bei Depolarisation und bei Hyperpolarisation zeigte mit 8 nm/mV bzw. 4 nm/mV keine signifikante Veränderung gegenüber der Versuchsgruppe mit einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l. Die maximale Steigung betrug 19 nm/mV bei einer Spannung V_{pkc} von -60 mV (Abbildung 18 E, Tabelle 1).

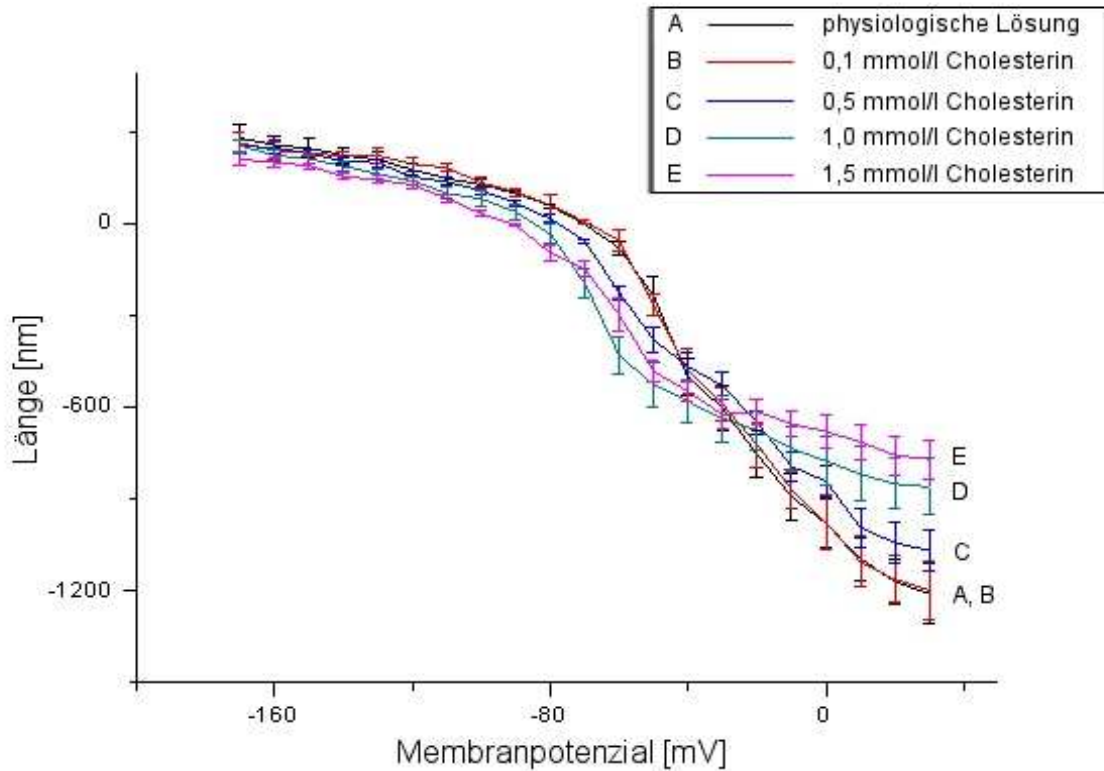


Abbildung 18: Motilität der äußeren Haarzellen unter physiologischen Bedingungen und in Abhängigkeit von unterschiedlichen extrazellulären Cholesterinkonzentrationen

4. Einfluss von Cholesterin auf das Motorprotein Prestin

Um den Einfluss von Cholesterin auf die passive Zellmembran bzw. auf das Motorprotein Prestin zu untersuchen, wurde bei 24 ÄHZ die Prestinfunktion auf ca. 50 % verringert. Dazu wurde die intrazelluläre Chloridkonzentration von 140 mmol/l auf 6 mmol/l herabgesetzt und das entzogene Chlorid durch 134 mmol/l Natriumpentansulfonat ersetzt. Anschließend wurden die ÄHZ mit halbmaximaler Prestinfunktion in zwei Vergleichsgruppen aufgeteilt. Zwölf ÄHZ befanden sich während der Untersuchungen in einer physiologischen Badlösung. Weitere 12 ÄHZ wurden in einer extrazellulären Cholesterinlösung mit der Konzentration 1,0 mmol/l untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 und Tabelle 2 aufgeführt.

		Kontrollgruppe 140 mmol/l Cl ⁻ , 0 mmol/l Chol. (12 Zellen)	140 mmol/l Cl ⁻ , 1 mmol/l Chol. (12 Zellen)	6 mmol/l Cl ⁻ , 0 mmol/l Chol. (12 Zellen)	6 mmol/l Cl ⁻ , 1 mmol/l Chol. (12 Zellen)
1. Steigung	Maximale Steigung (nm/mV)	27	24	14 [§]	12
	Spannung bei der maximalen Steigung (V _{pkc}) (mV)	-50	-70	-50	-70
2. Maximale Längenänderung	Verlängerung bei -170 mV (nm)	281 ± 44	256 ± 19 [§] (-9 %)*	135 ± 19 [§] (-48 %)*	128 ± 12 (-54 %)*,(-5 %) [#]
	Verkürzung bei +30 mV (nm)	-1208 ± 96	-859 ± 91 [§] (-29 %)*	-584 ± 71 [§] (-48 %)*	-479 ± 69 [€] (-60 %)*,(-18 %) [#]
3. Durchschnittl. Längenänderung	bei Depolarisation -70 mV bis +30 mV (nm/mV)	12	9	6	4
	bei Hyperpolarisation -70 mV bis -170 mV (nm/mV)	3	4	1	2
<p>* = Veränderung in % relativ zur Kontrollgruppe # = Veränderung in % relativ zu 6 mmol/l Chlorid, 0 mmol/l Cholesterin § = p < 0,01 vs. Kontrollgruppe \$ = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe € = p < 0,01 vs. 6 mmol/l Chlorid, 0 mmol/l Cholesterin</p>					

Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse bei verschiedenen intrazellulären Chlorid- und extrazellulären Cholesterinkonzentrationen

4.1 Motilität der äußeren Haarzellen unter physiologischen Bedingungen bei Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration auf 6 mmol/l

Die ÄHZ mit einer intrazellulären Chloridkonzentration von 6 mmol/l und einer physiologischen Badlösung wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante (p < 0,01) Verringerung der maximalen Verkürzung und der maximalen Verlängerung auf. Die

maximale Verkürzung bei einer Spannung von +30 mV reduzierte sich auf -584 ± 71 nm, die maximale Verlängerung bei einer Spannung von -170 mV auf 135 ± 19 nm. Dies entspricht jeweils einer Abnahme um 48 % gegenüber der Kontrollgruppe und damit einer halbmaximalen Prestinfunktion. Die durchschnittliche Längenänderung betrug bei Depolarisation von -70 mV bis +30 mV ca. 6 nm/mV und bei Hyperpolarisation von -70 mV bis -170 mV ca. 1 nm/mV. Die größte Längenänderung in Abhängigkeit von der Spannung verringerte sich bei einer Spannung V_{pkc} von -50 mV im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,01$) von 27 nm/mV auf 14 nm/mV (Abbildung 19 A/C, Tabelle 2).

4.2 Motilität der äußeren Haarzellen bei Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration auf 6 mmol/l und einer extrazellulären Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l

Die 12 ÄHZ mit intrazellulärer Chloridverringerung auf 6 mmol/l und extrazellulärer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l zeigten im Vergleich zu den 12 ÄHZ mit einer Chloridverringerung auf 6 mmol/l aber ohne Cholesterin eine weitere Abnahme der Elektromotilität. Die maximale Verkürzung bei einer Spannung von +30 mV verringerte sich signifikant ($p < 0,01$) von -584 ± 71 nm um 18 % auf -479 ± 69 nm. Die maximale Verlängerung bei einer Spannung von -170 mV reduzierte sich in nicht signifikanter Weise von 135 ± 19 um 5 % auf 128 ± 12 nm (Abbildung 20 C/D, Tabelle 2). Die durchschnittliche Längenänderung bei diesen ÄHZ betrug bei Depolarisation von -70 mV bis +30 mV ca. 4 nm/mV und bei Hyperpolarisation von -70 mV bis -170 mV ca. 2 nm/mV. Die größte Steigung der L-V-Kurve verringerte sich in nicht signifikanter Weise auf 12 nm/mV und trat bei einer Spannung V_{pkc} von -70 mV auf.

Der Vergleich dieser ÄHZ mit einer Chloridkonzentration von 6 mmol/l und einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l mit den ÄHZ mit der gleichen Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l, aber einer physiologischen Chloridkonzentration von 140 mmol/l, ergab bei der maximalen Längenänderung, bei der durchschnittlichen Längenänderung bei Depolarisation und Hyperpolarisation und bei der maximalen Steigung der L-V-Kurve jeweils annähernd eine Halbierung der Werte (Abbildung 20 B/D, Tabelle 2). Dieser Vergleich bestätigt die Versuchsergebnisse aus 4.1 bei halbmaximaler Prestinfunktion.

Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich bei diesen ÄHZ eine Reduktion der Motilität um 60 % bei der maximalen Verkürzung und um 54 % bei der maximalen Verlängerung (Abbildung 20 A/D, Tabelle 2). Bei diesem Vergleich ist jedoch zu beachten, dass mit der Chloridkonzentration und mit der Cholesterinkonzentration zwei Parameter gleichzeitig verändert wurden.

