

Antrag auf Forschungsförderung durch die UKE Stiftung:

Mit Knochen Hören:

Beeinträchtigte Integrität der Gehörknöchelchen als Ursache für Schalleitungsschwerhörigkeit

Zusammenfassung: Die Gehörknöchelchen - Hammer, Amboss und Steigbügel - befinden sich im luftgefüllten Mittelohr und dienen der Schallübertragung vom Trommelfell zum ovalen Fenster der flüssigkeitsgefüllten Cochlea. Obwohl bekannt ist, dass strukturelle Schäden in den Gehörknöchelchen die Schallweiterleitung beeinträchtigen, sind die Auswirkungen von Genvarianten auf die Integrität der Gehörknöchelchen und die Hörfunktion nicht bekannt. Bei Patienten mit X-chromosomaler Hypophosphatämie (XLH), die durch eine gestörte Knochenmineralisierung (Rachitis) gekennzeichnet ist, wurde wiederholt ein früh einsetzender Hörverlust berichtet. Ebenfalls ist Hörverlust ein häufiges Merkmal bei Osteogenesis imperfecta (OI), einer genetischen Skeletterkrankung, die durch eine beeinträchtigte Kollagenqualität und erhöhte Frakturinzidenz gekennzeichnet ist. Angesichts dieser Befunde ist es wahrscheinlich, dass der bei Patienten mit genetischen Knochenerkrankungen beobachtete Hörverlust durch eine verminderte Knochenqualität der Gehörknöchelchen vermittelt wird. Mausmodelle sind nützlich, um die Auswirkungen von Genvarianten auf die Knochenqualität zu beurteilen, allerdings haben nur wenige Studien diese Auswirkungen auf die Gehörknöchelchen analysiert. In dem aktuellen Kooperationsprojekt der Orthopädie, Osteologie und Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde untersuchen wir die Gehörknöchelchen von Mauslinien mit den Genvarianten *Phex (Hyp)* und Kollagen Typ I (*Col1a2^{oim/oim}*), welche die genetischen Knochenerkrankungen XLH und OI zu rekapitulieren. Die Analyse umfasst hochauflösende Bildgebungsverfahren wie Mikro-CT, Histologie, quantitative Rasterelektronenmikroskopie (qBEI) und Fourier-Transform-Infrarotspektrometer (FTIR). Unsere Untersuchungen werden sowohl durch systematische Hörtests in Patienten mit XLH und OI als auch durch therapeutische Interventionen in Mäusen ergänzt, einschließlich einer FGF23-Antikörper-Therapie bei *Hyp* Mäusen. Gleichzeitig führen wir bei diesen Mäusen Hörtests durch, um entsprechende funktionelle Beweise für einen auftretenden Hörverlust zu sammeln. Letztendlich wollen wir das Verständnis der Mittelohrschwerhörigkeit bei Patienten mit genetischen Knochenerkrankungen verbessern sowie neue therapeutischen Strategien zu entwickeln.

Stand der Forschung: Schwerhörigkeit stellt ein großes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar, denn mehr als 20 % der Weltbevölkerung sind leicht bis vollständig schwerhörig. Beschädigungen oder Verformungen der Gehörknöchelchen, den kleinsten Knochen im menschlichen Körper, führen zu einer Schalleitungsschwerhörigkeit. Im Gegensatz zu anderen Knochen haben die Gehörknöchelchen nicht die Aufgabe, hohen mechanischen Belastungen standzuhalten, sondern Schwingungen mit Frequenzen von 250 bis 8000 Hz zu übertragen. Eine Besonderheit der Gehörknöchelchen ist, dass ihre endgültige Größe bereits kurz nach der Geburt erreicht wird. Während zahlreiche genetische und erworbene Ursachen für Hörverlust bekannt sind, wurde bei einer Vielzahl von Patienten mit genetischen Knochenerkrankungen, einschließlich solcher mit Störungen des Mineralstoffwechsels oder der Kollagenqualität wie X-chromosomaler Hypophosphatämie (XLH) oder Osteogenesis imperfecta (OI), ein auftretender Hörverlust berichtet. Bei diesen Patienten wurde eine früh einsetzende Schalleitungsschwerhörigkeit beschrieben, was die Frage aufwirft, ob und wie Veränderungen der Gehörknöchelchen zum Hörverlust beitragen. Es gibt bislang nur wenige Studien, die die Auswirkungen der Knochenqualität des Mittelohrs auf die Schallweiterleitung untersucht haben. Im Schläfenbein der Maus, das die Cochlea und die Gehörknöchelchen enthält, findet ein deutlich langsamerer Knochenumbau statt als in den langen Röhrenknochen. Auf molekularer Ebene wird dies teilweise durch die Expression von Osteoprotegerin (OPG) erklärt, einem Köderrezeptor für den Rezeptoraktivator des Nuklearfaktors kappa-B-Liganden (RANKL), der die Osteoklastendifferenzierung negativ reguliert. Während OPG den Knochen vor übermäßiger Resorption schützt, indem es an RANKL bindet und dessen Bindung an RANK verhindert, zeigten Mausmodelle mit defektem OPG (*Opg^{-/-}*) osteoporotische Gehörknöchelchen aufgrund stark aktivierter

Osteoklastenpopulationen. Die Folge waren Knochenresorption und Deformation der Gehörknöchelchen, was mit einem deutlichen Hörverlust assoziiert war. Die Behandlung mit Bisphosphonaten (z. B. Risedronat) hemmte den Knochenverlust in den Gehörknöchelchen von *Opg*^{-/-} Mäusen signifikant und verbesserte den Hörverlust, was den Zusammenhang zwischen erhöhter Knochenresorption und Hörverlust bestätigt.

Vorarbeiten: Wir konnten bereits demonstrieren, dass in menschlichen Gehörknöchelchen, sobald sie kurz nach der Geburt ihre endgültige Größe erreicht haben, vorzeitige apoptotische Prozesse innerhalb der in die Knochenmatrix eingebetteten Osteozyten auftreten ⁽¹⁾. Der Verlust an Osteozyten erfolgt in den Gehörknöchelchen schneller und stärker als in den anderen Knochen des menschlichen Organismus. Neben der Abnahme der Osteozytenparameter lässt sich mithilfe der quantitativen Rasterelektronenmikroskopie (qBEI) ein altersabhängiger signifikanter Anstieg der Knochenmineralisation in den Gehörknöchelchen nachweisen, was zu einer sehr hohen Matrixmineralisierung im Vergleich zu anderen Knochen führt. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Fehlen mechanischer Reize (abgesehen von Vibrationen) zu einer geringeren Knochenumbaugeschwindigkeit mit konsekutivem Verlust an Osteozyten und Hypermineralisation führt. Die hohe Matrixmineralisation unterstützt möglicherweise die Hörfähigkeit, da ein höherer Mineralgehalt zu einem härteren Material führt, das besser geeignet ist, hochfrequente Töne durch das Mittelohr zu übertragen. Diese Besonderheit konnten wir speziesübergreifend in Groß- (Wale) und Kleintieren (Mäuse) nachweisen ⁽²⁾. Die gewonnenen Erkenntnisse über die frühen zellulären Veränderungen in den Gehörknöchelchen legen nahe, dass es wichtig ist, Patienten mit Schallleitungsschwerhörigkeit so früh wie möglich zu behandeln. Mit anderen Worten kann eine kontinuierliche und konstante Schallübertragung nur durch eine erhaltene Knochenarchitektur der Gehörknöchelchen gewährleistet werden.