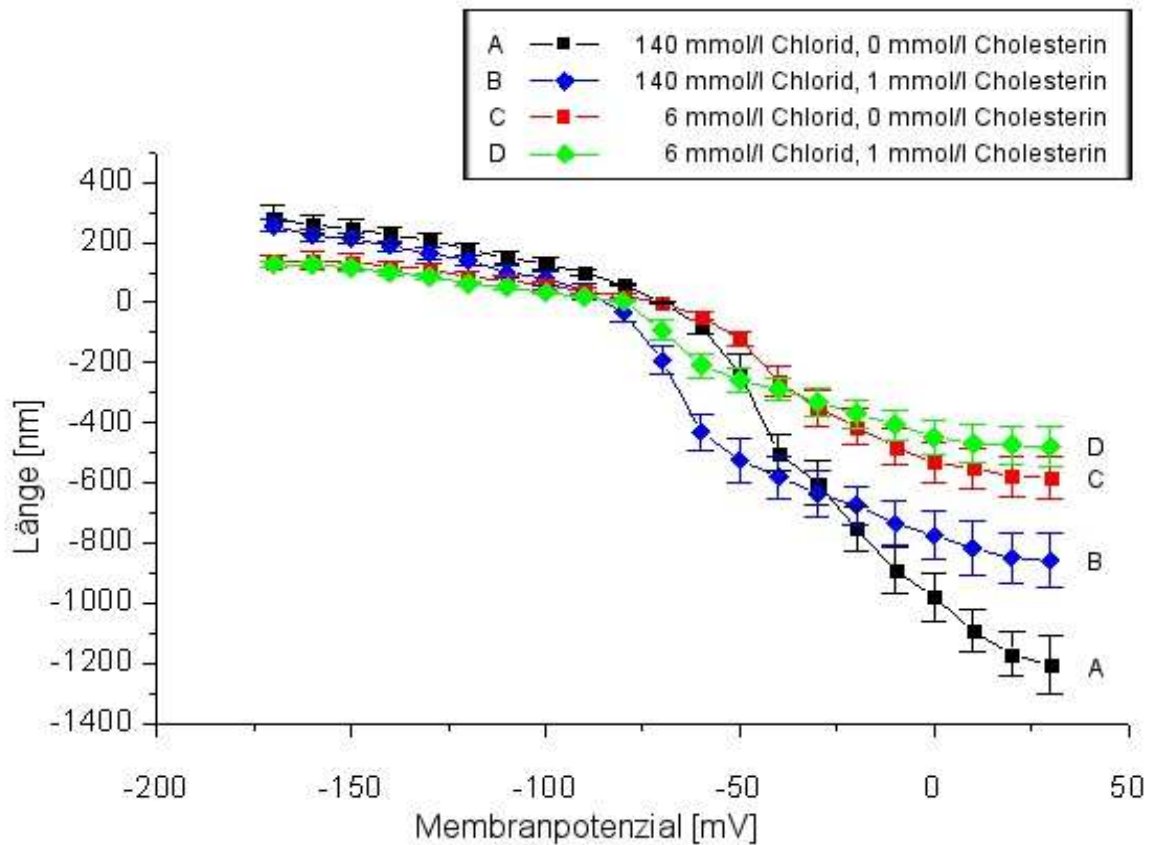


Abbildung 19: Motilität der äußeren Haarzellen **A:** unter physiologischen Bedingungen **B:** bei extrazellulärer Cholesterinzugabe **C:** bei halbmaximaler Prestinfunktion **D:** bei halbmaximaler Prestinfunktion und extrazellulärer Cholesterinzugabe

IV. Diskussion

1. Verfahren zur Messung der Elektromotilität

1.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Sensitivität und Selektivität des Hörvorgangs bei Säugetieren werden durch spannungsabhängige Längenänderungen der ÄHZ der Cochlea gesteigert. Dieser Vorgang, der als Elektromotilität bezeichnet wird, beruht auf der Beweglichkeit eines in der Zellmembran der ÄHZ lokalisierten Membranproteins, das als Prestin bezeichnet wird (Zheng et al. 2000). Prestin vermag spannungsabhängige Konformationsänderungen durchzuführen. Diese rufen in den ÄHZ somatische Längenänderungen hervor, die die mechanische Energie auf die Tektorialmembran übertragen. Als Spannungssensor für das Prestin dienen intrazelluläre Anionen wie Chlorid- und Bicarbonationen, die über die Zellmembran verteilt sind (Oliver et al. 2001). Der Transport von Anionen verursacht eine nichtlineare Kapazität (NLC), die gemessen werden kann (Ashmore 1990). Seit Beginn der experimentellen Erforschung der Elektromotilität der ÄHZ in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden mehrere Verfahren zur Messung der Elektromotilität entwickelt. Die Elektromotilität von ÄHZ kann indirekt durch Messung der NLC untersucht werden. Daneben können die Längenänderungen von ÄHZ auch direkt mit optischen Methoden gemessen werden, z.B. mit der Videomikroskopie mit Bewegungsanalyse auf Subpixel-niveau, die auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam.

1.2 Nichtoptische Methode

Die Elektromotilität kann indirekt durch die Bestimmung der NLC untersucht werden. Diese Methode hat gegenüber der in dieser Arbeit verwendeten optischen Methode den Vorteil, dass Prestin-transfizierte HEK-Zellen untersucht werden können. HEK-Zellen werden aus embryonalen Nierenzellen hergestellt und sind leicht zu kultivieren. Damit sind sie einfacher zu handhaben als ÄHZ, die erst von Versuchstieren gewonnen werden

müssen. Prestin-transfizierte HEK-Zellen weisen hinsichtlich der NLC ein sehr ähnliches Verhalten wie die ÄHZ auf. Die NLC entspricht membranpotenzialabhängigen Ladungsverschiebungen der Zellmembran und verändert sich gleichzeitig mit der Längenänderung (Santos-Sacchi 1991). Die graphische Darstellung der NLC in Abhängigkeit vom Membranpotenzial zeigt einen glockenförmigen Kurvenverlauf (Ashmore 1990). Das Maximum der NLC und die maximale Steigung der L-V-Kurve werden bei der gleichen Spannung V_{pkc} erreicht. V_{pkc} liegt bei unbehandelten Zellen bei -50 mV und gibt die Spannung an, bei der am effektivsten eine Bewegung erzeugt wird. Die NLC kann durch viele Faktoren, wie z.B. durch den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine oder durch regulierend wirkende Substanzen wie Cholesterin, beeinflusst werden (Rajagopalan et al. 2007; Ashmore 2008). Studien, die die Abhängigkeit der NLC von derartigen Faktoren zum Inhalt haben, ermöglichen vergleichende Betrachtungen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

1.3 Optische Methoden

Zur direkten Messung der Elektromotilität der ÄHZ stehen mehrere optische Verfahren zur Verfügung. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Videomikroskopie werden häufig auch Photodioden benutzt. Die Zelllängenänderungen werden hierbei durch die Projektion des mikroskopisch vergrößerten Bildes auf parallel angeordnete Photodioden gemessen. Die Auflösung liegt bei 15 nm bis 50 nm. Diese Methode hat den Vorteil, schnelle Bewegungen mit einer Frequenz von bis zu 3000 Hz abzubilden. Bei der Videomikroskopie hingegen wird die Frequenz der zu beobachtenden Bewegungen durch die Bildfrequenz der Kamera begrenzt. Es können nur Bewegungen mit maximal der halben Bildfrequenz der Kamera erfasst werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kamera hatte eine Bildfrequenz von 10 Hz. Dadurch war die zeitliche Bewegungsanalyse auf 5 Hz beschränkt. Dies war jedoch aufgrund der geringen Stimulationsfrequenz von 2 Hz ausreichend. Allerdings können auch bei videomikroskopischen Methoden durch Verwendung einer getakteten stroboskopischen Beleuchtung höhere Frequenzen zeitlich analysiert werden. Der Vorteil der Videomikroskopie gegenüber Photodioden ist die wesentlich einfachere Handhabung. Photodioden müssen vor jeder Messung kalibriert werden, was bei der Videomikroskopie

nicht nötig ist. Darüber hinaus verfügen Photodioden über eine deutliche Einschränkung des Messbereichs, da nur Messungen im nichtlinearen Bereich durchgeführt werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Videomikroskopie weist keine derartigen Beschränkungen auf (Ashmore 1987; Davis 1997).

Videomikroskopische Messtechniken basieren darauf, dass ein mikroskopisch vergrößertes Bild der Zelle mit einer Videokamera aufgezeichnet wird. Im Gegensatz zur Photodiodentechnik, bei der die Daten sofort erhoben werden, können hier die Aufzeichnungen zu einem beliebigen Zeitpunkt analysiert werden. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Bewegungsanalyse auf Subpixelniveau werden auch die digitale kontrastunterstützte Subtraktionsbildanalyse (DIS, contrast-enhanced digital image subtraction), die Methode des Interpeak Pixel Counts (IPPC), die Methode der kleinsten Quadrate und die Spline-Interpolation verwendet. Eine weitere Methode stellt die Bildanalyse mit Photowiderständen dar, die unabhängig von einem modernen PC durchgeführt werden kann. Bei der digitalen kontrastunterstützten Subtraktionsanalyse wird die Änderung der Zelllänge durch computergesteuerte Subtraktionsalgorithmen erfasst. Dabei werden die während der Stimulation aufgenommenen Bilder von dem Bild im Ruhezustand subtrahiert und der Unterschied zwischen beiden berechnet. Als Markierung dient hierbei die Kutikularplatte, die sich als dunkler Streifen am oberen und als heller Streifen am unteren Ende der Bewegung darstellt. Die Auflösung dieses Verfahrens liegt bei ungefähr 300 nm und ist somit deutlich ungenauer als die Subpixelanalyse. Das Verfahren der Interpeak Pixel Counts arbeitet mit der Zählung ganzer Pixel zwischen verschiedenen, durch die Bewegungen entstehenden Grauwertverschiebungen. Die Auflösung dieser Methode beträgt ca. 120 nm, ist also immer noch um etwa den Faktor 10 ungenauer als die Subpixelanalyse (Zenner et al. 1992; Davis 1997). Kalinec et al. verwendeten im Jahr 2000 die Methode der kleinsten Quadrate. Mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware, wie dem Adobe Photo Shop 4.0 und dem von den U.S. National Institutes of Health entwickelten NIH Image Programm, wählten sie Messrechtecke in ihren Bilddaten aus. Zur Messung der Bewegungen dienten die Schwankungen der Helligkeitsprofile dieser Messrechtecke, die sie mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate und der kubischen Spline-Interpolation berechneten. Die Auflösung dieser Methode liegt zwischen 20 nm und 100 nm (Frolenkov et al. 1997; Kalinec et al. 2000). Die Bildanalyse mit Photowiderständen ähnelt der Photodiodenmethode. Die Photowiderstände werden über den zu analysierenden Videosequenzen angebracht und