Die skizzierten Prozesse in den Gehörknöchelchen gesunder Individuen entlang des Alterns bilden eine wichtige Grundlage für das aktuelle Projekt. Während bekannt ist, dass erworbene Erkrankungen des Mittelohrs, wie Otosklerose oder Cholesteatom, zu einem Hörverlust mit Schallleitungskomponente führen, sind die Auswirkungen möglicher ultrastruktureller Veränderungen innerhalb der Gehörknöchelchen auf das Hörvermögen nicht bekannt. Genetische Knochenkrankheiten geben Aufschluss darüber, wie Genvarianten die Knochenqualität beeinflussen. In Mausmodellen können die Auswirkungen auf die Knochenqualität der Gehörknöchelchen detailliert untersucht und funktionelle Folgen in Hinblick auf Hörschäden getestet werden. Daher haben wir uns in letzter Zeit auf die Analyse der Gehörknöchelchen von verschiedenen Mauslinien konzentriert, die genetische Knochenerkrankungen rekapitulieren. In einem ersten Schritt haben wir die Gehörknöchelchen aus den Schädeln von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen Alters entnommen (**Abb. 1A**) und eine unentkalkte histologische Analyse (**Abb. 1B**) sowie eine Rasterelektronenmikroskopie (**Abb. 1C**) durchgeführt. Auf diese Weise konnten wir die rasche Entwicklung dieser Knochen bestätigen, die bei der Geburt fast ihre endgültige Morphologie erreichten, während danach eine kontinuierliche Zunahme der Mineralisierung festgestellt wurde (**Abb. 1D**). Zusammenfassend haben wir die erforderliche Methodik für eine detaillierte Phänotypisierung der Gehörknöchelchen in verschiedenen Mausmodellen für genetische Skeletterkrankungen entwickelt.

Projektziele mit Forschungshypothese(n): Das Hauptziel dieses Projekts ist die Entschlüsselung der Auswirkungen verschiedener Genvarianten auf die Knochenqualität der Gehörknöchelchen in Zusammenhang mit auftretendem Hörverlust. Wir vermuten, dass eine gestörte Mineralisation der Gehörknöchelchen negative Auswirkungen auf das Hörvermögen hat, wobei eine auftretende Schallleitungsschwerhörigkeit durch auf den Knochen ausgerichtete Therapien verbessert werden kann. Zu diesem Zweck werden wir zunächst Patienten mit XLH und OI gezielt auf Hörverlust untersuchen und dabei zwischen Schallleitungs- und Innenohrschwerhörigkeit unterscheiden (**Abb. 1E**). Darüber hinaus werden wir die Gehörknöchelchen von Mauslinien mit genetischen Knochenerkrankungen charakterisieren, von denen bekannt ist, dass sie eine generalisierte Beeinträchtigung der

Knochenmasse und/oder Qualität zeigen. Speziell werden wir Modelle mit gestörter Mineralisation der Knochenmatrix (*Hyp*-Mäuse) und/oder Qualität anderer Skelettelemente wie Kollagen (*Oim*-Mäuse) untersuchen (**Abb. 1F**). Gleichzeitig werden wir bei diesen Mäusen Hörtests durchführen, um die entsprechenden funktionellen Hinweise zu sammeln (**Abb. 1G**). Unsere Studien werden durch therapeutische Ansätze ergänzt, z. B. durch eine FGF23-Antikörper-Therapie bei *Hyp* Mäusen. Auf diese Weise wollen wir das Verständnis der Mittelohrschwerhörigkeit bei Patienten mit genetischen Knochenkrankungen verbessern.

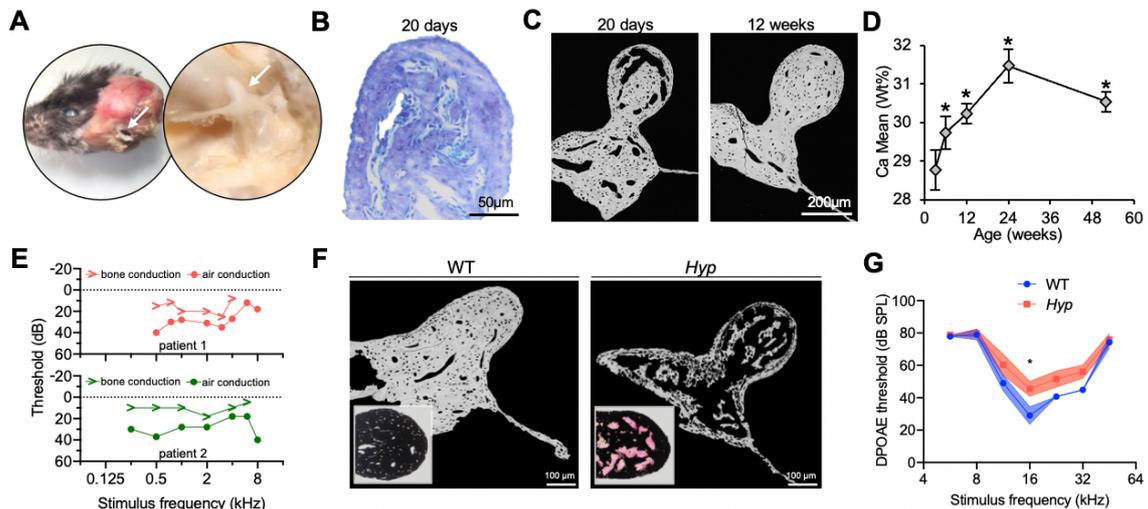


Abbildung 1: Hochauflösende Charakterisierung von murinen Gehörknöchelchen und Untersuchung auf konduktiven Hörverlust. (A) Präparation der Gehörknöchelchen (weißer Pfeil: Hammer) aus dem Mittelohr. (B) Histologische Darstellung (Toluidin blau) des Hammers im Alter von 20 Tagen. (C, D) Postnatale Mineralisation des Hammers in WT Mäusen, CaMean: mittlere Matrixmineralisation. (E) Klinische Audiometrie bei 2 Patienten mit XLH mit Zeichen eines konduktiven Hörverlusts. (F) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Hammers von *Hyp*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. (G) Evaluation des Hörvermögens in *Hyp*-Mäusen (DPOAE).

Arbeitsprogramm ggf. mit Meilensteinen:

Arbeitspaket 1: Untersuchung auf Hörverlust bei Patienten mit genetischen Knochenkrankungen. Als Proof-of-Concept untersuchen wir derzeit die Hörfunktion bei Patienten mit seltenen Skeletterkrankungen, hauptsächlich XLH und OI. Diese Patienten, welche sich in der osteologischen Spezialambulanz im Institut für Osteologie und Biomechanik, dem *National Bone Board* unter Leitung von Prof. Ralf Oheim, vorstellen, werden zunächst cursorisch auf Schwerhörigkeit untersucht. Bei Patienten mit auffälligen Befunden werden im Rahmen der klinischen Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Hörtests (d. h. eine audiometrische Untersuchung) durchgeführt. Wir haben bereits nachgewiesen, dass eine früh einsetzende Schalleitungsschwerhörigkeit sowohl bei XLH- als auch bei OI-Patienten ein relevantes Problem darstellt⁽³⁾ (**Abb. 1E**). Wir sehen vor, die Hörfunktion bei allen XLH- (n=20) und OI-Patienten (n=30) systematisch zu untersuchen, um weitere wichtige klinische Informationen zum Hörverlust zu erhalten.