detektieren die Zellbewegungen. Photowiderstände haben wie die Photodioden auch eine nichtlineare Charakteristik. Das bedeutet, dass sie vor jeder Messung kalibriert werden müssen. Sie weisen einen eingeschränkten Messbereich auf. Santos-Sacchi et al. gaben die Standardabweichung dieser Methode mit 160 nm an (Santos-Sacchi et al. 1988; Santos-Sacchi 1989). Insgesamt betrachtet ist die für die vorliegende Arbeit verwendete Videomikroskopie in Kombination mit einer Bewegungsanalyse auf Subpixelniveau eine genaue und relativ einfach zu handhabende Methode zur Messung der Motilität der ÄHZ. Mit einer Auflösung von wenigen Nanometern ist sie den anderen beschriebenen optischen Messmethoden überlegen und benötigt keine zeitaufwendigen Kalibrierungen. Außerdem ermöglicht sie in Kombination mit einer stroboskopischen Beleuchtung zusätzlich die Analyse hochfrequenter Bewegungen.

2. Motilität der äußeren Haarzellen bei physiologischen Bedingungen

Die hohe Auflösung der videomikroskopischen Subpixelanalyse ermöglicht eine sehr genaue Untersuchung des Bewegungsverhaltens von ÄHZ in Abhängigkeit vom Membranpotenzial. In der Literatur wird der Bewegungsablauf der ÄHZ oft mit einer Boltzmann-Funktion verglichen. Diese Funktion zeigt einen sigmoidalen Verlauf (Ashmore 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten dieses Bewegungsmuster bestätigen. Übereinstimmend mit den im Jahr 1989 von Santos-Sacchi et al. beschriebenen Versuchsergebnissen wurde auch in dieser Arbeit eine asymmetrische Reaktion der Längenänderung auf symmetrische Spannungsänderungen beobachtet. Die Längenänderungen waren in Richtung der Depolarisation weitaus größer als in Richtung der Hyperpolarisation. Ausgehend von einem Ruhepotenzial von -70 mV bis -90 mV betrug die durchschnittliche Längenänderung bei Depolarisation ca. 15 nm/mV und bei Hyperpolarisation ca. 2 nm/mV (Santos-Sacchi 1989). Canis et al. konnten ebenfalls eine derartige Asymmetrie nachweisen. Die Depolarisation ergab eine durchschnittliche Längenänderung von 13 nm/mV und die Hyperpolarisation eine durchschnittliche Längenänderung von 2 nm/mV (Canis et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen durchschnittlichen Längenänderungen von 12 nm/mV bei Depolarisation von -70 mV bis +30 mV und von 3 nm/mV bei Hyperpolarisation von -70 mV bis -170 mV konnten die Werte, die in den genannten Studien gemessen worden sind, im Prinzip bestätigen. Evans et al. konnten ebenfalls ein asymmetrisches Verhalten der ÄHZ nachweisen. Jedoch war im

Gegensatz zu den Beobachtungen in dieser Arbeit die Verlängerung der Zelle größer als die Verkürzung. Die Ergebnisse sind nicht unbedingt vergleichbar, da Evans et al. das Membranpotenzial nicht gemessen haben. Der Unterschied beruht vermutlich darauf, dass die Längenänderungen der ÄHZ während der Depolarisation gemessen wurden und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, vom Ruhemembranpotenzial ausgegangen wurde (Evans 1988). Ashmore konnte im Jahr 1987 kein asymmetrisches Verhalten bei der Motilität der ÄHZ feststellen. Das Haltepotenzial betrug bei diesen Versuchen -50 mV. Die Zellen wurden in einem Bereich von -90 mV bis +90 mV stimuliert (Ashmore 1987). Dieses Ergebnis beruht vermutlich auf dem verwendeten Haltepotenzial von -50 mV. Dieses Haltepotenzial entspricht, wie auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, V_{pkc} unter physiologischen Bedingungen. Bei V_{pkc} als Haltepotenzial könnte die L-V-Kurve somit als symmetrisch erscheinen. Die in dieser Arbeit festgestellte Spannung V_{pkc} betrug -50 mV, ein Wert, den auch Rajagopalan et al. bei der Messung der NLC von ÄHZ erhielten (Rajagopalan et al. 2007). Bei 12 Zellen, die unter physiologischen Bedingungen untersucht wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit eine maximale Steigung der L-V-Kurve von ca. 27 nm/mV beobachtet werden. Untersuchungen an 7 ÄHZ unter Verwendung von Photodioden, die im Jahr 1987 von Ashmore durchgeführt wurden, ergaben einen etwas niedrigeren Wert von $19,8 \pm 8,3$ nm/mV. Er beobachtete eine maximale Längenänderung apikaler ÄHZ von ca. 2 μm und basaler ÄHZ von ca. 0,5 μm (Ashmore 1987). Die in der vorliegenden Arbeit mit apikalen ÄHZ aus den beiden oberen Windungen der Meer-schweinchencochlea vorgenommenen Messungen ergaben bei einer Spannung von -170 mV eine maximale Elongation von 281 ± 44 nm und bei einer Spannung von +30 mV eine maximale Verkürzung von -1208 ± 96 nm. Insgesamt ergibt sich daraus eine maximale Längenänderung von ca. 1,5 μm . Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die geringe Messgenauigkeit der von Ashmore verwendeten Methode erklärt werden. Durch die Schätzung der Bewegungen mithilfe eines Okular-Gitternetzes konnte Ashmore Bewegungen lediglich auf ca. 0,3 μm genau erkennen. Messungen auf Subpixelniveau weisen hingegen eine Auflösung von wenigen Nanometern auf (Ashmore 1987; Canis et al. 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Elektromotilität können aufgrund der großen Übereinstimmung mit den Ergebnissen von vergleichbaren Studien als valide gelten. Die ÄHZ bei physiologischen Bedingungen dienen bei weiteren Untersuchungen als Kontrollgruppe.

3. Einfluss von Cholesterin auf die Motilität der äußeren Haarzellen

3.1 Allgemeine Betrachtungen

Zahlreiche epidemiologische und klinische Studien scheinen einen Zusammenhang von erhöhten Cholesterinwerten mit Hörstörungen zu bestätigen (Rosen et al. 1962; Cunningham et al. 1974; Gates et al. 1993). Die in einigen Studien bei hohen Cholesterinwerten beobachtete Verminderung der otoakustischen Emissionen (OAE) lassen auf eine schädigende Wirkung auf die ÄHZ schließen (Preyer et al. 2001; Rajagopalan et al. 2007; Syka et al. 2007). Im klinischen Alltag dienen die OAE zur Erfassung der Funktion der ÄHZ (Schmidt 2007). Auch die Senkung von Cholesterinwerten durch Statine oder durch Plasmapherese zeigt einen positiven Effekt auf die OAE (Suckfüll 2002; Syka et al. 2007). Trotz zahlreicher epidemiologischer sowie klinischer Studien sind die Details der pathophysiologischen Wirkungen von Cholesterin auf die ÄHZ weitgehend ungeklärt und Thema kontrovers geführter Diskussionen. Neben den indirekten pathologischen Wirkungen von Cholesterin auf die cochleäre Blutversorgung und somit auch auf die ÄHZ vermutet man auch eine direkte schädigende Wirkung auf die ÄHZ und deren Elektromotilität (Mazurek et al. 2008). Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit bestand in der qualitativen und quantitativen Erforschung dieser direkten Wirkungen. Der direkte Einfluss von Cholesterin auf die Elektromotilität betrifft vermutlich zum einen die Zellmembran und zum anderen das Motorprotein Prestin. Die hoch spezialisierte und cholesterinarme laterale Zellmembran der ÄHZ ist einzigartig unter den Säugetierzellmembranen. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften wie Membransteifigkeit, Viskosität, Elastizität, Fluidität und laterale Diffusionsfähigkeit beeinflusst sie in hohem Maße die Elektromotilität der ÄHZ. Cholesterin wirkt auf diese physikalischen Eigenschaften der Zellmembran modulierend und beeinflusst damit vermutlich auch die Verstärkungsfunktion der ÄHZ. Einige Autoren vermuten sogar, dass Cholesterin eine regulierende Wirkung auf die Elektromotilität aufweist (Nguyen et al. 1998; Organ et al. 2009). Neben der Zellmembran könnte Cholesterin auch das Motorprotein Prestin und damit die Elektromotilität der ÄHZ beeinflussen. Denkbar wären eine direkte Wirkung auf das Prestin oder indirekte Effekte auf die Lipid-Mikrodomänen, in denen das Prestinmolekül in der Zellmembran lokalisiert

ist (Rajagopalan et al. 2007; Sfondouris et al. 2008). Ziel dieser Forschungsarbeit war es, neue Erkenntnisse zur Klärung dieser Problematik beizutragen. In ersten Versuchen wurden die Längenänderungen der ÄHZ bei steigenden Cholesterinkonzentrationen gemessen. Weitere Experimente sollten dann Hinweise liefern, ob der Einfluss von Cholesterin eher das Ergebnis von Auswirkungen auf die passiven Eigenschaften der Zellmembran darstellt oder mehr auf einem Effekt auf die Funktion des Motorproteins Prestin beruht.