Arbeitspaket 2: Hochauflösende Analyse der Gehörknöchelchen von *Hyp*-Mäusen und *Oim* (*Col1a2^{oim/oim}*)-Mäusen. Im *Hyp*-Mausmodell der XLH verursachen *Phex*-Mutationen eine FGF23-Induktion und schwere Hypophosphatämie, die bekanntermaßen zu ausgeprägten Mineralisationsdefekten führt. Es war bisher jedoch nicht bekannt, ob Mineralisationsdefekte und Hörverlust auch in den Gehörknöchelchen von *Hyp*-Mäusen detektierbar ist. Wir konzentrieren uns daher auf die mikromorphologischen Eigenschaften der Gehörknöchelchen von *Hyp*-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (≥ 6 pro Gruppe). Analog werden die Gehörknöchelchen von *Col1a2^{oim/oim}* Mäusen, einem etablierten Mausmodell der OI, untersucht. Bei diesen Mäusen wird in verschiedenen Altersklassen ein Mikro-CT (Auflösung 5 μm , Bruker Skyscan 1272 $\mu\text{-CT}$, Belgien) zur besseren Lokalisierung und Erkennung von Mittelohrstrukturen und Gehörknöchelchen durchgeführt. Anschließend werden die Gehörknöchelchen aus den Mittelohren dieser Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen

entnommen. Da die Gehörknöchelchen sehr klein sind, wird die Präparation unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Die histomorphometrische Analyse umfasst die Quantifizierung der Mikroporosität sowie der Mineralisation (z.B. Osteoidvolumen pro Knochenvolumen). Mit Hilfe der quantitativen Rasterelektronenmikroskopie (qBEI, LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., England) werden die Proben im Hinblick auf ihre Knochenmineraldichteverteilung genauer untersucht. Erste Auswertungen konnten bestätigen, dass die Mineralisation der Gehörknöchelchen von *Hyp*-Mäusen deutlich verringert ist (**Abb. 1F**).

Arbeitspaket 3: Implementierung von Hörtests in Mäusen. In diesem Teilprojekt erfolgt in Kooperation mit der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde eine detaillierte Analyse der Hörfähigkeit der verschiedenen Mausmodelle, um herauszufinden, ob die Störung der Integrität der Gehörknöchelchen mit funktionellen Defiziten (d. h. Schallleitungsschwerhörigkeit) einhergeht. Die Etablierung der Sektion Otologie am UKE mit der langjährigen Expertise von Prof. M. Praetorius ermöglicht es uns, die Hörtests in Hamburg zu implementieren. Die Hörfähigkeit wird mittels Hirnstammaudiometrie (BERA, ABR) sowie Messungen der otoakustischen Emission (DPOAE) getestet. In einem ersten Schritt wurden die ersten *Hyp*-Mäuse bereits in Kooperation mit Dr. Konstantina Stankovic (Harvard Medical School) getestet. Während wir zeigen konnten, dass die Hypomineralisierung der Gehörknöchelchen bei *Hyp*-Mäusen mit Schallleitungsschwerhörigkeit einhergeht (**Abb. 1G**), werden dieselben Hörtests derzeit in Hamburg etabliert und auf die anderen Mauslinien, einschließlich der *Col1a2^{oim/oim}* Mäuse, angewendet. Darüber hinaus planen wir, die Wirksamkeit knochenspezifischer Therapien auf das Gehör in den entsprechenden Modellsystemen zu untersuchen (siehe Arbeitspaket 4). Auf diese Weise können die Hörtests letztlich auf eine Vielzahl von Mauslinien angewendet werden, die Skeletterkrankungen rekapitulieren. Ein relativer Vergleich der ABR- und DPOAE-Schwellenverschiebungen sowie der ABR-Amplituden und -Latenzen ermöglicht die Differenzierung zwischen konduktiven und sensorineuralen Komponenten des Hörverlusts.

Arbeitspaket 4: Untersuchung von Behandlungsmöglichkeiten bei *Hyp*-Mäusen und *Vdr*^{-/-} Mäusen.