3.2 Abhängigkeit der Motilität der äußeren Haarzellen von der Cholesterinkonzentration

Eine Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass eine Zunahme der extrazellulären Cholesterinkonzentration die Motilität der ÄHZ modifizieren könnte. Aus diesem Grund wurden neben der Kontrollgruppe, bestehend aus 12 Zellen, weitere 12 Zellen bei einer Cholesterinkonzentration von 0,1 mmol/l, 10 Zellen bei einer Konzentration von 0,5 mmol/l, 12 Zellen bei einer Konzentration von 1,0 mmol/l und 7 Zellen bei einer Cholesterinkonzentration von 1,5 mmol/l untersucht.

3.2.1 Einfluss von Cholesterin auf die maximale Verkürzung und maximale Verlängerung

Die Vermutung, dass eine steigende extrazelluläre Cholesterinkonzentration die Motilität der ÄHZ beeinflusst, konnte bestätigt werden. Mit zunehmenden Cholesterinkonzentrationen verringerten sich die maximalen Längenänderungen. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt bei der größten gemessenen Bewegung, der maximalen Verkürzung. Bei einer Cholesterinkonzentration von 0,1 mmol/l scheint der Einfluss von Cholesterin noch zu gering zu sein, um eine sichtbare Veränderung herbeizuführen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte eine nicht signifikante Reduktion der maximalen Verkürzung um weniger als 1 % beobachtet werden. Eine Cholesterinkonzentration von 0,5 mmol/l zeigte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe noch nicht signifikante Längenreduktion mit einem Motilitätsrückgang um 12 %. Bei einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l zeigte sich mit einem Wert von -859 ± 91 nm im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante ($p < 0,01$) Verringerung der maximalen Verkürzung um

ca. 29 %. Die Zellgruppe, die mit einer Cholesterinkonzentration von 1,5 mmol/l behandelt wurde, wies mit -769 ± 63 nm bei der maximalen Verkürzung gegenüber der Kontrollgruppe einen weiteren signifikanten ($p < 0,01$) Motilitätsrückgang um ca. 36 % auf. Wird berücksichtigt, dass die Zellen mit einer höheren Cholesterinkonzentration bei einem Ruhepotential von -70 mV schon deutlich verkürzt vorliegen, sind die gemessenen Veränderungen noch aussagekräftiger. Diese Ergebnisse zeigen einen konzentrationsabhängigen Einfluss von Cholesterin auf die Elektromotilität der ÄHZ. Das Bewegungsmuster der ÄHZ ist asymmetrisch, d.h. die maximale Verlängerung ist kleiner als die maximale Verkürzung. Deshalb verwundert es nicht, dass die maximale Verlängerung der ÄHZ unter Cholesterineinfluss zwar ähnliche Ergebnisse lieferte, diese aber nicht so deutlich ausfielen. Bei Cholesterinkonzentrationen von 0,1 mmol/l und 0,5 mmol/l konnten auch bei der maximalen Verlängerung keine signifikanten Bewegungsunterschiede zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Cholesterinkonzentrationen von 1,0 mmol/l bzw. 1,5 mmol/l hingegen ergaben im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der maximalen Verlängerung um 9 % bzw. um 25 %. Auch diese Ergebnisse sprechen für eine konzentrationsabhängige Wirkung von Cholesterin auf die Motilität der ÄHZ.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Längenänderungen der ÄHZ unter Einfluss von Cholesterin videomikroskopisch gemessen. Die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erschweren den Vergleich mit den Ergebnissen von Vorgängerstudien. Sfondouris et al. konnten einen Zusammenhang der Ladungsdichte der Zellmembran von Prestin-transfizierten HEK-Zellen mit der Cholesterinkonzentration beobachten. Diese Untersuchungen zeigten bei steigenden Cholesterinkonzentrationen von 1 mmol/l bis 8 mmol/l einen Abfall der Ladungsdichte (Sfondouris et al. 2008). Unter der Annahme, dass zwischen der Ladungsdichte der Zellmembran und der Motilität der ÄHZ ein Zusammenhang besteht, könnte diese Studie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen. Rajagopalan et al. untersuchten im Jahr 2007 die Elektromotilität der ÄHZ unter dem Einfluss von Cholesterin indirekt über die DPOAE von Meerschweinchen. Sie ließen während der Messungen 30 Minuten lang Lösungen mit den Cholesterinkonzentrationen 10 mmol/l und 200 mmol/l in die Perilymphe diffundieren. Bei einer Cholesterinkonzentration von 10 mmol/l kam es, vergleichbar wie in der vorliegenden Arbeit bei 0,1 mmol/l, zu keiner signifikanten Verringerung der Motilität der ÄHZ. Bei einer Cholesterinkonzentration von 200 mmol/l konnte zu Beginn des Diffusionsvorganges ein geringer

Anstieg der DPOAE von 2 dB bis 3 dB und anschließend ein starker Abfall von über 20 dB beobachtet werden (Rajagopalan et al. 2007). Diese Messungen zeigen damit auch eine Abhängigkeit der Motilität der ÄHZ von der Cholesterinkonzentration. Dass Rajagopalan et al. bei einer Cholesterinkonzentration von 10 mmol/l noch keine signifikanten Veränderungen feststellen konnten, während in der vorliegenden Arbeit bereits eine Konzentration von 1 mmol/l eine signifikante Reduktion der Motilität hervorrief, liegt vermutlich an den unterschiedlichen experimentellen Methoden und Versuchsbedingungen. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode wurde von Rajagopalan et al. die Motilität der ÄHZ durch Messungen der DPOAE in vivo untersucht. Unter Umständen sind ÄHZ in vivo eher in der Lage, eine erhöhte Cholesterinkonzentration zu kompensieren. Außerdem muss bei Rajagopalan et al. ein Verdünnungseffekt durch die Perilymphe berücksichtigt werden. Die in ihren Untersuchungen applizierte Cholesterinmenge war so gering, dass in der Cochlea eher nicht eine Konzentration von 10 mmol/l vorlag. Der Unterschied könnte auch darin begründet sein, dass mit der Messung der DPOAE die Elektromotilität der ÄHZ nur indirekt nachgewiesen wird (Rajagopalan et al. 2007). Die in dieser Arbeit verwendete Videomikroskopie auf Subpixelniveau scheint eine größere Sensitivität aufzuweisen, so dass bereits geringere Motilitätsänderungen detektiert werden können.

3.2.2 Einfluss von Cholesterin auf die maximale Steigung, auf die durchschnittlichen Längenänderungen und auf die Spannung V_{pkc}

Die durchschnittliche Längenänderung in Depolarisationsrichtung von -70 mV bis +30 mV verringerte sich in dieser Arbeit bei allen untersuchten ÄHZ mit einer erhöhten extrazellulären Cholesterinkonzentration. Aufgrund der kleinen Werte im Bereich von 10 nm konnten aber keine signifikanten Zusammenhänge beobachtet werden. Bei der durchschnittlichen Längenänderung in Hyperpolarisationsrichtung von -70 mV bis -170 mV wurden teilweise höhere Werte als bei der Kontrollgruppe gemessen. Dies könnte auf der Verschiebung von V_{pkc} beruhen. Bei allen mit Cholesterin behandelten Zellgruppen zeigte sich eine Verschiebung von V_{pkc} in die hyperpolarisierende Richtung. Diese war bereits bei den geringen Cholesterinkonzentrationen von 0,1 mmol/l und 0,5 mmol/l erkennbar. Die Verschiebung von V_{pkc} auf Spannungen von -50 mV bis -60 mV bzw. auf -60 mV bis -70 mV war bei beiden Konzentrationen jedoch nicht signifikant. Die größte Verschiebung in die hyperpolarisierende Richtung wiesen die Zellen bei einer Cholesterinkonzentration von

1,0 mmol/l mit einer Spannung V_{pkc} von -70 mV auf. Bei den mit 1,5 mmol/l Cholesterin behandelten Zellen nahm die Spannung V_{pkc} wieder auf -60 mV ab. Die bei der Spannung V_{pkc} auftretende maximale Steigung verringerte sich bei allen mit Cholesterin behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Auch in früheren Studien konnte durch Messung der NLC eine Verschiebung von V_{pkc} unter Cholesterineinfluss in die hyperpolarisierende Richtung beobachtet werden. Rajagopalan et al. stellten an ÄHZ bei einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l sogar eine Verschiebung von V_{pkc} von -50 mV auf über -130 mV fest. Eine Depletion von Cholesterin führte dagegen zu einer Verschiebung von V_{pkc} in die depolarisierende Richtung auf +80 mV (Rajagopalan et al. 2007).

Untersuchungen an Prestin-transfizierten HEK-Zellen bestätigen diese Ergebnisse (Rajagopalan et al. 2007; Sturm et al. 2007; Sfondouris et al. 2008). Die wesentlich stärkere Verschiebung von V_{pkc} bei Rajagopalan im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ist vermutlich auf die unterschiedlichen Messverfahren zurückzuführen. Während in der vorliegenden Arbeit die Längenänderungen der ÄHZ gemessen wurden und daraus die Spannung V_{pkc} abgeleitet wurde, detektierten Rajagopalan et al. die NLC. Rajagopalan et al. konnten trotz einer Verschiebung von V_{pkc} in die hyperpolarisierende Richtung bei erhöhter Cholesterinkonzentration keine Abnahme der maximalen NLC feststellen. Dies bedeutet, dass der Betrag an Chloridionen, die über die Membran verschoben werden, bei unterschiedlichen Cholesterinkonzentrationen identisch ist. Da Chloridionen als eine Art Spannungssensor für das Prestin dienen, ist somit auch von einer vergleichbaren Kraftwirkung der Prestinmoleküle auszugehen. Die Reduktion der maximalen Längenänderung und der maximalen Steigung ist also eher auf eine Erhöhung der MembranstEIFigkeit zurückzuführen. Der direkte Einfluss von Cholesterin auf Prestin liegt in einer Verschiebung von V_{pkc} und der maximalen Steigung in Richtung Hyperpolarisation. Rajagopalan et al. diskutieren die Cholesterinkonzentration in der Plasmamembran von ÄHZ als einen Stellmechanismus, über welchen die Elektromotilität reguliert werden könnte. Die Wirkungsweise dieses Mechanismus ist bisher jedoch nicht aufgeklärt und muss deshalb noch genauer untersucht werden. Das Rezeptorpotenzial der ÄHZ bewegt sich normalerweise zwischen -60 mV und -80 mV (Rajagopalan et al. 2007). Da die größte Längenänderung in Abhängigkeit von der Spannungsänderung ohne Zugabe von Cholesterin bei einem Potenzial von -50 mV auftritt, könnte vermutet werden, dass das System bei physiologischen Bedingungen nicht mit maximaler Leistung arbeitet. Durch die

in der vorliegenden Arbeit bei einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l beobachtete Verschiebung in die hyperpolarisierende Richtung befindet sich V_{pkc} im Bereich des Rezeptorpotenzials. Dadurch kommt es trotz Verringerung der Gesamtmotilität bei Spannungen von -170 mV bis +30 mV zu einer Erhöhung der Motilität im aktiven Bereich von -60 mV bis -80 mV. So konnte bei der Versuchsgruppe mit einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l im Bereich der Spannungen von -60 mV bis -80 mV eine durchschnittliche Längenänderung von 19,9 nm/mV gemessen werden, die wesentlich größer war als die bei der Kontrollgruppe mit 6,9 nm/mV. Diese Ergebnisse scheinen auch Studien von Rajagopalan et al. zu bestätigen, die bei langsamer Steigerung der Cholesterinkonzentration in der Perilymphe einen initialen Anstieg der DPOAE feststellten. Erst eine weitere Erhöhung der Cholesterinkonzentration führte dann zu einem Intensitätsverlust der DPOAE (Rajagopalan et al. 2007). Diese Beobachtung könnte eventuell durch eine weitere Verschiebung von V_{pkc} über den Bereich des Rezeptorpotenzials hinaus in die hyperpolarisierende Richtung erklärt werden. Wahrscheinlich spielt hierbei auch die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der maximalen Verkürzung und der maximalen Verlängerung eine Rolle. Wird die Cholesterinkonzentration noch weiter erhöht, kommt es zu einer verstärkten Abnahme der maximalen Verkürzung und der maximalen Verlängerung der ÄHZ. Dies betrifft auch den aktiven Bereich des Rezeptorpotenzials zwischen -60 mV und -80 mV. Somit könnten sich bei einer überhöhten Cholesterinkonzentration die Verschiebung von V_{pkc} und die Verringerung der maximalen Längenänderungen so stark auswirken, dass der somatische Verstärkungsprozess der ÄHZ merklich vermindert ist. Damit scheinen die vorliegenden Ergebnisse den schon seit Jahrzehnten diskutierten Zusammenhang zwischen Hörfunktionsstörungen und erhöhten Cholesterinwerten zu bestätigen.

3.3 Einfluss von Cholesterin auf das Motorprotein Prestin und auf die Zellmembran der äußeren Haarzellen

3.3.1 Einfluss von Chlorid auf die Motilität der äußeren Haarzellen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand darin, Hinweise auf den Wirkungsmechanismus von Cholesterin zu erhalten. Die Motilität der ÄHZ wird von passiven Faktoren wie den

physikalischen Eigenschaften der Zellmembran und von aktiven Faktoren wie dem Motorprotein Prestin bestimmt. Cholesterin beeinflusst die Zellmembran durch Veränderung der MembranstEIFigkeit, der Viskosität, Elastizität, Fluidität und der lateralen Diffusionsfähigkeit (Nguyen et al. 1998; Oghalai et al. 1999; Ohvo-Rekila et al. 2002; Organ et al. 2009). Cholesterin wirkt auch auf das Motorprotein Prestin (Rajagopalan et al. 2007; Sturm et al. 2007; Sfondouris et al. 2008). In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob und wie stark Cholesterin die Zellmembran bzw. das Motorprotein Prestin beeinflusst. Als Grundlage für diese Untersuchungen diente der von Oliver et al. im Jahr 2001 entdeckte Einfluss von Chlorid- und Bicarbonationen auf die Aktivität des Motorproteins Prestin. Diese Anionen scheinen eine Art Spannungssensor für das Prestin zu sein. Wird bei ÄHZ die intrazelluläre Chloridkonzentration verringert, kommt es zu einer Verminderung der Prestinfunktion (Oliver et al. 2001). In dieser Arbeit wurde deshalb bei 12 ÄHZ die intrazelluläre Chloridkonzentration auf 6 mmol/l reduziert. Die entzogenen Chloridionen wurden durch 134 mmol/l des physiologisch irrelevanten Anions Natriumpentansulfonat ersetzt. Die maximale Verlängerung der ÄHZ bei einer Spannung von -170 mV betrug bei einer intrazellulären Chloridkonzentration von 6 mmol/l 135 ± 19 nm. Die maximale Verkürzung bei einer Spannung von +30 mV ergab einen Wert von -584 ± 71 nm. Die Verringerung der maximalen Verkürzung und der maximalen Verlängerung um jeweils 48 % war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,01$). Nahezu das gleiche Ergebnis ergaben Untersuchungen von Oliver et al., die bei einer Chloridkonzentration von 6,3 mmol/l eine Reduktion der Prestinfunktion auf die Hälfte messen konnten (Oliver et al. 2001). Auch die von Canis et al. bei einer intrazellulären Chloridkonzentration von 6 mmol/l gemessene Motilitätsverringering um 45 % bestätigt dieses Ergebnis, so dass auch bei den Untersuchungen in dieser Arbeit bei einer intrazellulären Chloridkonzentration von 6 mmol/l von einer halbmaximalen Prestinfunktion ausgegangen werden kann (Canis et al. 2008). Neben der Verringerung der maximalen Längenänderung kam es in der vorliegenden Studie auch zu einer Reduktion der maximalen Steigung der L-V-Funktion von 27 nm/mV bei der Kontrollgruppe auf 14 nm/mV. Wie bei der maximalen Längenänderung entspricht dieses Ergebnis einer zur Kontrollgruppe signifikanten ($p < 0,01$) Motilitätsverminderung um 48 %. Eine Verschiebung von V_{pkc} konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die durchschnittliche Längenänderung verringerte sich nicht signifikant auf ca. 6 nm/mV bei Depolarisation und auf ca. 1 nm/mV bei Hyperpolarisation. Canis et al. beobachteten im Jahr 2008 bei der gleichen intrazellulären

Chloridkonzentration von 6 mmol/l vergleichbare durchschnittliche Längenänderungen von 7 nm/mV bei Depolarisation und von 2 nm/mV bei Hyperpolarisation (Canis et al. 2008). Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die Ergebnisse früherer Studien und zeigt, dass die Verringerung der Chloridkonzentration eine valide Methode zur gezielten Hemmung der Prestinfunktion darstellt.

3.3.2 Einfluss von Cholesterin bei halbmaximaler Prestinfunktion

Bei 12 ÄHZ wurde die intrazelluläre Chloridkonzentration auf 6 mmol/l reduziert und damit eine halbmaximale Prestinfunktion hervorgerufen. Zusätzlich wurde die extrazelluläre Cholesterinkonzentration auf 1 mmol/l eingestellt. Der Vergleich dieser Zellgruppe mit Messungen bei ÄHZ gleicher Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l, aber einer intrazellulären Chloridkonzentration von 140 mmol/l, ergab bei der maximalen Längenänderung, bei der durchschnittlichen Längenänderung bei Depolarisation und Hyperpolarisation und bei der maximalen Steigung der L-V-Kurve jeweils eine Halbierung der gemessenen Werte.