Um zu prüfen, ob bestimmte Therapien zu einer Verbesserung der Qualität der Gehörknöchelchen und des Hörvermögens führen, werden wir zunächst die Auswirkungen spezifischer Therapien auf die Gehörknöchelchen von *Hyp*-Mäusen analysieren. Dazu werden mehrere Ansätze verfolgt: die Verabreichung einer phosphatreichen Diät, die Verabreichung von aktivem Vitamin D (Calcitriol) und die Behandlung mit dem FGF23-Antikörper Burosumab. Zur vergleichenden Analyse wird das Vitamin-D-Rezeptor-Knockout-Mausmodell (*Vdr*^{-/-}), ein weiteres Mausmodell mit bekanntem Mineralisationsdefekt, untersucht. Dieses von unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell ist geeignet, um Mineralisationsdefekte auf der Basis des Vitamin-D-Rezeptors und des daraus resultierenden Calciummangels zu untersuchen. *Vdr*^{-/-}-Mäuse zeigen eine schwere Hypomineralisierung und Osteomalazie (d. h. eine Anhäufung von nicht mineralisiertem Osteoid). Wichtig ist, dass diese Osteomalazie durch eine kalziumreiche Ernährung normalisiert werden kann. Daher kann die Analyse der Gehörknöchelchen von *Vdr*^{-/-} Mäusen, die sowohl eine normale als auch eine kalziumreiche Ernährung erhalten, neue Erkenntnisse darüber liefern, ob eine mögliche Hypomineralisierung der Gehörknöchelchen durch eine kalziumreiche Ernährung korrigiert werden kann. Da die Mineralisierung der Gehörknöchelchen bereits pränatal sowie in den ersten Tagen nach der Geburt stattfindet, könnten mögliche Unterschiede in den Gehörknöchelchen von *Hyp*- und *Vdr*^{-/-} Mäusen den genauen zeitlichen Rahmen der Mineralisierung aufklären. Die erzielten Ergebnisse sind besonders interessant im Vergleich zu den Ergebnissen von *Hyp*-Mäusen, da diese von den ersten Lebenstagen an niedrige Mineralionenspiegel (d. h. Hypophosphatämie) aufweisen, während *Vdr*^{-/-}-Mäuse erst nach der Entwöhnung eine Hypokalzämie entwickeln. Um die oben genannten Fragen zu beantworten, werden wir bei den behandelten Mäusen die gleichen detaillierten Analysen durchführen, wie in *Arbeitspaket 2 und 3* erläutert.

Arbeitsprogramm	1. Jahr				2. Jahr			
AP1: Untersuchung auf Hörverlust bei Patienten mit genetischen Knochenerkrankungen	■	■	■	■	■	■	■	■
AP2: Hochauflösende Analyse der Gehörknöchelchen von <i>Hyp</i> -Mäusen und Oim (<i>Col1a2^{oim/oim}</i>)-Mäusen	■	■	■	■	■	■	■	■
AP3: Implementierung von Hörtests in Mäusen	■	■	■	■	■	■	■	■
AP4: Untersuchung von Behandlungsmöglichkeiten bei <i>Hyp</i> -Mäusen und <i>Vdr</i> -defizienten (<i>Vdr^{-/-}</i>) Mäusen	■	■	■	■	■	■	■	■

Voraussichtliche Dauer: 24 Monate

Referenzen

1. **Rolvien T**, Schmidt FN, Milovanovic P, Jahn K, Riedel C, Butscheidt S, et al. Early bone tissue aging in human auditory ossicles is accompanied by excessive hypermineralization, osteocyte death and micropetrosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1920.
2. Schmidt FN, Delsmann MM, Mletzko K, Yorgan TA, Hahn M, Siebert U, Busse B, Oheim R, Amling M, **Rolvien T**. Ultra-high matrix mineralization of sperm whale auditory ossicles facilitates high sound pressure and high-frequency underwater hearing. *Proc Biol Sci.* 2018;285(1893):20181820.
3. Delsmann MM, Seist R, Stürznickel J, Schmidt FN, Mansour A, Kobelski MM, Broocks G, Peichl J, Oheim R, Praetorius M, Schinke T, Amling M, Demay MB, Stankovic KM, **Rolvien T**. Conductive Hearing Loss in the *Hyp* Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia Is Accompanied by Hypomineralization of the Auditory Ossicles. *J Bone Miner Res.* 2021;36(12):2317-28.