Bei den 12 ÄHZ mit einer intrazellulären Chloridkonzentration von 6 mmol/l und einer extrazellulären Cholesterinkonzentration von 1 mmol/l kam es im Vergleich zur Zellgruppe, die auch eine verringerte intrazelluläre Chloridkonzentration von 6 mmol/l aufwies, aber nicht mit Cholesterin behandelt wurde, zu einer weiteren signifikanten ($p < 0,01$) Reduktion der maximalen Verkürzung um 18 % auf -479 ± 69 nm. Die maximale Elongation verringerte sich in nicht signifikanter Weise um 5 % auf 128 ± 12 nm. Die maximale Steigung der L-V-Kurve von 12 nm/mV wurde bei einer Spannung V_{pkc} von -70 mV gemessen. Es zeigte sich also die gleiche Verschiebung von V_{pkc} in die hyperpolarisierende Richtung wie bei der Zellgruppe, die nur mit einer Cholesterinkonzentration von 1 mmol/l behandelt wurde. Durch den Vergleich der maximalen Längenänderungen der Zellgruppe bei halbmaximaler Prestinfunktion ohne Cholesterin mit der Zellgruppe bei halbmaximaler Prestinfunktion mit einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l und mit der Zellgruppe bei normaler Prestinfunktion, aber unter Einfluss einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l, kann zwischen der Wirkung von Cholesterin auf das Prestin bzw. auf die Zellmembran unterschieden werden. Unter der Annahme, Cholesterin hätte lediglich einen Effekt auf die Zellmembran und würde die Prestinaktivität nicht beeinflussen, wäre eine Verringerung der maximalen Motilität um den gleichen Prozentsatz wie in der Versuchsgruppe mit normaler Prestinfunktion zu erwarten. Die Verringerung müsste für die

maximale Verkürzung 29 % und für die maximale Verlängerung 9 % betragen. Würde Cholesterin umgekehrt nur die Prestinfunktion beeinflussen, würde man bei halbaktivierten Zellen nur halb so starke Auswirkungen durch Cholesterin erwarten, also etwa 15 % für die maximale Verkürzung und 5 % für die maximale Verlängerung. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Reduktion der maximalen Verkürzung um 18 % bzw. der maximalen Verlängerung um 5 % legen somit nahe, dass Cholesterin sowohl auf das Motorprotein Prestin als auch auf die Zellmembran wirkt. Da die Werte eher in Nähe der für eine reine Prestinwirkung vermuteten Beträge liegen, kann angenommen werden, dass Cholesterin die Prestinfunktion stärker als die passiven Membraneigenschaften der ÄHZ beeinflusst. In Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Untersuchungen von Rajagopalan ist die Reduktion der maximalen Längenänderung und der maximalen Steigung auf eine Erhöhung der MembranstEIFigkeit zurückzuführen. Die direkte Wirkung von Cholesterin auf Prestin liegt hingegen in einer Verschiebung der maximalen Steigung in Richtung Hyperpolarisation, deren Wirkungsmechanismus bisher jedoch noch nicht aufgeklärt ist (Rajagopalan et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit war die Verschiebung von V_{pkc} allein durch die Zugabe von Cholesterin bedingt. Die Reduktion der Chloridkonzentration zeigte weder unter physiologischen Bedingungen noch bei erhöhter extrazellulärer Cholesterinkonzentration einen Einfluss auf V_{pkc} . Dies könnte darauf hinweisen, dass Chlorid und Cholesterin unabhängig voneinander auf das Prestinmolekül einwirken. Daraus lässt sich aber keine zuverlässige Aussage über den Wirkungsmechanismus von Cholesterin machen. So verschieben z.B. Chloroform und die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) V_{pkc} in die hyperpolarisierende Richtung, obwohl Chloroform mit der Plasmamembran interagiert und die PKG an der Phosphorylierung von Prestin beteiligt ist (Santos-Sacchi et al. 2004; Deak et al. 2005).

V. Zusammenfassung und Ausblick

Gerade in der heutigen Kommunikationsgesellschaft führen Hörstörungen häufig zu einem Verlust der Arbeitsfähigkeit und Lebensqualität. Nicht selten enden sie in einer sozialen Isolation der Patienten. Bisher sind kausale Therapiemaßnahmen zur Behandlung einer Innenohrschwerhörigkeit nur in begrenztem Umfang möglich. Die wichtigste Therapieoption besteht darin, den Patienten mit einem Hörgerät zu versorgen. Nach einer Mitteilung der Bundesinnung der Hörgeräteakustiker wird die Zahl der ca. 2,5 Millionen in Deutschland lebenden Hörgeräteträger aufgrund der demographischen Entwicklung weiter zunehmen. Der Prävention und Behandlung von Innenohrerkrankungen kommt somit aus sozioökonomischer, aber auch aus klinischer Sicht eine große Bedeutung zu. Deshalb ist eine intensive Erforschung der Pathophysiologie von Innenohrstörungen notwendig. Pathogenetisch spielen neben Ursachen wie Hypoxie, Lärm und Hypertonie auch metabolische Erkrankungen wie eine Hypercholesterinämie eine auslösende Rolle. Erste Hinweise auf die schädigende Wirkung von Cholesterin auf das Innenohr ergab bereits im Jahr 1962 eine Untersuchung von Samuel Rosen, welcher die Prävalenz der Presbyakusis bei dem sudanesischen Stamm der Mabaan mit einer Kontrollgruppe aus den USA verglich. Das verminderte Auftreten der Altersschwerhörigkeit bei den Mabaan führte er unter anderem auf eine cholesterinarme Ernährung zurück. Zahlreiche epidemiologische, klinische und experimentelle Studien bestätigen diesen Zusammenhang und weisen unter anderem auch auf eine direkte schädigende Wirkung von Cholesterin auf die Funktion der äußeren Haarzellen hin. Die äußeren Haarzellen sind in der Lage, durch Längenänderungen Schallsignale zu verstärken und die Sensitivität des Corti-Organ zu erhöhen. Dieser Vorgang wird aufgrund seiner Abhängigkeit vom Membranpotenzial auch Elektromotilität genannt. Er wird durch Konformationsänderungen des Motorproteins Prestin, welches in der Zellmembran der äußeren Haarzellen lokalisiert ist, ausgelöst. Bei einer Depolarisation kommt es zur Verkürzung, eine Hyperpolarisation führt zur Verlängerung der Zellen. Obwohl zahlreiche Studien vorliegen, ist die genaue Wirkungsweise von Cholesterin auf die äußeren Haarzellen noch weitgehend ungeklärt und Inhalt kontrovers geführter Diskussionen.

Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss von Cholesterin auf die Motilität von äußeren Haarzellen qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Dazu wurden

die Längenänderungen von insgesamt 77 Zellen bei unterschiedlichen extrazellulären und intrazellulären Bedingungen gemessen.

Die äußeren Haarzellen wurden aus der Cochlea von Meerschweinchen frei präpariert und mit der Patch-Clamp-Technik zu Änderungen der Zelllänge stimuliert. Zur Aufzeichnung dieser Bewegungen diente die Videomikroskopie auf Subpixelniveau, die eine Auflösung im Nanometerbereich aufweist. Die Zellen wurden in mehrere Versuchsreihen aufgeteilt. In einer Versuchsreihe wurden die Längenänderungen von 12 äußeren Haarzellen bei physiologischen intra- und extrazellulären Bedingungen gemessen. Diese Zellen dienten als Kontrollgruppe für die weiteren Experimente. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe konnten das Bewegungsmuster der Zellen, das in der Literatur beschrieben worden ist, bestätigen. Es zeigte sich ein asymmetrischer Verlauf der Bewegungen in Depolarisations- und Hyperpolarisationsrichtung mit einer maximalen Längenänderung von ca. 1,5 μm . Um den Einfluss von extrazellulärem Cholesterin auf die Motilität der äußeren Haarzellen zu quantifizieren, wurden die Zellen in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration untersucht. Insgesamt wurden die Längenänderungen von 12 Zellen mit 0,1 mmol/l, von 10 Zellen mit 0,5 mmol/l, von 12 Zellen mit 1 mmol/l und von 7 Zellen mit 1,5 mmol/l Cholesterin gemessen. Das Versuchsergebnis ergab einen konzentrationsabhängigen Einfluss von Cholesterin auf die Elektromotilität von äußeren Haarzellen. Dieser Effekt war ab einer Cholesterinkonzentration von 1,0 mmol/l mit einem Motilitätsrückgang um 29 % bei der maximalen Verkürzung und um 9 % bei der maximalen Verlängerung signifikant. Gleichzeitig zeigte sich eine Verschiebung der Spannung V_{pkc} in die hyperpolarisierende Richtung. V_{pkc} entspricht der Spannung, bei der am effektivsten eine Bewegung der äußeren Haarzellen erzeugt wird. Die Verschiebung von V_{pkc} wurde in früheren Studien als Stellschraube für die Regulation der Elektromotilität gesehen. Mit diesen Ergebnissen konnte die vorliegende Studie nicht nur den seit Jahrzehnten diskutierten schädigenden Einfluss von Cholesterin auf die äußeren Haarzellen nachweisen, sondern auch Hinweise auf eine Regulationsfunktion von Cholesterin bei der Elektromotilität geben. Der Einfluss von Cholesterin auf die Elektromotilität beruht sowohl auf Wirkungen auf die passive Zellmembran, als auch auf das Motorprotein Prestin.

Eine weitere Versuchsreihe sollte Hinweise liefern, ob der Einfluss von Cholesterin eher das Ergebnis von Auswirkungen auf die passiven Eigenschaften der Zellmembran darstellt oder mehr auf einem Effekt auf die Funktion des Motorproteins Prestin beruht. Dazu wurde bei 12 Zellen durch Reduktion der intrazellulären Chloridkonzentration die Prestinfunktion

auf die Hälfte verringert und extrazellulär 1 mmol/l wasserlösliches Cholesterin zugegeben. 12 Zellen mit halbmaximaler Prestinfunktion, bei denen die extrazelluläre Lösung kein Cholesterin enthielt, dienten als Vergleichsgruppe. Bei den mit einer Cholesterinkonzentration von 1 mmol/l behandelten Zellen mit halbmaximaler Prestinfunktion zeigte sich ein Motilitätsrückgang um 18 % bei der maximalen Verkürzung und um 5 % bei der maximalen Verlängerung im Vergleich zu den Zellen mit halbmaximaler Prestinfunktion ohne Cholesterinzugabe. Aus dem Vergleich dieser beiden Zellgruppen mit den Zellen, die nur mit 1,0 mmol/l Cholesterin behandelt wurden, konnte ermittelt werden, dass Cholesterin stärker auf das Motorprotein Prestin als auf die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran wirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die in mehreren Studien diskutierte Vermutung, dass zwischen einer Hypercholesterinämie und Hörschädigungen ein Zusammenhang besteht. Sie ermöglichen ein besseres Verständnis der Wirkung von Cholesterin auf die Hörfunktion. Als präventive Maßnahme könnte neben der Vermeidung von Lärmbelastung auch die rechtzeitige Diagnose und Therapie einer Hypercholesterinämie sein. In Studien wurde ein therapeutischer Effekt einer Senkung des Cholesterinspiegels bei einem Hörsturz nachgewiesen. Diese klinischen Beobachtungen scheinen bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit plausibel zu sein. Durch Senkung des Cholesterinspiegels besteht womöglich eine gute Chance, erstmals eine suffiziente Therapie des Hörsturzes zu entwickeln. Die genauen Mechanismen der Wirkung von Cholesterin auf die Zellmembran bzw. auf das Motorprotein Prestin sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Hinweise auf eine Regulationsfunktion von Cholesterin bei der Motilität von äußeren Haarzellen bieten durchaus neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen auf diesem Forschungsgebiet. Durch das Verständnis grundlegender Pathomechanismen ergeben sich in Zukunft neue Möglichkeiten zur Prävention und Therapie von Erkrankungen des Innenohres wie Altersschwerhörigkeit, Hörsturz und Tinnitus. Angesichts der steigenden Anzahl betroffener Patienten und der überragenden Bedeutung des Gehörsinns für das soziale Zusammenleben sind Erkenntnisse auf diesem Gebiet von großer klinischer Bedeutung.

VI. Abkürzungsverzeichnis

ÄHZ	äußere Haarzelle
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CL	cortical lattice
DIS	digital image subtraction
DPOAE	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GLUT5	Glukosetransporter 5
HDL	high density lipoprotein
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
IHZ	innere Haarzelle
IPPC	interpeak pixel counts
LDL	low density lipoprotein
MET	mechano-electrical transduction
NIH	National Institutes of Health
NLC	nichtlineare Kapazität
OAE	otoakustische Emissionen
PKG	cGMP abhängige Proteinkinase
PM	Plasmamembran
SLC	solute carrier
SSC	subsurface cistern
STAS	sulfate transporter and antisigma factor antagonist
VLDL	very low density lipoprotein

VII. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Anatomie des Innenohres A: Übersicht mit aufgeschnittener Cochlea B: Querschnitt durch die Windungen der Cochlea C: Schematische Darstellung des Corti-Organ mit den äußeren und inneren Haarzellen (verändert nach Hudspeth 2000 und Knirsch 2007).....	4
Abbildung 2: Intracochleäre Ionenverteilung und endocochleäres Potenzial (verändert nach Speckmann et al. 2008)	6
Abbildung 3: Rezeptorpotenzial in Abhängigkeit von der Auslenkung der Stereovilli (verändert nach Speckmann et al. 2008 und Rajagopalan et al. 2007)	7
Abbildung 4: Somatische Motilität (verändert nach Speckmann et al. 2008)	8
Abbildung 5: Ziliare Motilität (verändert nach Fettiplace 2006 und Breneman et al. 2009).....	10
Abbildung 6: Aufbau der lateralen Zellmembran der äußeren Haarzelle (verändert nach Oghalai et al. 1998)	12
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur und Lokalisation von Prestin in der Plasmamembran der äußeren Haarzellen (verändert nach Ashmore 2008).....	14
Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung von Prestin in der Plasmamembran (verändert nach Mio et al. 2008)	14
Abbildung 9: Modellhafte Darstellung von Prestin als inkompletter Ionentransporter (verändert nach Ashmore 2008).....	16
Abbildung 10: Grafische Darstellung der NLC, der Ladungsbewegung und der Längenänderung in Abhängigkeit vom Membranpotenzial (verändert nach Ashmore 2008).....	17

Abbildung 11: Strukturformel von Cholesterin (erstellt mit ACD/ChemSketch)	18
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zellmembran mit Phospholipiden, Cholesterin (rot) und einem Lipid-Raft (verändert nach Harder et al. 1997).....	19
Abbildung 13: Die Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik und ihre Herstellung (verändert nach Numberger 1996)	32
Abbildung 14: A: Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes B: Vergrößerung des Mikroskopiertisches mit Petrischale und Patch-Pipette (verändert nach Scheel 2002)	34
Abbildung 15: Änderung von Widerstand und Stromantwort auf den durch die Patch-Pipette induzierten Testimpuls in Abhängigkeit von der Konfiguration der Patch-Clamp-Apparatur (verändert nach Numberger 1996)	37
Abbildung 16: Isolierte äußere Haarzelle mit Resten von Stützgewebe und Patch-Pipette.....	38
Abbildung 17: Die Motilität der äußeren Haarzellen unter physiologischen Bedingungen (140 mmol/l Chlorid, 0 mmol/l Cholesterin).....	42
Abbildung 18: Motilität der äußeren Haarzellen unter physiologischen Bedingungen und in Abhängigkeit von unterschiedlichen extrazellulären Cholesterinkonzentrationen.....	46
Abbildung 19: Motilität der äußeren Haarzellen A: unter physiologischen Bedingungen B: bei extrazellulärer Cholesterinzugabe C: bei halbmaximaler Prestinfunktion D: bei halbmaximaler Prestinfunktion und extrazellulärer Cholesterinzugabe	49

VIII. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Untersuchungsergebnisse bei verschiedenen extrazellulären Cholesterinkonzentrationen	43
Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse bei verschiedenen intrazellulären Chlorid- und extrazellulären Cholesterinkonzentrationen	47

IX. Literaturverzeichnis

- Arthur, W. (2005). "Hearing Loss in Older Adulthood." Current Directions in Psychological Science **14**(3): 144-148.
- Ashmore, J. F. (1987). "A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier." J Physiol **388**: 323-47.
- Ashmore, J. F. (1990). "Forward and reverse transduction in the mammalian cochlea." Neurosci Res Suppl **12**: S39-50.
- Ashmore, J. F. (1992). "Mammalian hearing and the cellular mechanisms of the cochlear amplifier." Soc Gen Physiol Ser **47**: 395-412.
- Ashmore, J. F. (2008). "Cochlear outer hair cell motility." Physiol Rev **88**(1): 173-210.
- Belyantseva, I. A., Adler, H. J., et al. (2000). "Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells." J Neurosci **20**(24): RC116.
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., et al. (2007). Biochemie. München, Elsevier.
- Breneman, K. D., Brownell, W. E., et al. (2009). "Hair cell bundles: flexoelectric motors of the inner ear." PLoS One **4**(4): e5201.
- Brown, R. E. (1998). "Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal." J Cell Sci **111** (Pt 1): 1-9.
- Brownell, W. E., Bader, C. R., et al. (1985). "Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells." Science **227**(4683): 194-6.
- Canis, M., Ortner, M., et al. (2008). "Subpixel tracking for the analysis of outer hair cell movements." Acta Otolaryngol **128**(3): 228-32.
- Cunningham, D. R., Goetzinger, C. P. (1974). "Extra-high frequency hearing loss and hyperlipidemia." Audiology **13**(6): 470-84.
- Dallos, P. (2008). "Cochlear amplification, outer hair cells and prestin." Curr Opin Neurobiol **18**(4): 370-6.
- Dallos, P., Fakler, B. (2002). "Prestin, a new type of motor protein." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(2): 104-11.
- Dart, A. M., Chin-Dusting, J. P. (1999). "Lipids and the endothelium." Cardiovasc Res **43**(2): 308-22.

-
- Davis, C. Q. F., Dennis M. (1997). "Using a light microscope to measure motions with nanometer accuracy." Optical Engineering **37(04)**: 1299-1304.
- Deak, L., Zheng, J., et al. (2005). "Effects of cyclic nucleotides on the function of prestin." J Physiol **563**(Pt 2): 483-96.
- Epanand, R. M. (2008). "Proteins and cholesterol-rich domains." Biochim Biophys Acta **1778**(7-8): 1576-82.
- Evans, B. (1988). Asymmetries in outer hair cell electro-mechanical responses. Association for Research in Otolaryngology Abstracts of the Eleventh Midwinter Research Meeting, Clearwater Beach, FL.
- Fettiplace, R. (2006). "Active hair bundle movements in auditory hair cells." J Physiol **576**(Pt 1): 29-36.
- Frolenkov, G. I. (2006). "Regulation of electromotility in the cochlear outer hair cell." J Physiol **576**(Pt 1): 43-8.
- Frolenkov, G. I., Kalinec, F., et al. (1997). "Cochlear outer hair cell bending in an external electric field." Biophys J **73**(3): 1665-72.
- Gates, G. A., Cobb, J. L., et al. (1993). "The relation of hearing in the elderly to the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **119**(2): 156-61.
- Gratton, M. A., Wright, C. G. (1992). "Alterations of inner ear morphology in experimental hypercholesterolemia." Hear Res **61**(1-2): 97-105.
- Gröber, I. L. (2007). Lokale Therapie von Gehörschäden durch Freizeitlärm mit einem Glukokortikoid und einem Mineralokortikoid - Experimentelle Studien am Meerschweinchen -. Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Harder, T., Simons, K. (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 534-42.
- Hudspeth, A. J. (2008). "Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear." Neuron **59**(4): 530-45.
- Kalinec, F., Zhang, M., et al. (2000). "Rho GTPases mediate the regulation of cochlear outer hair cell motility by acetylcholine." J Biol Chem **275**(36): 28000-5.
- Kashiwado, I., Hattori, Y., et al. (1994). "[Functional and morphological changes in the cochlea of cholesterol fed guinea pigs]." Nippon Ika Daigaku Zasshi **61**(4): 321-9.
- Klinke, R., Silbernagl, S. (2005). Physiologie. Stuttgart, G. Thieme.

IX. Literaturverzeichnis

- Knipper, M., Zimmermann, U., et al. (1995). "Immunological identification of candidate proteins involved in regulating active shape changes of outer hair cells." Hear Res **86**(1-2): 100-10.
- Knirsch, M. (2007). Ca^{2+} -Kanäle in cochleären Haarsinneszellen von Maus und Ratte: Entwicklungsgang der Ca^{2+} -Ströme und molekulare Zusammensetzung. Fakultät für Biologie. Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Kojima, Y., Ito, S., et al. (2001). "Hearing improvement after therapy for hyperlipidemia in patients with chronic-phase sudden deafness." Ann Otol Rhinol Laryngol **110**(2): 105-8.
- Kong, W. J., Guo, C. K., et al. (2006). "Fast cholinergic efferent inhibition in guinea pig outer hair cells." Brain Res **1102**(1): 103-8.
- Liberman, M. C., Gao, J., et al. (2002). "Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier." Nature **419**(6904): 300-4.
- Mazurek, B., Stover, T., et al. (2008). "Pathogenesis and treatment of presbycusis. Current status and future perspectives." Hno **56**(4): 429-32, 434-5.
- McCormick, J. (1972). "Cochlear Potentials of the Pigeon: Relationships to Age, Serum Cholesterol Level, and Atherosclerosis." J. Acoust. Soc. Am. **52**(143).
- Mio, K., Kubo, Y., et al. (2008). "The motor protein prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities." J Biol Chem **283**(2): 1137-45.
- Mount, D. B., Romero, M. F. (2004). "The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers." Pflugers Arch **447**(5): 710-21.
- Muallem, D., Ashmore, J. F. (2006). "An anion antiporter model of prestin, the outer hair cell motor protein." Biophys J **90**(11): 4035-45.
- Nadol, J. B., Jr. (1988). "Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals." Hear Res **34**(3): 253-66.
- Nakashima, T., Naganawa, S., et al. (2003). "Disorders of cochlear blood flow." Brain Res Brain Res Rev **43**(1): 17-28.
- Nguyen, T. V., Brownell, W. E. (1998). "Contribution of membrane cholesterol to outer hair cell lateral wall stiffness." Otolaryngol Head Neck Surg **119**(1): 14-20.
- Nomura, Y. (1970). "Lipidosis of the basilar membrane." Acta Otolaryngol **69**(5): 352-7.
- Numberger, M. (1996). Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Oghalai, J. S., Tran, T. D., et al. (1999). "Transverse and lateral mobility in outer hair cell lateral wall membranes." Hear Res **135**(1-2): 19-28.

- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., et al. (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." Prog Lipid Res **41**(1): 66-97.
- Oliver, D., He, D. Z., et al. (2001). "Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein." Science **292**(5525): 2340-3.
- Organ, L. E., Raphael, R. M. (2009). "Lipid lateral mobility in cochlear outer hair cells: regional differences and regulation by cholesterol." J Assoc Res Otolaryngol **10**(3): 383-96.
- Pfannenstiel, S., Praetorius, M. (2008). "Protection and regeneration of sensory epithelia of the inner ear." Hno **56**(1): 13-20.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., et al. (2008). Cell biology. Philadelphia, Saunders/Elsevier.
- Preyer, S., Baisch, A., et al. (2001). "Distortion product otoacoustic emissions in human hypercholesterolemia." Hear Res **152**(1-2): 139-51.
- Rajagopalan, L., Greeson, J. N., et al. (2007). "Tuning of the outer hair cell motor by membrane cholesterol." J Biol Chem **282**(50): 36659-70.
- Rosen, S., Bergman, M., et al. (1962). "Presbycusis study of a relatively noise-free population in the Sudan." Ann Otol Rhinol Laryngol **71**: 727-43.
- Rosen, S., Olin, P., et al. (1970). "Diery prevention of hearing loss." Acta Otolaryngol **70**(4): 242-7.
- Ruan, R. S. (2002). "Possible roles of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the mammalian cochlea." Ann N Y Acad Sci **962**: 260-74.
- Saito, T., Sato, K., et al. (1986). "An experimental study of auditory dysfunction associated with hyperlipoproteinemia." Arch Otorhinolaryngol **243**(4): 242-5.
- Santos-Sacchi, J. (1989). "Asymmetry in voltage-dependent movements of isolated outer hair cells from the organ of Corti." J Neurosci **9**(8): 2954-62.
- Santos-Sacchi, J. (1991). "Reversible inhibition of voltage-dependent outer hair cell motility and capacitance." J Neurosci **11**(10): 3096-110.
- Santos-Sacchi, J., Dilger, J. P. (1988). "Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells." Hear Res **35**(2-3): 143-50.
- Santos-Sacchi, J., Wu, M. (2004). "Protein- and lipid-reactive agents alter outer hair cell lateral membrane motor charge movement." J Membr Biol **200**(2): 83-92.
- Satar, B., Ozkaptan, Y., et al. (2001). "Ultrastructural effects of hypercholesterolemia on the cochlea." Otol Neurotol **22**(6): 786-9.

- Scheel, O. (2002). Patch-Clamp-Untersuchungen an Immunzellen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Kiel.
- Schmidt, R. F. (2007). Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Heidelberg, Springer.
- Sfondouris, J., Rajagopalan, L., et al. (2008). "Membrane composition modulates prestin-associated charge movement." J Biol Chem **283**(33): 22473-81.
- Sikora, M. A., Morizono, T., et al. (1986). "Diet-induced hyperlipidemia and auditory dysfunction." Acta Otolaryngol **102**(5-6): 372-81.
- Soccio, R. E., Breslow, J. L. (2004). "Intracellular cholesterol transport." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1150-60.
- Speckmann, E.-J., Hescheler, J., et al. (2008). Physiologie. München, Urban & Fischer.
- Spencer, J. T., Jr. (1973). "Hyperlipoproteinemias in the etiology of inner ear disease." Laryngoscope **83**(5): 639-78.
- Ständer, K. (2005). Statistische Angaben zur Hörschädigung in Deutschland (2005). Online: <http://www.schwerhoerigen-netz.de/MAIN/statistik.asp?inhalt=statistik03>. (Stand: 10.09.2010).
- Strome, M., Topf, P., et al. (1988). "Hyperlipidemia in association with childhood sensorineural hearing loss." Laryngoscope **98**(2): 165-9.
- Sturm, A. K., Rajagopalan, L., et al. (2007). "Functional expression and microdomain localization of prestin in cultured cells." Otolaryngol Head Neck Surg **136**(3): 434-9.
- Suckfüll, M. (2002). "Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial." Lancet **360**(9348): 1811-7.
- Suckfüll, M. (2005). "Up to date: therapy of sudden hearing loss." Laryngorhinootologie **84**(4): 277-82; quiz 283-87.
- Suckfüll, M., Thiery, J., et al. (1999). "Clinical utility of LDL-apheresis in the treatment of sudden hearing loss: a prospective, randomized study." Acta Otolaryngol **119**(7): 763-6.
- Suzuki, K., Kaneko, M., et al. (2000). "Influence of serum lipids on auditory function." Laryngoscope **110**(10 Pt 1): 1736-8.
- Syka, J., Ouda, L., et al. (2007). "Atorvastatin slows down the deterioration of inner ear function with age in mice." Neurosci Lett **411**(2): 112-6.

- Thalmann, I., Kohut, R. I., et al. (1994). "Protein profile of human perilymph: in search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease." Otolaryngol Head Neck Surg **111**(3 Pt 1): 273-80.
- Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." Biochim Biophys Acta **822**(3-4): 267-87.
- Zajic, G., Schacht, J. (1987). "Comparison of isolated outer hair cells from five mammalian species." Hear Res **26**(3): 249-56.
- Zenner, H. P., Reuter, G., et al. (1992). "Electrically evoked motile responses of mammalian type I vestibular hair cells." J Vestib Res **2**(3): 181-91.
- Zhang, M., Kalinec, G. M., et al. (2003). "ROCK-dependent and ROCK-independent control of cochlear outer hair cell electromotility." J Biol Chem **278**(37): 35644-50.
- Zheng, J., Shen, W., et al. (2000). "Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells." Nature **405**(6783): 149-55.

X. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus angefertigt.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. med. Martin Canis für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die Übernahme der Doktorvaterschaft. Ohne die vielen Ideen im Vorfeld und während der Arbeit, ohne die interessanten Diskussionen und die Beantwortung meiner Fragen wäre ein schnelles und erfolgreiches Arbeiten nicht möglich gewesen. Dankbar bin ich auch für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit und die angenehme Atmosphäre, ohne die mir die Arbeit im Labor nicht so viel Freude bereitet hätte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Strupp und Herrn PD Dr. med. Klaus Jahn von der Neurologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern, für die freundliche Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Messungen im Patch-Clamp-Labor.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, Leiter des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für dafür, dass ich am Institut für Chirurgische Forschung die Präparation der Versuchstiere durchführen durfte. Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern im Forschungspavillon der Neurologischen Klinik und Poliklinik sowie am Institut für Chirurgische Forschung für alle Hilfeleistungen, das gute kollegiale Verhältnis und das freundliche Arbeitsklima.

XI. Publikationen

Canis, M., Schmid, J., Olzowy, B., Jahn, K., Strupp, M., Berghaus, A., Suckfüll, M. (2009). „The influence of cholesterol on the motility of cochlear outer hair cells and the motor protein prestin”. Acta Otolaryngol **129**(9): 929-934.

XII. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Johannes Michael Schmid
Geburtsdatum	25.08.1983
Geburtsort	München
Eltern	Inge und Dr. Hans Georg Schmid
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1990 - 1994	Grundschule Sauerlach
1994 - 2003	Gymnasium Oberhaching
2003	Abitur
06/2003	Carl Friedrich von Martius Umweltpreis 2003, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg (Helmholtz Zentrum München)

Hochschulbildung

2003 - 2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
08/2005	Ärztliche Vorprüfung
2005 - 2010	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
04/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2010	Approbation als Arzt
seit 09/2010	Assistenzarzt am Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg