

Aus der Fachrichtung Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Rolle des Na⁺-aktivierten Kaliumkanals Slack für Hörvermögen,
Hörnervsynapsen und die Vulnerabilität gegenüber Schalltrauma
bei der Maus**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2023

vorgelegt von

PAULINE SCHEPSKY

geboren am 05/07/1987 in Bocholt

Die Dissertation „Rolle des Na⁺-aktivierten Kaliumkanals Slack für Hörvermögen, Hörnervsynapsen und die Vulnerabilität gegenüber Schalltrauma bei der Maus“ wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jutta Engel am Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) angefertigt.

Tag der Promotion:	29.09.2023
Dekan:	Prof. Dr. Michael Menger
1. Hauptgutachter:	Prof. Dr. Jutta Engel
2. Hauptgutachter:	Prof. Dr. Veit Flockerzi

Inhaltsverzeichnis	Seite
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII

1 Einleitung

1.1	Die Cochlea	1
1.2	Verschaltung von Haarzellen und Erregungsweiterleitung	4
1.3	Kalium und <i>tight junctions</i> in der Cochlea	5
1.4	Claudine	7
1.5	Der Na ⁺ -abhängige K ⁺ -Kanal Slack	8
1.6	Neuronale Verarbeitung akustischer Signale und Spiralganglienneurone	9
1.7	Hörmessungen und Hörbahn	11
1.8	Cochleäre Synaptopathie nach Schalltrauma	13
1.9	Zielsetzung der Arbeit	15

2 Material und Methoden

2.1	Verwendete Mauslinien	16
2.1.1	Slack - C57Bl6/N	16
2.1.2	Cldn12 - FVB/N	16
2.2	Genotypisierung	17
2.3	Versuchsgruppen der Hörmessungen	17
2.4	Gewinnung von Präparaten für Experimente	17
2.4.1	Präparation des Innenohrs	17
2.4.2	Corti-Präparate für Immunfluoreszenz-Färbung	18
2.4.2.1	Zamboni-Fixierung	18
2.4.2.2	Besondere Fixiermethoden	19
2.4.3	Herstellen eines Corti-Präparats für LacZ-Färbung	19
2.4.4	Einbetten des Innenohrs für Gefrierschnitte der Cochlea	19
2.5	Etablierung von Gefrierschnitten der Cochlea	20
2.6	Herstellen einer Membranpräparation für den Western-Blot	21
2.7	Proteinbiochemische Methoden zur Validierung von AK-Spezifität	22
2.7.1	SDS-Page	22
2.7.2	Western-Blot	24
2.8	Proteinbiochemie zur Lokalisation bestimmter Proteine im Corti-Präparat	25
2.8.1	Immunfluoreszenz	25
2.8.2	LacZ-Färbung	26
2.9	Nachweis von mRNA in Gefrierschnitten	28
2.10	Elektrophysiologische Methoden	31
2.10.1	DPOAEs	31

2.10.2	Hirnstammaudiometrie und Schalltrauma	32
2.10.3	Versuchsplanung	32
2.11	Ablauf der ABR-Messungen und Schalltrauma	34
2.11.1	Vollantagonisierbare Narkose	34
2.11.2	Scoresheet	35
2.11.3	Vorbereitungen der ABR-Messung	35
2.11.4	Das Mess-Setup	37
2.11.5	Akustische Stimuli für die ABR-Messung	38
2.11.6	Ablauf eines Schalltraumas	39
2.11.7	Besonderheiten bei der Verwendung der Narkose	40
2.12	Mikroskopische Bildaufnahmen	41
2.12.1	Aufnahmen am Olympus BX51	41
2.12.2	Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop	41
2.13	Auswertungsverfahren	42
2.13.1	Cochleäre Synaptopathie	42
2.13.2	Analyse der Hörmessdaten	44
2.13.2.1	Hörschwellen	44
2.13.2.2	Amplituden und Latenzen	46
2.13.2.3	Artefakte	47
2.14	Statistische Auswertung	48

3 Ergebnisse

3.1	Lokalisation des Slack-Kanals in der Cochlea	49
3.1.1	Spezifität der Slack-Antikörper	49
3.1.1.1	Ergebnisse des Westerns-Blots einer Membranpräparation	49
3.1.1.2	Anwendung des Antikörpers anti-Slo2.2 im Corti-Präparat	50
3.1.2	RNAScope® in Gefrierschnitten der Cochlea	52
3.1.2.1	Etablierung der Kontrollen für RNAScope®	52
3.1.2.2	Erhöhung der Qualität des Gewebeerhalts der Gefrierschnitte	54
3.1.2.3	Bewertung der Zelltypen der Gefrierschnitte mit RNAScope®	56
3.1.2.4	Expression von <i>kcnt1</i> -mRNA in den SGN	57
3.2	Hörvermögen von Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen	60
3.2.1	Erste Klick-Hörschwellen adulter Slack ^{-/-} -Mäusen	60
3.2.2	Normale Hörleistung von Kontrollmäusen ohne Schalltrauma	61
3.2.3	Hörschwellen der Versuchstiere vor Vertäubung	62
3.2.4	Auswirkungen eines milden Schalltraumas	64
3.2.4.1	Veränderung der Hörschwellen nach Klick-Stimulus	64
3.2.4.2	Veränderung der frequenzspezifischen Hörschwellen	65
3.2.4.3	Analyse der ABR-Welle I ohne und mit 100 dB SPL Schalltrauma	68
3.2.4.3.1	Amplituden	68
3.2.4.3.2	Latenzen	70

3.2.5	Auswirkungen eines moderaten Schalltraumas	73
3.2.5.1	Veränderung der Hörschwellen nach Klick-Stimulus	73
3.2.5.2	Veränderung der frequenzspezifischen Hörschwellen	74
3.2.5.3	Analyse der ABR-Welle I nach dem 106 dB SPL Schalltrauma	77
3.2.5.3.1	Amplituden	77
3.2.5.3.2	Latenzen	79
3.2.6	Effekte der Traumata auf die Hörschwellen im direkten Vergleich	81
3.3	Analyse der Prä- und Postsynapsen von inneren Haarzellen	85
3.3.1	Etablierung eines Protokolls zur Analyse der Synapsen	85
3.3.2	Analyse der Synapsen anhand von Ribbons und Homer1-Clustern	88
3.3.2.1	Anzahl der Ribbons und der Homer1-Cluster	90
3.3.2.2	Ungepaarte Ribbons und Homer1-Cluster	91
3.3.2.3	Größe einzelner Ribbons und Homer1-Cluster	94
3.4	Lokalisation des Claudin12-Proteins in der Cochlea	95
3.4.1	Charakterisierung der Claudin12-Expression in Corti-Präparaten	95
3.4.1.1	Etablierung der LacZ-Expression	95
3.4.1.2	Nachweis der LacZ-Expression und Immunfluoreszenz	97
3.4.1.3	Immunfluoreszenz-Färbung der Synapsen an inneren Haarzellen	99
3.4.2	Histologische Analyse von äußeren Haarzellen	102
3.4.3	Hörmessdaten von Cldn12 ^{+/+} -Mäusen und Cldn12 ^{-/-} -Mäusen	105
3.4.3.1	Ergebnisse der ABR-Wellen nach einem Klick-Stimulus	106
3.4.3.2	Frequenzabhängige ABR-Hörschwellen	107
4	Diskussion	
4.1	Claudin12 in der Cochlea	109
4.2	Lokalisation von Slack-Protein in der Cochlea weiterhin unbekannt	110
4.3	Methodische Vergleichbarkeit von Hörmessungen und Vertäubungen	112
4.3.1	Audiometrieanlagen	112
4.3.2	Vertäubungsstudien im Vergleich	114
4.4	Das Hörvermögen der WT-Mäuse und die Synaptopathie-Studie von Kujawa und Liberman	115
4.5	Das Hörvermögen von Slack ^{-/-} -Mäusen	117
4.5.1	Spezifische Neurodegeneration von SGN Typ I-Fasern bei Slack ^{-/-} -Mäusen	117
4.5.2	Warum haben Slack ^{-/-} -Mäuse nach einem 106 dB SPL Trauma bessere HS als WT-Mäuse?	119
4.6	Regenerationsfähigkeit von Ribbon-Synapsen	120
4.7	Vulnerabilität des peripheren auditorischen Systems hängt vom genetischen Hintergrund der Mauslinie ab	120
4.8	Übertragbarkeit auf den Menschen	121
	Literaturverzeichnis	XV
	Danksagung	XXX

Abbildungsverzeichnis		Seite
1	Querschnitt durch den <i>Ductus cochlearis</i>	2
2	Anatomie der reifen <i>Scala media</i>	3
3	Übersicht und Details eines Corti-Präparats der Maus	5
4	Kaliumkreislauf und <i>tight junctions</i>	6
5	Vereinfachtes Schema der aufsteigenden neuronalen auditorischen Signalverarbeitung	12
6	Cochleäre Synaptopathie nach Schalltrauma	14
7	Schema zur Anfertigung von Gefrierschnitten der Cochlea	20
8	Arbeitsschritte der RNAScope®-Methode in Gefrierschnitten der Cochlea	29
9	Schematische Darstellung der Messreihenfolge von ABR-Messungen mit Schalltrauma	33
10	Übersicht der Anzeigen auf dem Oszilloskop während einer Ableitung	36
11	Versuchssituation zur ABR-Messung einer Maus	37
12	Zwei narkotisierte Mäuse vor dem Schalltrauma	39
13	Schematische Abbildung einer Synapse der inneren Haarzelle und afferenten Boutons eines Spiralganglion-Neurons	43
14	Schematische Frequenzkarte der Maus mit tonotoper Organisation der Cochlea	44
15	Rohdaten der Messung einer Klick-ABR und ein f-ABR-Audiogramm	45
16	Darstellung der Rohdaten zur Analyse der Amplituden und Latenzen	47
17	Spezifität des monoklonalen Antikörpers anti-Slo2.2 im Western-Blot	50
18	Fehlende Spezifität des Antikörpers anti-Slo2.2 in der immunhistologischen Färbung von Corti-Präparaten	51
19	Etablierung der Positivkontrollen der RNAScope®-Methode für Gefrierschnitte der Cochlea	53
20	Negativkontrollen der RNAScope®-Methode an Gefrierschnitten der Cochlea	54
21	Cochlea-Gefrierschnitt mit gutem Gewebeerhalt einer erfolgreichen Positivkontrolle	55
22	Unterscheidung der Neuronentypen in Spiralganglien durch Expressionsnachweis der mRNA von <i>th</i> , <i>calb2</i> und <i>kcnt1</i> mit der RNAScope®-Methode	57
23	Nachweis von Slack-mRNA in SGN von Slack ^{+/+} - Mäusen mit der RNAScope®-Methode	58
24	Jung-adulte Slack ^{-/-} -Mäuse besitzen eine normale Hörschwelle	60
25	Kontrolltiere ohne Trauma zeigen eine leichte Schwellenerhöhung im hochfrequenten Bereich nach vier Wochen	61
26	Initiale Audiogramme aller Versuchsgruppen im Vergleich	63
27	Keine dauerhafte Erhöhung der Klick-Hörschwellen nach einem 100 dB SPL Trauma, jedoch Reduktion der gemittelten Amplituden der ABR-Wellen	65
28	Kurzfristige und dauerhafte frequenzabhängige Hörschwellenveränderungen bei Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen nach einem Schalltrauma von 100 dB SPL	66

29	Hörschwellenverschiebung direkt und vier Wochen nach einem 100 dB SPL Trauma	67
30	Regenerationsvermögen der f-ABR-Hörschwellen vier Wochen nach einem Schalltrauma von 100 dB SPL	68
31	Wachstumsfunktionen der Amplituden der ABR-Welle I für ausgewählte Frequenzen bei Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen ohne bzw. mit einem Schalltrauma von 100 dB SPL	69
32	Einfluss eines Schalltraumas von 100 dB SPL auf die pegelabhängigen Latenzen der ABR-Welle I bei Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen für die Frequenzen 11,3 kHz, 16 kHz, 22,6 kHz und 32 kHz	71
33	Kaum Erhöhung der Klick-HS nach einem 106 dB SPL Trauma, jedoch Reduktion der gemittelten Amplituden und Erhöhung der Latenzen der ABR-Wellen	73
34	Temporäre und permanente frequenzabhängige Hörschwellenerhöhungen von Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen nach einem Schalltrauma von 106 dB SPL	75
35	Hörschwellenverschiebung direkt und vier Wochen nach einem 106 dB SPL Trauma	76
36	Regenerationsvermögen der f-ABR-Hörschwellen vier Wochen nach einem Schalltrauma von 106 dB SPL	77
37	Wachstumsfunktionen der Amplituden der ABR-Welle I für ausgewählte Frequenzen bei Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen mit einem Schalltrauma von 100 bzw. 106 dB SPL	78
38	Einfluss eines Schalltraumas von 106 dB SPL auf die pegelabhängigen Latenzen der ABR-Welle I bei Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen für die Frequenzen 11,3 kHz, 16 kHz, 22,6 kHz und 32 kHz	80
39	Initiale Audiogramme aller Versuchsgruppen im Vergleich	81
40	Audiogramme von Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen direkt nach der Vertäubung mit 100 oder 106 dB SPL	82
41	Audiogramme von Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen vier Wochen nach einem Trauma von 100 oder 106 dB SPL	83
42	Immunfluoreszenzaufnahmen von Prä- und Postsynapsen im Corti-Präparat	86
43	Immunhistochemische Färbung von Prä- und Postsynapsen im midbasalen Bereich des Corti-Präparats von Slack ^{+/+} - und Slack ^{-/-} -Mäusen	87
44	Anzahl der Ribbons und Homer1-Cluster pro innere Haarzelle in Abhängigkeit von der cochleären Position und vom applizierten Trauma	90
45	Anzahl der ungepaarten Ribbons und ungepaarten Homer1-Cluster in Abhängigkeit von der cochleären Position und vom applizierten Trauma	92
46	Fläche der Ribbons und Homer1-Cluster in Abhängigkeit von der cochleären Position und vom applizierten Trauma	94
47	Spezifische LacZ-Färbung im Corti-Präparat drei Wochen alter Cldn12 ^{+/-} -Mäuse	96
48	Spezifische LacZ-Färbung in inneren Haarzellen und Pillarzellen drei Wochen alter Cldn12 ^{-/-} -Mäuse	98
49	Immunhistologische Dreifachfärbung der Prä- und Postsynapsen einer drei Wochen alten Cldn12 ^{+/+} -Maus	100
50	Immunhistologische Dreifachfärbung der Prä- und Postsynapsen einer drei Wochen alten Cldn12 ^{-/-} -Maus	101
51	Intaktes Epithelgewebe trotz einzelner fehlender äußerer Haarzellen bei Cldn12 ^{-/-} -Mäusen	102

52	Degeneration äußerer Haarzellen in apikalen und basalen Windungen des Corti-Präparats von Cldn12 ^{+/+} - und Cldn12 ^{-/-} -Mäusen	104
53	Analyse der Degeneration äußerer Haarzellen bei Cldn12 ^{+/+} - und Cldn12 ^{-/-} -Mäusen	105
54	Gemittelte Klick-ABR Wellenformen zeigen vergleichbare Amplituden und Latenzen für Welle I bei beiden Genotypen	106
55	Vergleich der gemittelten frequenzspezifischen ABR-Hörschwellen	107

Tabellenverzeichnis		Seite
1:	Zusammensetzung der physiologischen Präparationslösung (Laborintern B49)	18
2:	Verwendete Puffer und Gele für Western-Blot und SDS-Page	23
3:	Antikörper im Western-Blot	24
4:	Verwendete Puffer für immunhistochemische Färbungen für Corti-Präparate	25
5:	Verwendete Materialien für Immunfloreszenz-Markierungen	26
6:	Materialliste für X-Gal-Färbung für Corti-Präparate	27
7:	Übersicht über die Versuchstiere in den verschiedenen Versuchsgruppen	32

Abkürzungsverzeichnis

µg: Mikrogramm	dB: Dezibel
µl: Mikroliter	DL: Durchlicht
µm: Mikrometer	DPOAE: Distorsionsprodukte Otoakustischer Emissionen
µV: Mikrovolt	EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
Abb.: Abbildung	EP: endochochleäres Potential
ABR: eng. <i>Auditory brainstem respons</i>	et al.: und andere
ÄHZ: äußere Haarzellen	f-ABR: Frequenzspezifische ABR
AK: Antikörper	FISH: Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
AP: Aktionspotential	FVB/N: Mauslinie
APS: Ammoniumpersulfat	gp: Meerschweinchen (eng. <i>guiney pig</i>)
B49: Physiologische Lösung 49	H ₂ O.: Wasser
BP: Blockierungspuffer	H ₂ O _d : Deionisiertes Wasser
BSA: Bovines Serum Albumin	HCl: Salzsäure
C: Kanal (eng. <i>channel</i>)	HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure
°C: Grad Celsius	HET: Heterozygot
C57Bl/6N: Mauslinie	HS: Hörschwelle
C57Bl/6J: Mauslinie	HZ: Haarzellen
Ca ²⁺ : Kalzium-Ion	ID: Identifikationsnummer
CaCl ₂ : Kalziumchlorid	IF: Immunfluoreszenz-Färbung
<i>Cal/ calb1</i> : Calbindin-28k	IHZ: innere Haarzellen
<i>Calb2</i> : Calbindin2	K ⁺ : Kalium-Ion
CBA/CaJ: Mauslinie	KCl: Kaliumchlorid
<i>Cldn</i> : Claudin	<i>kcnt1</i> : Genname Na-Aktivierter K ⁺ -Kanal Slack
cm: Zentimeter	kHz: Kilohertz
CP: Corti-Präparat	KO: Knockout
CtBP2: C-Terminal bindendes Protein2	LSM: Laser Scanning Mikroskop
Ctrl: Kontrolle	M: Molar
<i>dapb</i> : Dihydrodipicolinate Reduktase	
DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol	

mA: Milliampere	<i>polr2a</i> : RNA Polymerase II A
max.: maximal	<i>ppib</i> : Peptidylprolyl-Isomerase B
mg: Milligramm	<i>probes</i> : Target-Hybridisierungsmoleküle
MgCl ₂ : Magnesiumchlorid	PTS: <i>permanent threshold shift</i>
min: Minute	PZ: Pillarzellen
MIP: Maximale-Intensitäts-Projektion	rb: Kanninchen (eng. <i>rabbit</i>)
mk: monoklonal	rcf: eng. <i>relative centrifugal force</i>
ml: Milliliter	RP: Reaktionspuffer
mm: Millimeter	rpm: eng. <i>revolutions per minute</i>
mM: Millimolar	RT: Raumtemperatur
mOsm: Milliosmol	S: Stereozilien
mRNA: messenger RNA	SAB: Sekundärer Antikörper (eng. <i>secondary antibody</i>)
ms: Maus	SDS: Natrium Dodecyl Sulfat
N: Anzahl	SDS-Page: - SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Na ⁺ : Natrium-Ion	s: Sekunde
NaCl: Natriumchlorid	SGN: Spiralganglionneurone
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O: Natriumdihydrogenphosphat	Slack: <i>Sequence-like-a-calcium-activated-K⁺-channel</i>
NIHL: <i>noise induced hearing loss</i>	Slo2.2: Proteinname Na ⁺ -Aktivierter K ⁺ -Kanal
OoC: Organ of Corti	SPL: Schalldruckpegel (eng. <i>sound pressure level</i>)
OT: Objektträger	<i>th</i> : Tyrosinhydroxylase
P: postnatal	TTS: <i>temporary threshold shift</i>
PAB: primärer Antikörper (eng. <i>primary antibody</i>)	<i>ubc</i> : Ubiquitin
PBS: Phosphat-gepufferte SaKochsalzlösung	V: Volt
PCR: Polymerase-Kettenreaktion (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)	WP: Waschpuffer
PFA: Paraformaldehyd	WT: Wildtyp
pH: potential of hydrogen	X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
PI: Protease-Inhibitor	
pk: polyklonal	

Zusammenfassung

Der Slack-Kanal, ein Natrium- und spannungsaktivierter Kaliumkanal, führt neben anderen Kaliumkanälen zur Repolarisation eines Neurons in Folge neuronaler Erregung. Gerade bei starker Erregung ist diese Art der Regulation wichtig, um Erregungstoxizität in den Zellen zu vermeiden. Fehlfunktionen des Slack-Proteins steht mit einer Reihe von Epilepsien in Verbindung. Obwohl in Spiralganglienneuronen (SGN) der Cochlea nachgewiesen, ist die Lokalisation und physiologische Rolle des Kanals für die Hörfunktion unbekannt. Beim Hören sind schnell feuernde und hochpräzise regulierte Neuronen von Bedeutung, weshalb eine Deletion von Slack in der Maus auditorische Konsequenzen haben könnte. Die Fragestellung dieser Arbeit war daher die Rolle des Na⁺-aktivierten Kaliumkanals Slack für Hörvermögen, Synapsen zwischen inneren Haarzellen (IHZ) und SGN und die Vulnerabilität gegenüber Schalltrauma bei der Maus.

Mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie sollte die zelluläre Expression des Kaliumkanals auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht werden. Das Hörvermögen wurde durch auditorische Hirnstamm (ABR) -Messungen auf Klick- und frequenzspezifische Reize untersucht, die Hörschwellen sowie Amplituden und Latenzen der ABR-Welle I lieferten, welche die Aktivität des *Nervus cochlearis* widerspiegeln. Das Phänomen der cochleären Synaptopathie wurde durch Analyse von CtBP2-markierten Prä- und Homer1-markierten Postsynapsen untersucht.

Da die Proteinlokalisierung von Slack im Corti-Organ mit Hilfe von Antikörpern nicht erfolgreich war, wurde die Methode des RNAScope®-Nachweises in Gefrierschnitten der Cochlea etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch noch keine abschließende Lokalisation von Slack in den Spiralganglien der Cochlea erzielt werden.

Slack-defiziente Mäuse unterschieden sich in Bezug auf die Hörschwellen im Alter von 8 Wochen nicht von ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Zwei unterschiedlich starke Schalltraumata (100 bzw. 106 dB SPL, 8-16 kHz, 2 h) bewirkten bei beiden Genotypen sehr ähnliche direkte Erhöhungen der frequenzspezifischen Hörschwellen, die mit der Trauma-Stärke zunahmen. Vier Wochen nach dem 106 dB SPL Schalltrauma zeigten Slack-defiziente Tiere paradoxerweise eine bessere Regeneration der Schwellen als die Wildtyp-Tiere. Verminderte Amplituden der ABR-Welle I und erhöhte Latenzen von 11,3 - 32 kHz bei beiden Genotypen zeigen die Beeinträchtigung funktionaler synaptischer Verbindungen nach Trauma. Eine Zuordnung betroffener Präsynapsen-SGN-Subtyp-Verbindungen anhand von Veränderungen der Amplituden und Latenzen der ABR-Welle I erschien jedoch nicht möglich. In Bezug auf die hörphysiologischen Parameter bestätigte sich die vermutete erhöhte Vulnerabilität der Slack-defizienten Tiere gegenüber Schalltrauma nicht.

12 Wochen alte Slack-defiziente Tiere ohne Traumaexposition wiesen gegenüber Wildtyp-Tieren einen spezifischen Phänotyp mit einer um 2-3 reduzierten Anzahl von Postsynapsen pro IHZ im apikalen, medialen und midbasalen Cochleabereich auf. Vier Wochen nach Trauma

wurde im mittel- bis hochfrequenten Bereich eine deutliche Reduktion der Anzahl der Präsynapsen/IHZ festgestellt, die bei beiden Genotypen verglichen mit den Postsynapsen die vulnerableren Strukturen waren. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten Slack-defiziente Tiere nur im hochfrequenten Bereich mit einem Verlust der Ribbons auf 41 % und der Postsynapsen auf 60 % eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber dem 106 dB SPL Trauma.

Claudine sind für die Dichtigkeit von Epithelien essenzielle *tight junction*-Proteine, die an der Kompartimentierung von Endo- und Perilymphe in der Cochlea beteiligt sind. Im Rahmen eines Forschungsaufenthalts des Graduiertenkollegs IRTG1830 bei Prof. Dr. Todd Alexander an der Universität von Alberta in Edmonton wurde eine Claudin12-defiziente Maus mit LacZ-Reportersystem untersucht. Nach Etablierung eines Protokolls für die Expression von β -Galactosidase in der Cochlea wurde eine Claudin12-Reporter-Expression von LacZ in den IHZ nachgewiesen. Nach Import des Mausmodells nach Homburg wurden histologische Untersuchungen und Hörmessungen an Claudin12-defizienten Mäusen im FVB/N-Hintergrund durchgeführt.

Corti-Präparate von Claudin12-defizienten Mäusen wiesen Lücken in den Reihen der äußeren Haarzellen auf. Diese existierten auch in FVB/N-Wildtyp-Tieren, jedoch waren Claudin12-defiziente Mäuse von der Degeneration in jüngeren Altersstufen stärker betroffen als Wildtypen. Der Phänotyp entwickelte sich stärker in der apikalen als in der basalen Hälfte der Cochlea.

Genetische Deletion von Claudin12 bewirkte keinen auditorischen Phänotyp, da Claudin12-defiziente Mäuse ähnliche frequenzabhängige Hörschwellen wie die FVB/N-Wildtypen im Alter von 8 Wochen aufwiesen. Die Untersuchung älterer Tiere oder eine Exposition gegenüber einem Schalltrauma könnte künftig zur Aufklärung der Funktion von Claudin12 in der Cochlea beitragen.

Summary

The Slack channel, a sodium- and voltage-activated potassium channel is besides other potassium channels responsible for neuronal repolarization. To avoid excitotoxicity, this type of regulation is particularly important after strong excitation. Malfunction of Slack protein is associated with different forms of epilepsy. Even though Slack mRNA is expressed in spiral ganglion neurons (SGN) of the cochlea its localization and physiological impact on hearing is unknown so far. Because fast and precisely spiking neurons are essential in hearing deletion of Slack could result in severe consequences in auditory processing. The aim of this thesis was to determine the role of the sodium-activated potassium channel Slack for hearing function, synapses between inner hair cells (IHC) and SGN, and the vulnerability to acoustic trauma in mice.

The cellular expression of Slack was studied using high resolution fluorescence microscopy on protein and mRNA level. Hearing was examined by auditory brainstem response (ABR) measurements in response to click- and frequency specific stimuli. They yielded amplitudes and latencies of ABR wave I reflecting the activity of the cochlear nerve. The phenomenon of cochlear synaptopathy was studied by analyzing by pre- and postsynapses labeled with CtBP2 and Homer1, respectively.

Since protein localization by anti-Slack antibodies was not successful in whole mount organ of Corti preparations, the method of RNAScope® was established in cryosections of the cochlea. However, a final localization of Slack mRNA in spiral ganglion neuron subtypes of the cochlea was not achieved within this thesis.

Slack-deficient mice aged 8 weeks showed similar hearing thresholds as their littermates. Two acoustic traumata of different strength (100 resp. 106 dB SPL, 8-16 kHz, 2 h) lead to similar frequency-specific threshold elevations in both genotypes, which increased with trauma strength. Four weeks after the 106 dB SPL trauma, Slack-deficient mice paradoxically showed better regeneration of thresholds compared to wildtypes. Reduced amplitudes and increased latencies of ABR-wave I between 11,3 - 32 kHz in both genotypes indicated a loss of functional synapses after trauma. A classification of affected SGN subtype connections based on changes in amplitudes and latencies of ABR-wave I was however not feasible. Regarding the hearing parameters, the assumption of an increased vulnerability of Slack-deficient mice to acoustic trauma was not confirmed.

In comparison with wildtype animals, Slack-deficient animals aged 12 weeks without noise trauma showed a specific reduction of 2-3 postsynapses per IHC in the apical, medial and mid-basal turn of the cochlea. Both traumata resulted in a severe reduction of the presynapses per IHC in the middle to high frequency region in both genotypes. These synaptic ribbons were more vulnerable compared with postsynapses in both genotypes. In response to the 106 dB SPL trauma, Slack-deficient mice showed a higher loss of ribbons (to 41% of wildtype) and postsynaptic clusters (to 60% of wildtype) exclusively in the high-frequency region.

Claudins are tight junction proteins and essential in forming epithelial barriers, which are involved in the compartmentalization of endolymph and perilymph of the cochlea. During a research stay organized by the International Research and Training Group IRTG1830 at the University of Alberta, Edmonton, claudin12-deficient mice with a lacZ reporter system were analyzed in the laboratory of Prof. Dr. Todd Alexander. After establishing a protocol for expression of β -galactosidase in the cochlea, Claudin12-reporter expression of lacZ in the inner hair cells was identified. Histological studies and hearing measurements of Claudin12-deficient mice on FVB/N background were performed back in Homburg.

Organ of Corti preparations of Claudin12-deficient mice showed missing outer hair cells. Although outer hair cell gaps also were found in the FVB/N wildtype, the younger Claudin12-deficient mice were affected more severely by this degeneration. Further, this phenotype progressed from the apical to the basal region.

Genetic deletion of Claudin12 did not cause an auditory phenotype, as Claudin12-deficient and FVB/N wildtype mice showed similar frequency-specific hearing thresholds. Future experiments using older animals or exposing them to a noise trauma may unravel the function of claudin12 in the cochlea.

1 Einleitung

Inner- und zwischenartliche Kommunikation zwischen einem Sender und Empfänger können als Basis eines funktionierenden Sozialgefüges über optische, chemische, mechanische oder akustische Reize erfolgen. Je nach Spezies liegen diese Reize unterschiedlich, wobei die dominanteste innerartliche Kommunikationsform des Menschen die (Laut-)Sprache ist. Die durch Kehlkopf, Zunge und Vokaltrakt erzeugten mechanischen Signale bestehen aus Veränderungen des Schalldrucks, die vom Außenohr gesammelt und über das Mittelohr ins Innenohr geleitet werden. In der Cochlea, dem akustisch relevanten Anteil des Innenohrs, werden sie über ein chemisches Signal zu einem elektrischen Signal umgewandelt und im Gehirn weiterverarbeitet, bis sie zu einer Wahrnehmung führen. Eine Dysfunktion dieser Kaskade hat weitreichende pathologische und soziale Konsequenzen. Beispielweise kann Gehörlosigkeit viele Ursachen und Ausprägungen annehmen; in Deutschland sind etwa 16 Millionen Menschen von Schwerhörigkeit betroffen (*Gehörlosigkeit - FAQ - DGB e. V.*, 2022). Die grundlegende Erforschung derartiger Dysfunktionen stellt somit einen wichtigen Beitrag zur Gesundheit eines Individuums, aber auch eines Sozialgefüges dar.

1.1 Die Cochlea

Aufgrund der vielfältigen anatomischen, physiologischen und pathologischen Parallelen zwischen dem menschlichen und dem murinen Ohr wird die Physiologie des Hörens vielfach an Mausmodellen untersucht.

Beim Hören wird der Schall als Schwankungen des Luftdrucks vom Außenohr gesammelt und über das Mittelohr ins Innenohr weitergeleitet. Während die Pinna mit Gehörgang ein Sammelorgan mit Schutzfunktion darstellt, dient das Mittelohr mit den Gehörknöchelchen als erste Verarbeitungsstelle des Schalldrucks. Das Flächenverhältnis zwischen Trommelfell und ovalem Fenster der Cochlea und die Hebelwirkung der Gehörknöchelchenkette des Mittelohrs führen zu einer 22-fachen Verstärkung des Druckreizes, der in die Cochlea übertragen wird. Notwendig wird diese Impedanzanpassung, weil der mechanische Widerstand des flüssigkeitsgefüllten Innenohrs überwunden werden muss (Geisler, 1998).

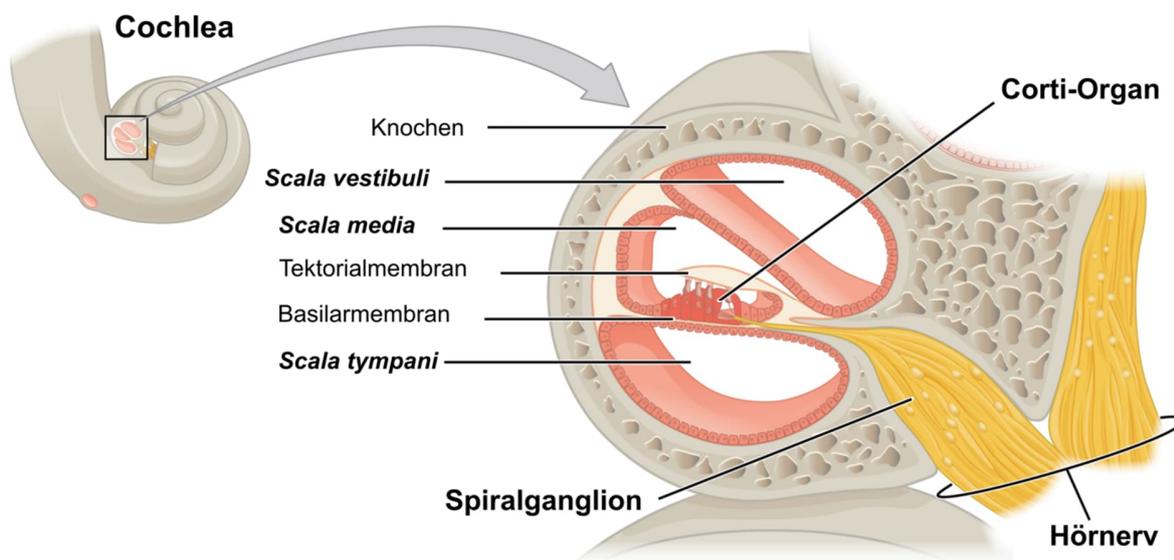


Abbildung 1: Querschnitt durch den *Ductus cochlearis*.

Entlang der schneckenförmigen Anatomie der knöchernen Cochlea (oben links) verlaufen drei mit Flüssigkeit gefüllte Kammern, die *Scala vestibuli*, die *Scala media* und die *Scala tympani*. In der *Scala media* liegt das Epithelgewebe des Corti-Organs auf der Basilarmembran und wird von der Tektorialmembran bedeckt. Die Haarzellen des Sinnesepithels verarbeiten sensorische Reize und schütten Transmitter an die primären afferenten Neuronenboutons aus, deren Somata in den Spiralganglien liegen. Schließlich laufen die peripheren Neuronen zum Hörnerv zusammen und zielen in Richtung zentrales Nervensystem (Adaptiert nach: „Audition and Somatosensation | Anatomy and Physiology I“, 2020).

Der Schallwechseldruck durch ankommende Signale lenkt die Membran am runden Fenster aus und damit die dahinterliegende Flüssigkeit inklusive Basilarmembran des *Ductus cochlearis*. In der Folge entsteht ein nichtlineares Auslenkungs-Phänomen, die sogenannte Wanderwelle, auf der Basilarmembran mit dem ihr aufliegenden Sinnesepithel, dem Corti-Organ. Diese läuft entlang der gewundenen *Scala vestibuli* (Abb. 1) von der basalen Windung in Richtung apikale Spitze, dem Helikotrema. Abhängig von der Anregungsfrequenz erreicht die Wanderwelle ihr Maximum an einer bestimmten Stelle der Basilarmembran und bricht kurz dahinter zusammen (tonotopes Prinzip der Frequenzkodierung). Von dort läuft die Energie basalwärts in der *Scala tympani* und verlässt die Cochlea über das runde Fenster.

Entlang der Basilarmembran erzeugt die Wanderwelle eine Bewegung des Corti-Organs mit den mechanosensitiven Haarzellen (HZ) im Zellverbund (Abb. 2). Die HZ bestehen aus drei Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ) und einer Reihe innerer Haarzellen (IHZ). Alle gesunden HZ tragen apikal drei Reihen treppenstufenförmig angeordnete Bündel von Stereovilli, die allgemein Stereozilien genannt werden (Abb. 3). Die Wanderwelle löst eine Scherbewegung zwischen Tektorial- und Basilarmembran aus. Das bewirkt ein Abscheren der mit *Tip-links* untereinander verbundenen Stereozilien. An der unteren Insertionsstelle der *Tip-links* der kürzeren Stereozilien öffnen sich

durch die Zugkräfte mechanosensitive Transduktionskanäle (Fettiplace, 2017; Pickles & Corey, 1992), die einen Einstrom von depolarisierenden Kalium-Ionen (K^+) aus der Endolymphe in die HZ erzeugt. Die K^+ -Ionen folgen einem Spannungs- und Konzentrationsgradienten (Fettiplace, 2017). Eine akustische Schwingung in die Gegenrichtung bewirkt ein Verschließen der Kationenkanäle und die HZ werden hyperpolarisiert. Die Stereozilien der ÄHZ sind mechanisch mit der Tektorialmembran verbunden, weswegen kleinste Auslenkungen dieser azellulären Struktur die Transduktionskanäle öffnen bzw. schließen. Folgend führt eine Ladungsänderung in den ÄHZ zu einer oszillierenden Längenänderung (Zheng et al., 2000), was die Auf-und-Ab-Bewegung der Basilarmembran verstärkt und damit nun die IHZ anregt, deren Stereozilien nicht mit der Tektorialmembran verbunden sind (Fettiplace, 2017; Huppelsberg & Walter, 2013). In den IHZ führt die Änderung des Membranpotentials zu einer schnellen Aktivierung von spannungsabhängigen Kalzium (Ca^{2+}) -Kanälen (Platzer et al., 2000). Einströmendes Ca^{2+} induziert die Ausschüttung von Glutamat an den Synapsen der IHZ (Fuchs et al., 2003; Moser et al., 2006; Puel, 1995; Ruel et al., 1999).

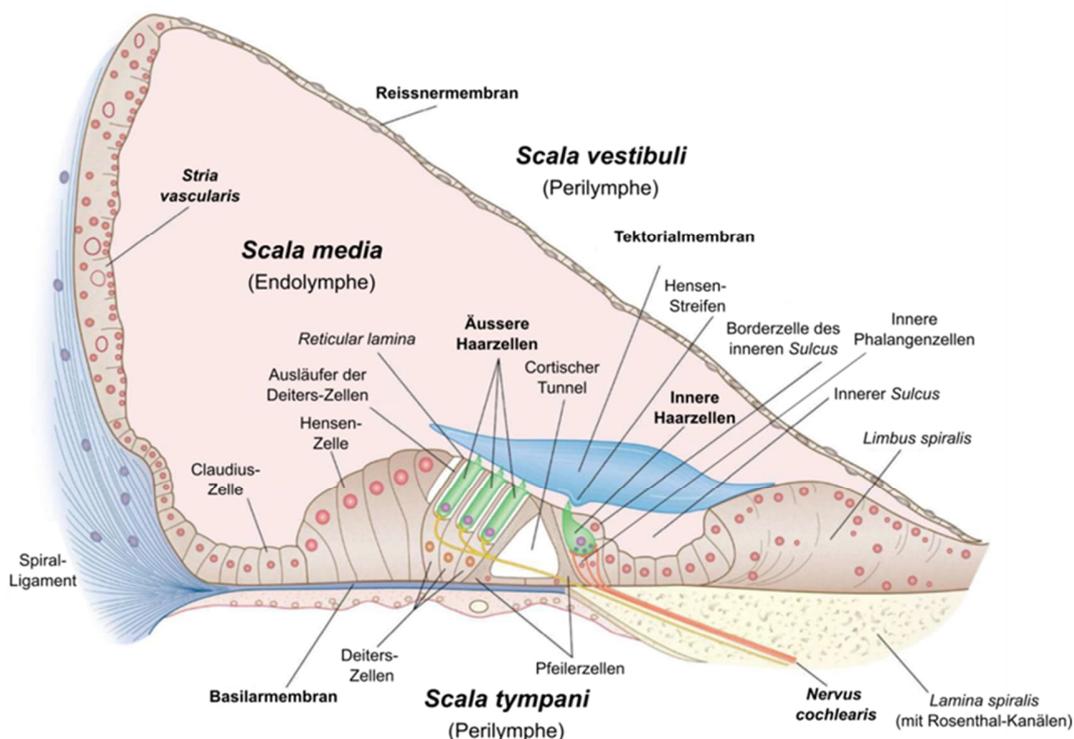


Abbildung 2: Anatomie der reifen *Scala media*.

Die *Scala media* wird lateral von der *Stria vascularis* und der Reissnermembran begrenzt. Die untere Grenze ist die Basilarmembran, auf der das mehrschichtige Sinnesepithel, das hochspezialisierte Corti-Organ, liegt. Es besteht unter anderem aus sensorischen Zellen, den inneren und äußeren Haarzellen (grün, IHZ/ÄHZ). Diese sind in Stützzellen eingebettet, die zusammen mit den Pfeilerzellen den Cortischen Tunnel bilden, der maßgeblich an der Auslenkungsfähigkeit der Basilarmembran beteiligt ist. Die

Tektorialmembran liegt über den HZ, wobei nur die Stereozilien der ÄHZ mit dieser Struktur verbunden sind. Die Stereozilien der IHZ liegen frei in der Endolymphe. Afferente Nervenfasern werden durch die schallinduzierte Glutamatfreisetzung der IHZ erst chemisch und dann elektrisch erregt und leiten Aktionspotentiale in Richtung ZNS weiter. Die ÄHZ werden von efferenten Nervenfasern innerviert. Alle Fasern ziehen durch die Rosenthal-Kanäle in der *Lamina spiralis* und bündeln sich im *Nervus cochlearis* (adaptiert nach Fettiplace, 2017).

1.2 Verschaltung von Haarzellen und Erregungsweiterleitung

Aufgrund der anatomischen und physikalischen Beschaffenheit der Basilarmembran haben Schalldrücke mit einer tiefen Frequenz ihre maximale Amplitude der Auslenkung der Basilarmembran im apikalen Bereich und hohe Frequenzen erzeugen das Maximum der Bewegung im basalen Bereich, was jeweils zu einer Aktivierung der HZ im Bereich der maximalen Auslenkung führt und als Frequenz-Orts-Abbildung oder Tonotopie bezeichnet wird (Huppelsberg & Walter, 2013; von Békésy & Peake, 1990). Diese örtlich spezifische Aktivierung führt zur Depolarisation der IHZ, der Öffnung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Platzer et al., 2000) an den aktiven Zonen und zur Ausschüttung von Glutamat (Brandt et al. 2003), die in den nachgeschalteten postsynaptischen Spiralganglienneuronen exzitatorische postsynaptische Potentiale und anschließend Aktionspotentiale (AP) bewirken. So werden die 15-20 aktiven Zonen einer IHZ und synaptisch gekoppelten Nervenfasern abhängig vom Pegel des Schallreizes erregt (Ohn et al., 2016; Taberner & Liberman, 2005). Diese komplexe Signalübertragung ist im Wesentlichen durch einen speziellen Synapsen-Typ in den IHZ möglich, der Ribbon-Synapse (Fuchs et al., 2003; Moser et al., 2006; Schmitz, 2009). Elektronendichte Strukturen, synaptische Ribbons, bestehen aus einer aktiven Zone, die mit Neurotransmitter-gefüllten Vesikeln umgeben ist. Dadurch ist eine Haarzelle fast dauerhaft in der Lage, Signale zu übertragen (Khimich et al., 2005; Moser et al., 2006). Ribbons bestehen vor allem aus dem Protein Ribeye (Moser et al., 2006; Schmitz, 2009; Zanazzi & Matthews, 2009). Dysfunktion dieser Struktur haben gravierende Auswirkungen auf die Hörleistung bis hin zur kompletten Taubheit (Moser et al., 2013). Durch die Depolarisation einer IHZ werden auch spannungsabhängige BK- und KCNQ4-Kanäle geöffnet, wodurch K^+ -Ionen die IHZ in Richtung der umgebenden Stützzellen verlassen und die IHZ repolarisieren (Fettiplace, 2017; Lang et al., 2019; Lingle et al., 2019).

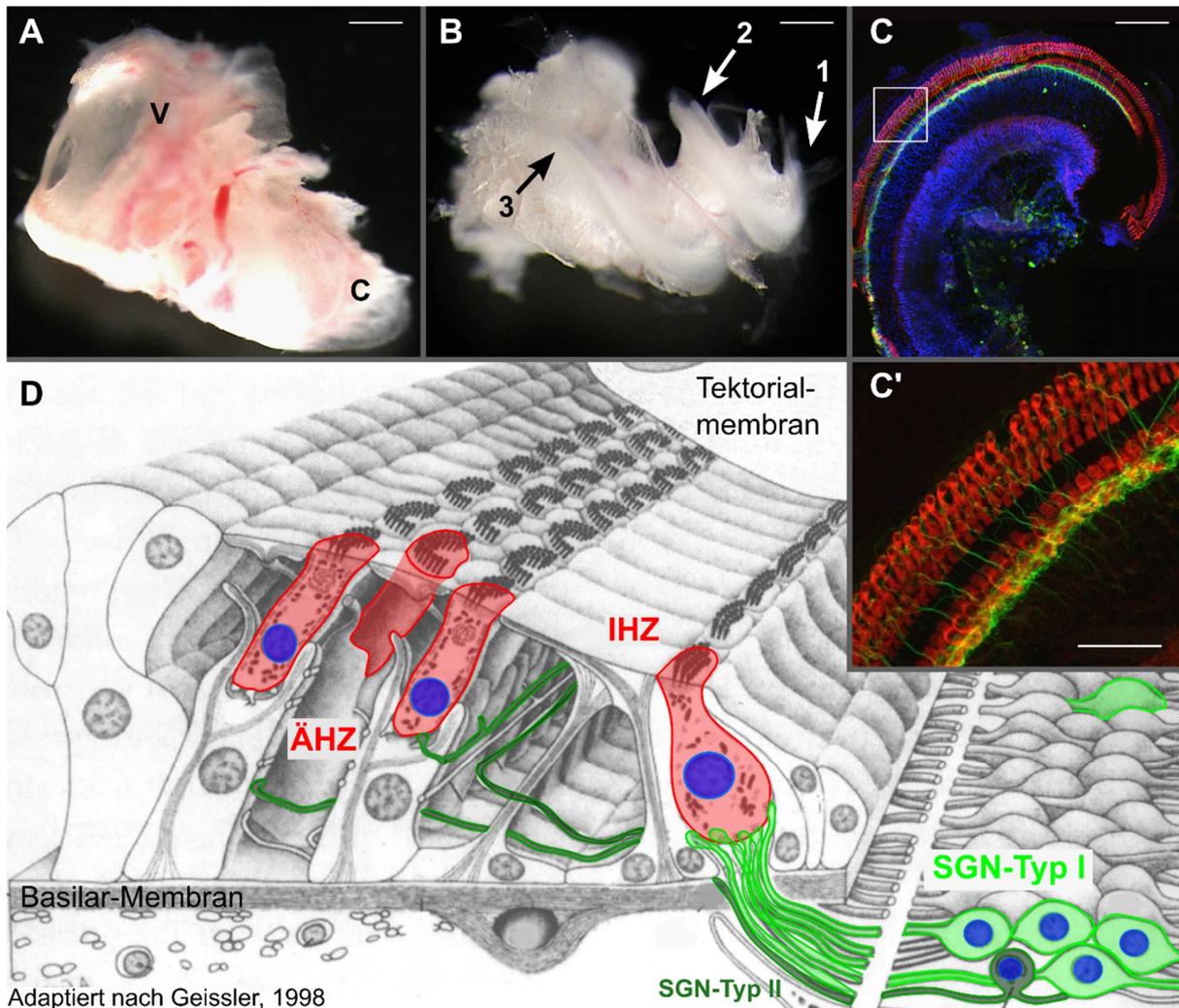


Abbildung 3: Übersicht und Details eines Corti-Präparats der Maus.

A, Innenohr einer adulten Maus mit Vestibularorgan (V) und Cochlea (C). **B**, Nach dem Entfernen der äußeren Knochenhülle liegt das epitheliale Corti-Organ frei sichtbar auf einem knöchernen Fortsatz des Modiolus. Es windet sich von apikal (1) über medial (2) und midbasal (3) nach basal (4). **C**, Durch fluorophorgekoppelte Antikörper markierte Zellen des Corti-Präparats; alle Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. **C'**, Vergrößerung aus **C** (Kästchen) zeigt innere und äußere HZ (rot) und neuronale Fasern/Zellen (grün). **D**, Schematische Darstellung der Zellen des Corti-Organs nach Geissler, 1998, mit den sensorischen, Stereozilien-tragenden HZ (rot, exemplarisch) und den neuronalen Zellen, den Spiralganglienneuronen (SGN), die sich in Typ I (grün, exemplarisch) und Typ II unterscheiden. Die Zellkerne dieser Zellen sind blau eingefärbt. Maßstab: **A**, **B**: 1 mm; **C**: 50 μ m, **C'**: 15 μ m (adaptiert nach Geissler, 1998).

1.3 Kalium und *tight junctions* in der Cochlea

Geladene Teilchen und Kompartimentierung spielen bei der Verarbeitung von akustischen Signalen eine wesentliche Rolle (Fettiplace, 2017). Hier soll näher auf die Rolle von K^+ -Kanälen und *tight junctions* (TJ, engl. für „dichte Verbindung“, lat. *Zonula occludens*) eingegangen werden.

Während die TJ eine abdichtende Funktion für Epithelien (Abb. 4, rote Linie) haben, sind K^+ -Kanäle sehr unterschiedlich in ihrer physiologischen Funktion, haben aber alle gemeinsam, dass sie eine selektive Durchlässigkeit für K^+ -Ionen durch Membranen ermöglichen. Dabei gilt fast universell, dass intrazellulär eine höhere Konzentration an K^+ -Ionen als extrazellulär besteht (Miller, 2000). In der Cochlea hält das durch TJ abgedichtete Epithelgewebe des Corti-Organs einen elektrochemischen Gradienten, das endocochleäre Potential (EP) von + 85 mV zwischen Endolymphe und Perilymphe, aufrecht (Abb. 4). *Scala vestibuli* und *Scala tympani* sind mit Perilymphe gefüllt, einer Flüssigkeit mit hoher Natrium- (Na^+ , 150 mM) und niedriger K^+ - Konzentration (5 mM), die normaler extrazellulärer Flüssigkeit gleicht. Die *Scala media* ist mit Endolymphe gefüllt, die eine hohe K^+ - (157 mM) und niedrige Na^+ - Konzentration (1 mM) aufweist, vergleichbar eher mit intrazellulärer Flüssigkeit. Für K^+ - Ionen, die die IHZ und ÄHZ verlassen, gibt es einen passiven K^+ -Transport entlang des Konzentrationsgefälles bis zur *Stria vascularis* (Abb. 4; Bosher, 1979; Stöver & Diensthuber, 2011). Dort werden die hohe K^+ -Konzentration und das EP der Endolymphe durch einen aktiven Transport von K^+ -Ionen über die *Stria vascularis* unter hohem ATP-Verbrauch aufrecht erhalten (Patuzzi, 2011; Wangemann, 2006).

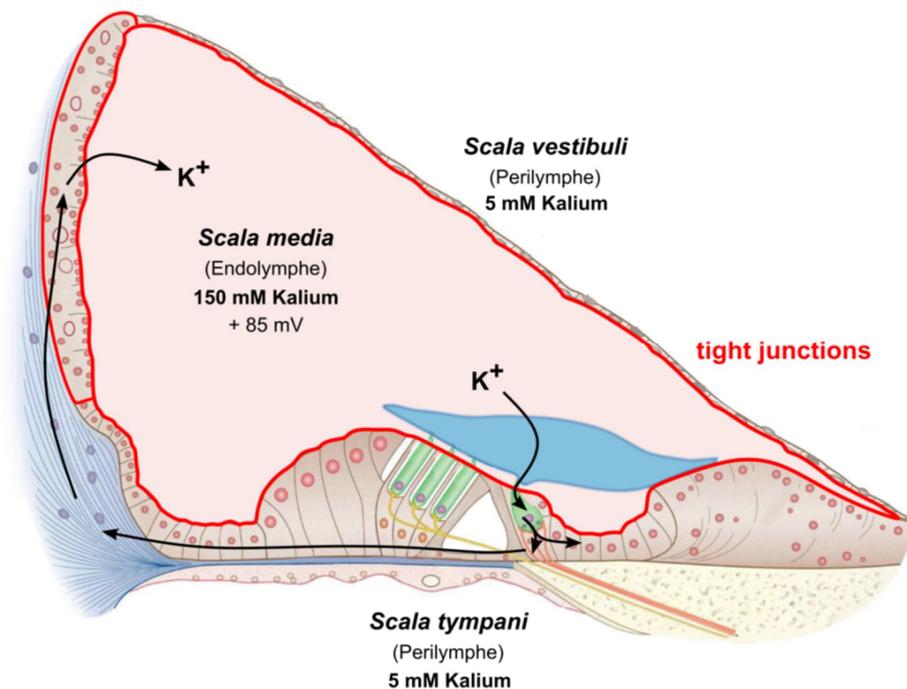


Abbildung 4: Kaliumkreislauf und *tight junctions*.

K^+ -Ionen (K^+) strömen aus der Endolymphe bei Aktivierung in die HZ. Aus den sensorischen Zellen werden sie von Deiters-Zellen aufgenommen. Durch das epitheliale *gap junction*-Netzwerk werden sie zu den Fibrozyten des Spiralligaments transportiert und über das *gap junction*-Netzwerk zur *Stria vascularis* befördert. K^+ wird letztlich in die Endolymphe (blassrot) der *Scala media* freigesetzt. Die Abbildung zeigt die K^+ -

Konzentration und das Potenzial der verschiedenen cochleären Flüssigkeiten. Die rote Linie deutet die Barriere zwischen den Kompartimenten an, die hauptsächlich aus TJ- Proteinen, wie den Claudinen gebildet werden (adaptiert nach Fettiplace, 2017; Wilcox et al., 2001).

1.4 Claudine

Eine funktionierende Barriere zwischen zwei fluidgefüllten Kompartimenten ist für die Organfunktion oft relevant und kann sogar lebenswichtig sein, z.B. bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke. Die Zellen der *Reticula lamina* in der Cochlea bilden ein ähnliches Grenzgewebe. Sie sind durch TJ kompakt verbunden und stellen eine semipermeable Barriere für geladene Moleküle dar (Ben-Yosef et al., 2003; Larre et al., 2014). Die Diffusion durch die TJ zwischen benachbarten Zellen wird durch die Größe und die Ladung der Ionen bestimmt, welche Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse, Aufrechterhaltung der Polarität von Epithelzellen, die differenzierte Genexpression, Zellproliferation oder intrazelluläre Signalkaskaden im Zusammenhang mit der zellulären Stressantwort (Anderson & Itallie, 2009; Otani & Furuse, 2020) haben.

TJ werden durch Transmembranproteine, die den wichtigen Proteinfamilien der Claudine (Cldn) und der Occludine angehören, gebildet. Die Claudine, deren begrifflicher Ursprung im lateinischen „claudere“ – „schließen“ (Tsukita & Furuse, 1998) liegt, umfassen 24 unterschiedliche Proteine mit einer Größe zwischen 20 und 28 kDa (Mineta et al., 2011), die durch die Kombination der einzelnen Cldn-Proteine die Selektivität der parazellulären Barriere bestimmen (Tsukita & Furuse, 1998). Zum Teil sind verschiedene Cldn-Proteine in ihrer Funktion ähnlich und können „verwandte“ Cldn-Proteine funktionell kompensieren, andernorts sind die Zusammensetzungen so speziell, dass das Wegfallen einzelner Proteinspezies zu einem Zusammenbruch der Barrierefunktion führt; gewebespezifisch kann es zu charakteristischen Expressionskombinationen kommen (Mineta et al., 2011). In der Cochlea gibt es fast alle Subtypen der Claudin-Familie. Die Claudine Cldn6, Cldn9, Cldn13, Cldn14, Cldn15 und Cldn19_{v2} sind an der Reifung der Cochlea beteiligt, während andere Claudine stabil über die Entwicklung exprimiert sind, wie z.B. Cldn12 (Kudo et al., 2018). Cldn14 etwa ist zwischen ÄHZ und umgebenden Stützzellen exprimiert, sodass das Fehlen dieses Proteins zu Taubheit bei Mäusen und beim Menschen führt (Ben-Yosef et al., 2003; Nunes et al., 2006). Die Histologie der wabenförmigen Strukturen, die TJ beim Schließen von Geweben bei Mäusen formen, unterscheidet sich mit und ohne Expression von Cldn14 nicht. Der Taubheits-Phänotyp von Cldn14-Mäusen wird wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Perilymphe um die basolateralen Bereiche der HZ verursacht, der zu einer dauerhaften Depolarisation der Sinneszellen mit nachfolgender Ca²⁺- Toxizität und Degeneration der Sinneszellen um den Zeitpunkt der Etablierung des endocochleären Potentials führt. Cldn9- und Cldn11-defiziente Mäuse haben ebenfalls eine verminderte Hörleistung (Kudo et al., 2018).

Cldn12, das auch in der Cochlea exprimiert ist, übernimmt Funktionen in Neuronen und im Herz-Kreislauf-System und hat wichtige Barrierefunktion in den Nieren (Castro Dias et al., 2019; Plain et al., 2020). Aufgrund des Fehlens der genauen Expression von Cldn12 in der Cochlea ist dessen Rolle, die es beim Hören übernimmt, unbekannt.

1.5 Der Na⁺-abhängige K⁺-Kanal Slack

Bei Säugetieren werden bis zu 100 verschiedene Gene für K⁺-Kanäle unterschieden, von denen einige zusätzlich durch alternatives *splicing* zu unterschiedlichen Proteinen führt (Hille, 1986; Miller, 2000). Diese Kanalklasse besteht aus Transmembranproteinen, deren Pore spezifisch für K⁺-Ionen sind. Meist sind sie aus Tetrameren aufgebaut, die entweder die gleichen Proteinuntereinheiten oder verschiedene Untereinheiten der gleichen Familie bilden, was die Kaliumkanal-Proteinfamilie zu einer sehr komplexen Gruppe mit vielen verschiedenen elektrophysiologischen Eigenschaften macht. Die porenbildende α -Untereinheit kann in spannungsabhängige (K_V) Untereinheit, Einwärtsgleichrichter (K_{IR}) Untereinheit, zweiporige (K_{2P}) Untereinheit, Kalzium-aktivierte (K_{Ca}) Untereinheit und Natrium-aktivierte (K_{Na}) Untereinheit eingeteilt werden (Kaczmarek, 2013).

Der Slack-Kanal (Slack, K_{Ca}4.1, Slo2.2, Gen: *kcnt1*) ist ein K_{Na}-Kanal (Bhattacharjee & Kaczmarek, 2005). Der Name Slack „sequence like A calcium-activated K channel“ deutet eine enge Verwandtschaft mit dem Ca²⁺-abhängigen BK-K⁺-Kanal an, hat jedoch nur 7 % Sequenzidentität zum BK-Kanal. Der Slack-Kanal ist mit einer Sequenzhomologie von 74 % eng mit dem Slick-Kanal (Slo2.1, Gen: *kcnt2*) verwandt (Kaczmarek, 2013; Yuan et al., 2003). Die allgemeine Struktur einer α -Untereinheit des Kanal-Tetramers ähnelt der eines K_V-Kanals mit sechs hydrophoben membrandurchspannenden Domänen (S1-S6) und einer Porenregion zwischen der S5 und S6. Die Abhängigkeit der Öffnung des Slack-Kanals sowohl von der Membranspannung als auch von der lokalen intrazellulären Na⁺-Konzentration prädestiniert diesen Kanal für die Repolarisation eines Neurons in Folge (starker) neuronaler Erregung, die durch Aktivierung von postsynaptischen Glutamatrezeptoren bzw. durch die Aktivität von spannungsgesteuerten Na⁺-Kanälen beim Feuern von AP zum Einstrom von Na⁺ führt. Die Aktivierungsraten der K_{Na}-Ströme variieren in unterschiedlichen Neuronen der Ratte, was darauf hindeutet, dass es unterschiedliche Slack-Subtypen gibt. Diese könnten durch alternatives *splicing* der Slack RNA zurückzuführen sein (Brown et al., 2008). Entdeckt wurde Slack in Kardiomyozyten (Kameyama et al., 1984), kommt aber auch in murinen Nieren (Paulais et al., 2006) oder Oozyten von *Xenopus* vor (Egan et al., 1992). Hauptsächlich wird Slack aber im neuronalen Kontext untersucht. Der Kanal ist sowohl im Nervensystem von verschiedenen Vertebraten als auch im Nervensystem von Invertebraten vertreten (Aoki et

al., 2008). Im ZNS der Ratte wurde Slack in vielen Hirnregionen nachgewiesen, u.a. im auditorischen Hirnstamm (*auditory brainstem*), vor allem aber im *Bulbus olfactorius* (Bhattacharjee et al., 2002; Brown et al., 2008). In peripheren Neuronen wurde Slack in 90% der Spinalganglien (DRG-Neurone) nachgewiesen, sowohl im Soma als auch in den Axonen (Tamsett et al., 2009). Slack und Slick sind in diesen Neuronen an der Repolarisation bzw. Hyperpolarisation nach Erregung beteiligt (Bhattacharjee & Kaczmarek, 2005; Gao et al., 2008; B. Yang et al., 2007). Das Mausmodell mit einer konstitutiven Slack-Deletion (Slack^{-/-}, KO) zeigt einen Phänotyp mit erhöhter Sensitivität für neuropathischen Schmerz (Lu et al., 2015) und eingeschränkter kognitiver Flexibilität (Bausch et al., 2015). In der Slack^{-/-}-Maus wurden erhöhte NMDA-induzierte erregungstoxische Hirnschäden und neuronaler Zelltod festgestellt (Ehinger et al., 2021). Die Expression von *kcnt1*-mRNA wurde durch *single cell*-RNA-Sequenzierung in der Cochlea (Orvis et al., 2021) und durch smFISH (*single molecule in situ*-Hybridisierung) in den primären auditorischen Neuronen, den Spiralganglienneuronen (SGN, Lee et al., 2019; Reijntjes et al., 2019) nachgewiesen. An primär kultivierten SGN konnten TTX-sensitive (Na⁺-Kanal-abhängige) K⁺-Ströme gezeigt werden (Reijntjes et al., 2019). Überzeugende Nachweise der Lokalisation des Slack-Proteins existieren bisher nicht (vgl. Lee et al., 2019). Slack/Slick-(*Kcnt1/Kcnt2*)- Doppel-knockout-Mäuse im C57Bl6/J-Hintergrund(Reijntjes et al., 2019) wiesen normale Hörschwellen bis zum Alter von 3 Monaten auf, hatten aber erhöhte Hörschwellen ab 6 Monaten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Beim Menschen sind Fehlfunktionen des Slack-Proteins mit Krankheitsbildern der Epilepsie (*Malignant Migrating Partial Seizures of Infancy*; (Barcia et al., 2012), *Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy* (Heron et al., 2012)) und mit geistiger Behinderung (*Fragile X Syndrom* (Zhang et al., 2012; Bonardi et al., 2021) assoziiert.

1.6 Neuronale Verarbeitung akustischer Signale und Spinalganglienneurone

Sowohl in der Cochlea als auch in jedem Neuron ist der Transport von Ionen durch biologische Membranen eine Grundvoraussetzung für die Verarbeitung und Weiterleitung von Reizen. In Neuronen sind K⁺- Kanäle maßgeblich am Aufbau des Ruhepotentials und an der Terminierung von Aktionspotentialen beteiligt. Spezifische Erregbarkeit und „Wiedererregbarkeit“ von Neuronen wird durch die Kombination eines Transmembran-Ionengradienten und durch zellspezifische Expression von Ionenkanälen aufgebaut (Wright, 2004). Das Ruhepotential von Zellen wird allgemein durch die hohe intrazelluläre K⁺-Konzentration und wenige K⁺- permeable Ionenkanäle eingestellt, wobei die Na⁺/K⁺- ATPase dafür sorgt, dass der Konzentrationsgradient von K⁺ über die Zellmembran erhalten bleibt. Ein durch den Einstrom von Natrium-Ionen aufgebautes

Aktionspotential wird in der Repolarisationsphase mittels Ausstrom von K^+ durch diverse Sorten von K^+ -Kanälen, vor allem spannungsgesteuerte K^+ - Kanäle, beendet (Hille, 1986).

Haarzellen werden von Spiralganglionneuronen innerviert. Man unterscheidet zwei Typen, die SGN Typ I und SGN Typ II Neurone (Perkins & Morest, 1975; Spoendlin, 1981). SGN Typ I Neurone machen 95 % aller SGNs aus und leiten Signale von je einer Ribbon-Synapse einer IHZ Richtung zentrales Nervensystem (Meyer & Moser, 2010). Sie projizieren verzweigende Axone in die dorsalen und ventralen *Nuclei cochlearis* (Coate and Kelley 2013). Die SGN Typ II innervieren mehrere ÄHZ, wobei sie eine wichtige Rolle bei der Transduktion von Schäden und der Schmerzweiterleitung zu scheinen haben (Liu et al., 2015). Die IHZ geben den Signalreiz frequenzsynchron an die afferenten SGN weiter. Zwischen 10 bis 20 terminale Boutons der myelinisierten bipolaren Typ I Neurone sind mit den Ribbons einer IHZ verbunden (Eybalin, 1993). Die SGN übernehmen in ihrer Reizweiterleitung die Tonotopie der vorgeschalteten IHZ. Jedoch unterscheiden sich benachbarte SGN stark in ihren spontanen und induzierten Feuerraten (Heil & Peterson, 2015; Moser & Starr, 2016). 1982 wurden drei Subklassen unterschieden (M. C. Liberman, 1982a); Neurone mit einer schnellen spontanen Feuerrate (HSR-SGN, „*high spontaneous rate*“ bzw. Typ Ia SGN) und einem kleinen Dynamikbereich, Neurone mit einer mittleren spontanen Feuerrate (MSR-SGN, „*medium spontaneous rate*“ bzw. Typ Ib SGN) und Neurone mit einer langsamen spontanen Feuerrate und einem großen Dynamikbereich (LSR-SGN, „*low spontaneous rate*“ bzw. Typ Ic SGN). Bei der Katze kontaktieren die afferenten Boutons dieser verschiedenen SGN-Subtypen die IHZ an verschiedenen Seiten: LSR- und MSR-SGN eher an der modiolaren Seite, d.h. zum Modiolus orientiert, und HSR-SGN eher an der pillaren Seite (zu den ÄHZ gerichtet; Abb. 6A). Die afferenten Fasern unterscheiden sich auch in der Größe ihrer Boutons und in der Größe der zugehörigen Ribbons.

In Anlehnung an die Aktivierungsschwellen und Feuerraten der SGN-Subtypen bei Katzen sollten an IHZ von Mäusen die Typ Ia -Fasern Synapsen ebenfalls eher an der pillaren Seite der IHZ und Ib/Ic -Fasern eher an die modiolaren Seite projizieren (Reijntjes & Pyott, 2016). An IHZ von Mäusen existieren unterschiedlich große Ribbons und Postsynapsen, allerdings ist die Aussage für CBA/CaJ-Mäuse, dass kleine Ribbons mit großen Postsynapsen der HSR-SGN verbunden seien und große Ribbons mit kleinen LSR-SGN nicht für alle Mauslinien gültig (L. D. Liberman et al., 2011; Reijntjes et al., 2020).

Die biophysikalischen Unterschiede der SGN-Subtypen basieren auf zellulären und molekularbiologischen Unterschieden (Petitpré et al., 2018; Shrestha et al., 2018; Sun et al., 2018). Die SGN-Typ I -Subtypen, die etwa im Verhältnis 50 % (Ia) : 25 % (Ib) : 25 % (Ic) verteilt sind (Sun et al.,

2018), unterscheiden sich beispielsweise durch unterschiedliche Expression von zellulären Signalmolekülen, Transkriptionsfaktoren, Neurotransmitter-Rezeptoren oder Ionen-Kanälen. Die Höhe der Expression des Mitochondrien-Genoms lässt zum Beispiel Rückschlüsse auf das Vorhandensein von SGN Typ Ia zu, da diese HSR-Neurone eine besonders hohe Zahl von Mitochondrien enthalten (M. C. Liberman, 1982). Die unterschiedliche Expression von molekularen Markern und Ausprägung von elektrophysiologischen Parametern könnten sogar eine Sortierung in sechs Subtypen zulassen (Sun et al., 2018). Während HSR-Neurone (Typ Ia) und MSR-Neurone (Typ Ib) in Primärkultur ausschließlich einzelne Aktionspotentiale präsentieren, gibt es in der LSR-Population, den Typ Ic Neuronen, eine weitere Unterteilung (50:50) in solche, die repetitiv feuern und solche, die nur einzelne Aktionspotentiale generieren (Petitpré et al., 2018). Daneben zeigen einige SGN-Subtypen unterschiedliche Eigenschaften in unterschiedlichen cochleären Regionen (Shrestha et al., 2018). Beispielsweise wurde mit der Methode des RNAScope® die Expression der mRNA für einen spannungsabhängigen K⁺-Kanal Kcns3 untersucht und ein absteigendes Level der Expression entlang der tonotopen Orientierung festgestellt. Während manche neuronalen Marker wie Calretinin konservativ in allen Windungen ähnlich häufig sind, gab es Marker, die sowohl subtypabhängig als auch windungsabhängig unterschiedliche Expressionen zeigen. Etwa beim Kalium-Ionenkanal Kcnp4, dessen Genexpression bei SGN Typ Ia in der apikalen und medialen Windung, bei den SGN Typ Ic jedoch nur in der basalen Region hoch ist.

Dieser kleine Ausschnitt deutet die Komplexität an, mit der die neuronale Verarbeitung des Hörens bereits in den primären auditorischen Neuronen erfolgt.

1.7 Hörmessungen und Hörbahn

Setzt man Probanden lauten Geräuschen (Berufslärm, Rockkonzert, Disco) aus, hat dies oft eine direkte Verschlechterung der Hörleistung zur Folge (M. C. Liberman & Kiang, 1978). Die frequenzspezifischen Hörschwellen kann man durch subjektive Audiometrie (setzt kooperatives Verhalten des Probanden voraus) oder objektive Audiometrie (Schwellenbestimmung mit Hilfe von durch akustische Reize evozierten Hirnstammpotentialen) bestimmen. Ein Audiogramm stellt den Schalldruckpegel, der für die Auslösung einer neuronalen Schwellenantwort nötig ist, als Funktion über der Frequenz dar (Abb. 15).

Nach der Exposition gegenüber Lärm sind höhere Schalldrücke notwendig, um eine neuronale Antwort auszulösen. Dieser *noise induced hearing loss* (NIHL) ist zunächst durch eine temporäre Hörschwellenverschiebung (TTS; *temporary threshold shift*, Ryan et al., 2016) gekennzeichnet, die normalerweise innerhalb weniger Tage regeneriert. Längere Exposition oder intensivere Schallpegel können zu einem Schaden führen, der nicht vollständig reversibel ist, sodass ein

permanenter Hörschaden vorliegt (PTS, *permanent threshold shift*). Ursache dafür kann eine Funktionsbeeinträchtigung bis hin zum Verlust der HZ, der SGN oder auch anderer cochleärer Strukturen sein (Kujawa & Liberman, 2015; Moser & Starr, 2016).

Abbildung 5 zeigt die Kerngebiete der neuronalen auditorischen Signalverarbeitung (Hörbahn). Die extrakranielle Messung der elektrischen Signale der neuronalen Summenaktivität zwischen Hörnerv und auditorischem Mittelhirn in den ersten 10 ms nach akustischem Reiz heißt Hirnstammaudiometrie (ABR-Messung, *auditory brainstem response* bzw. *BERA*, *brainstem-evoked response audiometry*). Die Spannungssignale können als charakteristische Ausschläge, als ABR-Wellen, den einzelnen Stationen zugeordnet werden und näher analysiert werden können.

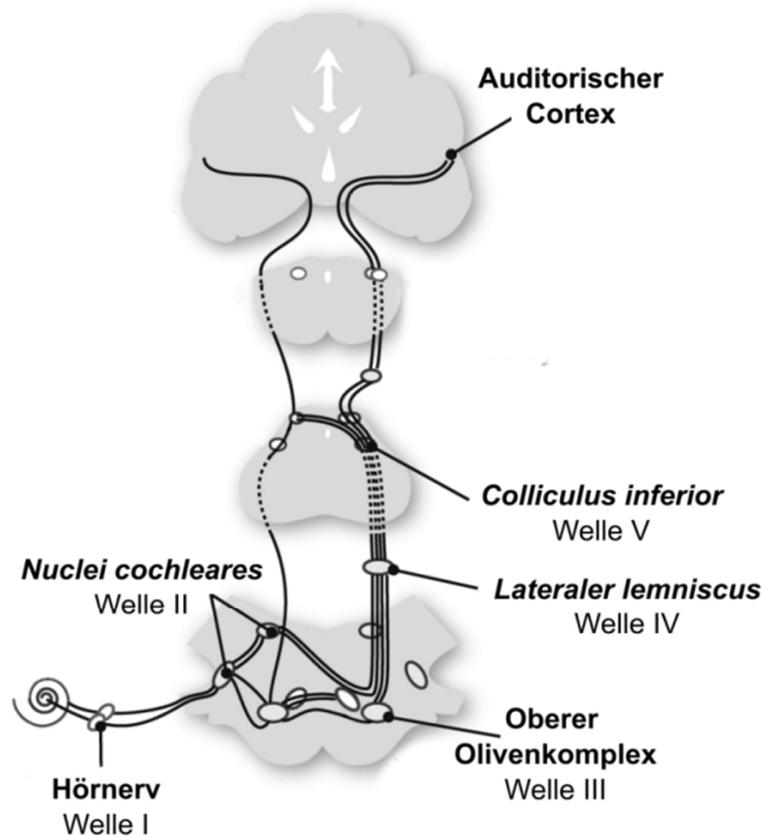


Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der aufsteigenden neuronalen auditorischen Signalverarbeitung.

Nach der Schalltransduktion in der Cochlea wird die Erregung vom peripheren Hörorgan über den Hörnerv zentralwärts zum Komplex der *Nuclei cochleares* geleitet. Die Axonterminale der SGN verzweigen sich sowohl zum dorsalen als auch zum ventralen *Nucleus cochlearis*. Über den oberen Olivenkomplex wird die Erregung zum *lateralen Lemniscus* und weiter zum *Colliculus inferior* geleitet. Die finale Verarbeitung der auditorischen Signale erfolgt nach der Passage durch das auditorische Mittelhirn schließlich im

auditorischen Cortex, einem Teil der Großhirnrinde. Die Quelle der Ableitungsspitzen der ABR-Wellen I bis V liegen in den entsprechend gekennzeichneten Verarbeitungsstellen der Hörbahn (adaptiert nach Murillo-Cuesta et al., 2012).

Die ABR-Welle I gibt Auskunft über die neuronale Summenaktivität des Hörnervs, der Axone der SGN. Ihre Amplitude spiegelt die summierte Intensität der Reizweiterleitung wider, während die Latenz Informationen über die Dauer der Signalverarbeitung enthält, was zusammengefasst eine Aussage zur Funktionalität der primären auditorischen Neurone zulässt.

1.8 Cochleäre Synaptopathie nach Schalltrauma

Seit 2009 rückt das Phänomen des *hidden hearing loss* (deutsch: versteckter Hörverlust) oder der cochleären Synaptopathie (Kujawa & Liberman, 2009) in den Fokus der Forschung. Der Begriff wurde für CBA/CaJ-Mäuse geprägt, die nach einem definierten Schalltrauma (2 h, 100 dB SPL) eine TTS, aber keine PTS erlitten. Dennoch wiesen die Tiere irreversible Verluste von Ribbons und Nervenfasern und eine Reduktion der ABR-Welle I im höheren Frequenzbereich auf, was sich jedoch nicht auf die Hörschwelle auswirkte.

Auslöser des *hidden hearing loss* können neben Lärm (*noise-induced hidden hearing loss*) auch Altersprozesse sein (*age-related hidden hearing loss*; M. C. Liberman, 2017; Sergeyenko et al., 2013; Yang et al., 2015). Die zugrunde liegende Histopathologie ist jedoch kaum verstanden, da mehrere Ursachen der Dysfunktion möglich sind: von der fehlenden Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials (defekte *Stria vascularis*) über die gestörte synaptische Übertragung an den Haarzellen (defekte Steriozilien und/oder Ribbons) bis zur verminderten Leitung von Aktionspotentialen in Hörnervenfasern (defekte postsynaptischen Boutons und/oder fehlende SGN; Kujawa & Liberman, 2009, 2015; M. C. Liberman & Beil, 1979).

Naheliegende Folgen eines akustischen Traumas durch intensive Schallexposition sind Schädigung der involvierten sensorischen Zellen und primären auditorischen Neurone durch Ca^{2+} -induzierte Erregungstoxizität sowie Schwellung der Ribbons und postsynaptischen Boutons (Abb. 6 B,C; Kim et al., 2019; Puel, 1995).

Die Forschungsgruppe um Kujawa und Liberman haben die Konsequenzen eines Schalltraumas mit einem Lautstärkepegel von 100 dB SPL von 8 – 16 kHz für 2h für die Hörleistung adulter CBA/CaJ-Mäuse untersucht (Kujawa & Liberman, 2009). Sie fanden heraus, dass direkt nach dem Trauma die Hörschwellen anstiegen (TTS, Abb. 6D), jedoch bereits nach zwei Wochen posttraumatische Hörschwellen kaum mehr erhöht waren. Die Wachstumsfunktion der Amplitude der ABR-Welle I zeigt einen Abfall in der mittel-hochfrequenten Cochlea-Region (Abb. 6E; 32 kHz). Die Autoren fanden einen akuten Verlust von afferenten Boutons, gefolgt von einer langsameren

irreversiblen Nervendegeneration. Damit war ein irreversibler Verlust von ca. 50% (6-9) Ribbons pro IHZ für diesen Frequenzbereich bereits einen Tag nach dem Schalltrauma verbunden, der stabil blieb (Abb. 6F). Im Gegensatz zur CBA/CaJ-Linie wurden mittlerweile bei C57Bl6/J-Mäusen Hinweise auf eine teilweise Regeneration von Ribbons nach Trauma gefunden (Kim et al., 2019).

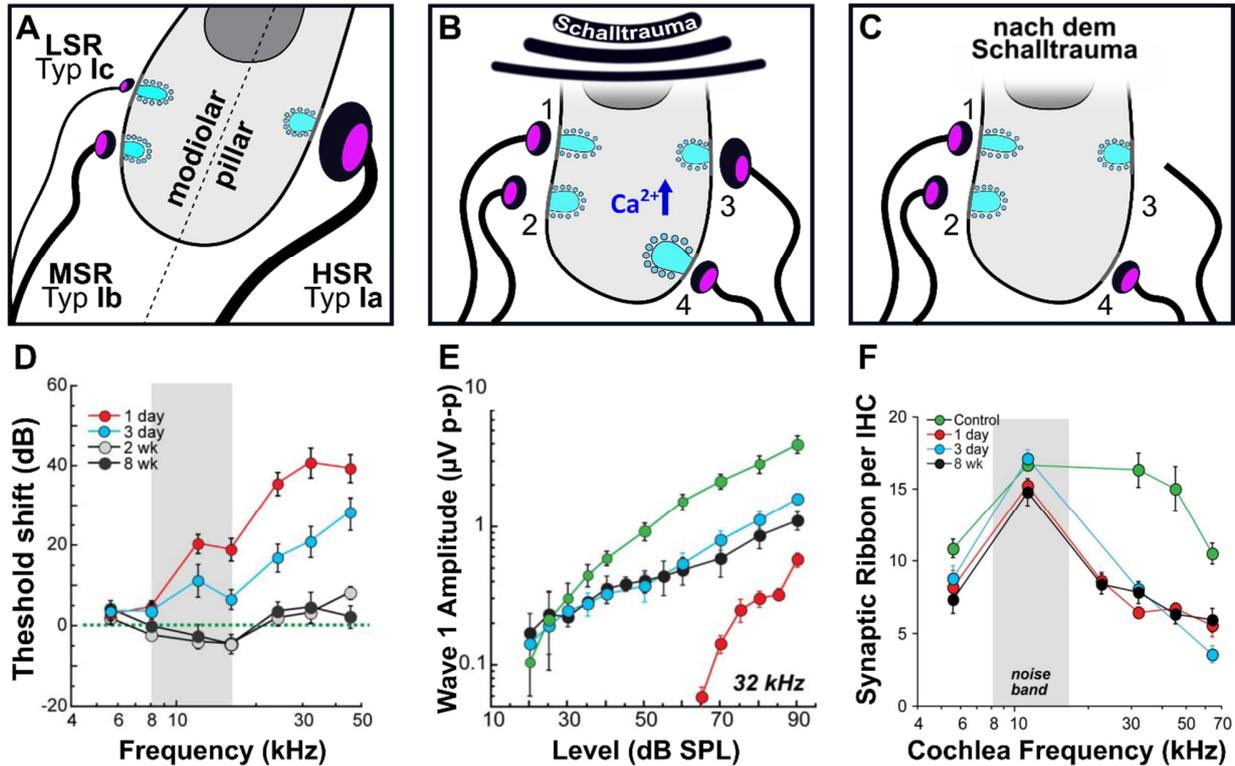


Abbildung 6: Cochleäre Synaptopathie nach Schalltrauma.

A-C, Schema der Synapsen – der Ribbons und der postsynaptischen Boutons – an eine IHZ der Maus vor (**A**), während (**B**) und nach (**C**) einem Schalltrauma. **A**, Charakterisierung der SGN-Typ I-Fasertypen nach Liberman/Shrestra/Sun in LSR- und MSR-SGN-Fasern, die die IHC überwiegend modiolär erreichen und die robusten HSR-SGN-Fasern, die die IHZ eher pillar kontaktieren. LSR: *Low spontaneous rate*-Fasern; MSR: *medium spontaneous rate*-Fasern; HSR: *High spontaneous rate*-Fasern. **B**, Mögliche Akutveränderungen zwischen Prä- und Postsynapse während eines Schalltraumas. Neben keinen Veränderungen (1) können Prä- und Postsynapse sich räumlich voneinander entfernen (2). Es kann auch zu einer Schwellung von Postsynapse (3) oder Ribbon (4) kommen. **C**, Mögliche langfristige Folgen nach einem Schalltrauma können ausbleiben (1), zu einer Trennung von Prä- und Postsynapse (2) oder zum Verlust der Postsynapse (3) oder des Ribbons führen (4). **D-F**, Modifiziert nach Kujawa & Liberman, 2009, Verschiebung der Hörschwellen bei CBA/CaJ-Mäusen (**D**) durch ein 100 dB – Schalltrauma nach einem Tag (rot) bis zu acht Wochen nach Trauma (schwarz). **E**, Sichtbar werden die Folgen des Traumas in der Amplitude der Welle I und in einem Verlust der Ribbons pro IHZ (**F**) gegenüber Tieren ohne Schalltrauma (grün) im Frequenzbereich oberhalb von 11 kHz).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

1. Obwohl bekannt ist, dass mRNA des Slack-Ionenkanals in SGN exprimiert ist, ist dessen zelluläre und subzelluläre Lokalisation bislang nicht geklärt. Es soll daher die Lokalisation von Slack-Protein mittels Immunfluoreszenz und mit in Slack^{-/-}-Gewebe geprüften spezifischen Antikörpern in Corti-Präparaten von Mäusen mit ausgereifter Cochlea untersucht werden.

2. Da Slack ein repolarisierender K⁺-Kanal in SGN ist, wird vermutet, dass das Fehlen von Slack zu einem Hörphänotyp (erhöhte Hörschwellen) führt. Daher sollte das Hörvermögen von Slack-defizienten Mäusen untersucht werden. Es sollten ABR-Messungen an adulten Slack^{-/-} und Slack^{+/+}-Mäusen durchgeführt werden.

3. Da Slack ein repolarisierender K⁺-Kanal in SGN ist, könnte sich akustische Überstimulation bei 8 Wochen alten Slack-defizienten Mäusen stärker auf das Hörvermögen und die SGN auswirken als bei den Wildtyp-Mäusen (genetischer Hintergrund: C57Bl6/N). Es soll die Wirkung zweier Schalltraumata auf Klick-Hörschwelle und frequenzspezifische Hörschwellen und auf neuronale Parameter (Amplituden und Latenzen der ABR-Welle I) vor Trauma und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trauma analysiert werden. Zudem sollten die Folgen der Schalltraumata auf Anzahl, Größe und Paarung von Ribbons und Postsynapsen an den inneren Haarzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht werden.

4. Obwohl die mRNA des Gap-Junction-Proteins Cldn12 in der Cochlea nachgewiesen wurde, ist dessen zelluläre Expression unklar. Aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper, sollte die zelluläre Expression von Cldn12 in der Cochlea adulter Cldn12^{+/-}-Mäuse mit Reporter-Funktion mit der LacZ-Färbemethode charakterisiert werden.

5. Weil das Hörvermögen von Cldn12-defizienten Mäusen nicht bekannt war, sollten ABR-Messungen an 8 Wochen alten Cldn12^{-/-}-Mäusen und ihren Cldn12^{+/-}-Wurfgeschwistern (genetischer Hintergrund: FVB/N) durchgeführt werden. Zudem sollten die Histologie der Corti-Organen und die Synapsen der inneren Haarzellen von Cldn12^{-/-}-Mäusen und Cldn12^{+/-}-Wurfgeschwistern charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mauslinien

Die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit wurde unter Verwendung von Labormäusen (*Mus musculus domesticus*) erzielt. Alle Mäuse im Experiment wurden entsprechend der geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes § 4 gehalten und in den Versuch genommen. Sie hatten einen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und permanenten Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff®, Soest).

2.1.1 Slack - C57Bl6/N

In dieser Arbeit soll die Rolle des Natrium-abhängigen Kaliumkanals SLACK für das Hören untersucht werden. Dafür wurde ein Mausmodell genutzt, bei dem das SLACK-Gen *kcnt1* ubiquitär durch eine Ablation des porenbildenden Exons der Sequenz durch homologe Rekombination deletiert wurde (Slack^{-/-}; Lu et al., 2015). Die Mäuse wurden am CIPMM Homburg in den Hintergrund C57Bl6/N zurückgekreuzt. Das Modell wurde von Prof. Dr. Peter Ruth (Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Eberhard Karls Universität Tübingen) generiert und zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Cldn12 - FVB/N

Claudin12-defiziente Mäuse (Cldn12^{-/-}; Plain et al., 2020) wurden im Rahmen des *UC Davies Knock Out Mouse Project* („*Knockout Mouse Project (KOMP) Repository*“) erzeugt und von Prof. Dr. Todd Alexander (Department of Pediatrics and Physiology, University of Alberta, Kanada) an die Universität des Saarlandes exportiert. Die Cldn12^{-/-}-Maus besitzt ein durch homologe Rekombination eingefügtes Reporter-gen für LacZ im dadurch nicht mehr funktionalen Claudin12-Gen im Maushintergrund FVB/N. Eine erste Charakterisierung des Corti-Organs der Cldn12-defizienten Mäuse erfolgte unter meiner Betreuung in der Bachelorarbeit von Viola Niemann. Daraus resultierende Ergebnisse wurden durch Hörmessdaten und statistische Auswertungen erweitert und zusammengefasst.

2.2 Genotypisierung

Jede in diesen Versuchen verwendete Maus wurde zuvor mit Hilfe der Methode „Polymerase-Kettenreaktion“ (PCR) von Kerstin Fischer genotypisiert. Das genetische Material wurde durch Ohrstanzen gewonnen, die zur Vergabe der individuellen Identifikationsnummer jeder Maus benötigt wurden. Nach den Versuchen wurde das Ergebnis durch eine zweite PCR geprüft, hier diente die Schwanzspitze als Probenmaterial. Die genetische Einordnung der Mäuse in Wildtypen (WT; Slack^{+/+}, Cldn12^{+/+}) und *Knockouts* (KO; Slack^{-/-}, Cldn12^{-/-}) sind für diese Arbeit bestätigt worden.

2.3 Versuchsgruppen der Hörmessungen

Die Versuchsgruppen der Mäuse, die zunächst in die Hörmessungen und anschließend in die Histologie kamen, wurden passend nach Alter und Genotyp ausgesucht. Zwischen den Schalltrauma – Versuchen (mild – 100 dB SPL; (eng. *sound pressure level*; Schalldruckpegel)) und moderat - 106 dB SLP) lagen jedoch ca. ein Jahr Generationenwechsel in den Mauslinien. Für das milde Trauma wurden ausschließlich Wurfgeschwister der Slack-Linie in den Versuch genommen, was aufgrund von Änderung der Zuchtauflagen nicht mehr für das moderate Trauma möglich war. Hier wurden Slack^{-/-}-Mäuse mit C57Bl6/N-WT Mäusen kombiniert.

2.4 Gewinnung von Präparaten für Experimente

Zur molekularbiologischen Analyse wurden Mäuse nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes getötet und beide Innenohren als Ganzes entnommen. Diese wurden sowohl als Ganzes eingebettet, als auch das Epithelgewebe der Cochlea mit sensorischen und neuronalen Zellen unter dem Stereomikroskop SZX-16 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) heraus präpariert.

2.4.1 Präparation des Innenohrs

Die Mäuse wurden zunächst in Isofluran® (Baxter GmbH, Unterschleißheim) betäubt, und durch zervikale Dislokation getötet und anschließend dekapitiert. Der Schädel wurde vom umliegenden Gewebe befreit und mittig geteilt, so dass, wenn benötigt, die Gehirnhälften präzise entfernt werden konnten.

Da das Innenohr Sollbruchstellen mit dem umgebenden Felsenbein hat, ist es gut möglich, Cochlea und Vestibularorgan in einem Stück entlang dieser Grenzen herauszuhebeln. Das

isolierte Innenohr wurde für anschließende Versuche zügig in 4°C kalte physiologische Lösung B49 überführt (Tab. 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung der physiologischen Präparationslösung (Laborintern B49).

B49: pH 7,35; 320 mOsm/l		
143 mM	NaCl	Fisher Chemical, Schwerte, S/3160/60
5,8 mM	KCl	VWR Chemicals, Darmstadt, 26764.298
1,3 mM	CaCl ₂	Honeywell, Charlotte, 223506
0,9 mM	MgCl ₂	Calbiochem, San Diego, 442611
5,6 mM	Glukose	AppliChem GmbH, Darmstadt, 143140.1211
10 mM	HEPES acid	AcrosOrganics, Montreal, 172572500
0,9 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Honeywell, Charlotte, 71504

2.4.2 Corti-Präparate für Immunfluoreszenz-Färbung

Die histologische Grundlage zur Analyse einiger Fragestellungen wurde im fixierten Epithelgewebe der Cochlea, dem Corti-Präparat (CP), untersucht. Es war essentiell, diese Fixierung den Anforderungen der später verwendeten Methoden und Antikörpern (AK) anzupassen.

2.4.2.1 Zamboni-Fixierung

Zunächst wurde das Innenohr, wie in Abschnitt 2.4.1. beschrieben, herauspräpariert und direkt aus der physiologischen Lösung in *Zamboni's* Fixierlösung (Morphisto, Frankfurt am Main, 12773.02500) überführt. Diese Paraformaldehyd (PFA) - basierte Fixierlösung ist zusätzlich mit Pikrinsäure versetzt, welche zum verbesserten Erhalt des Gewebes beitragen soll. Zunächst wurde unter dem Stereomikroskop mit einer Pinzettenspitze ein kleines Loch ins Helicotrema der Cochlea gestochen. Anschließend wurden etwa 500 µl *Zamboni's* Fixierlösung mit einer feinen Spritze langsam durch das runde Fenster der Cochlea injiziert. So traten die Flüssigkeiten in der Cochlea am Helicotrema aus und wurden durch die Fixierlösung ersetzt. Bei Raumtemperatur wurde das Innenohr für 30 min inkubiert und dann in kalte Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS; gibico®, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, 18912-014) gelegt.

Am apikalen Ende der Cochlea beginnend wurde nach der Fixierung die knöchernen Hülle der Cochlea mit Hilfe von feinem Präparationsbesteck (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) entfernt. Sobald die Windungen des Corti-Organ um den Modiolus frei lagen, wurde diese Struktur zusammen vom restlichen Innenohr getrennt weiter präpariert. Nun konnte das Corti-Organ als fixiertes Präparat in zwei Teilen vom knöchernen Modiolus wegpräpariert werden. Ein CP entsprach der apikalen/medialen Windung des Corti-Organ und das andere der

midbasalen/basalen Windung. Der midbasale Bereich liegt zwischen medialer und basaler Region des CP, im Weiteren als midbasal bezeichnet. Diese Einteilung findet in Anlehnung an die Publikationen zur Tonotopie der Cochlea von Mäusen (Engel et al., 2006; Müller et al., 2005) vgl. Abb. 14) statt. Final wurde die Tektorialmembran mit den feinsten Pinzetten entfernt und die CP mithilfe eines Präparier-Löffels auf einen Objektträger (OT, Menzle-Gläser Superfrost® Plus, Thermo Scientific, Braunschweig, JI800AMNZ) in PBS übertragen. Die CP durften nie trockenfallen, sprich außerhalb von Flüssigkeiten sein.

2.4.2.2 Besondere Fixiermethoden

Um die Spezifität des Slo2.2.-AK im CP zu testen, musste das Gewebe möglichst gering fixiert (persönliche Mitteilung von Prof. Ruth) sein, was eine Änderung des oben aufgeführten Protokolls notwendig machte. Hierzu wurde die Cochlea zunächst unfixiert in eiskalter B49 soweit präpariert, dass das Corti-Organ und der Modiolus entfernt werden konnten. Diese noch relativ stabile Struktur wurde auf einen OT verbracht und dann zum Fixieren 5 min in eiskalter 1 % - PFA-B49-Lösung bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das CP in eiskalter B49 frei präpariert und die Tektorialmembran mit feinen Pinzetten entfernt.

2.4.3 Herstellen eines Corti-Präparats für LacZ-Färbung

Für die LacZ-Färbung wurde die Cochlea der drei bis vier Wochen alten Cldn12-Mäuse entnommen und mit 4 % - PFA-PBS-Lösung perfundiert sowie anschließend eine Stunde auf Eis fixiert. In PBS wurde das CP mit Modiolus herauspräpariert und auf einen Objektträger mit Hohlschliff (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen; 1320102) überführt. Daraufhin folgte ein weiterer Fixierungsschritt, indem das CP für 15 min in Glutaraldehyd-Lösung (Tab. 6) bei RT inkubierte. Das Präparat wurde dreimal für fünfzehn Minuten in Waschpuffer (Tab. 6) gewaschen und das CP vom Modiolus getrennt. Final wurde die Tektorialmembran entfernt.

2.4.4 Einbetten des Innenohrs für Gefrierschnitte der Cochlea

Um Gefrierschnitte der Cochlea mit der RNAScope® Fluorescent Multiplex Methode zu untersuchen, wurde von mir ein Protokoll zur Einbettung etabliert. Dafür wurde das Innenohr nach der Entnahme für 24 Stunden in frisch angesetzter RNase-freier 4 % - PFA-PBS-Lösung auf einem Vertikal-Multifunktionsschütteler bei 4°C in der Lösung schwebend fixiert. Die fixierten Präparate wurden für 48 Stunden in 0,5 M RNase-freier Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8; Fisher bioagents, Schwerte, BP2483) rotierend bei 4°C entkalkt und dann in 1x PBS für 5 min rotierend gewaschen. Das Innenohr war nach der Inkubationszeit farblos und weich. Eine

Dekalzifizierung mit R.B.D. (Rapid Bone Decalcifier) wurde als Alternative getestet, jedoch ließ sich auf Gefrierschnitten von mit R.B.D. behandelten Innenohren kein RNAScope® (Abb. 19) etablieren. Nach der EDTA-Inkubation wurden die Präparate zum Gefrierschutz über Nacht in 30 % Saccharose-PBS (rotierend bei 4°C, Roth, Karlsruhe, 9286.1) inkubiert. Das fixierte und dekalzifizierte Innenohr wurde unter dem Stereomikroskop auf dem ovalen Fenster liegend in selbstgefertigten Aluminiumtöpfchen mit Tissue-TEK® (O.C.T.™ Compound, Sakura, 4583) eingebettet und anschließend bei -80°C gelagert.

2.5 Etablierung von Gefrierschnitten der Cochlea

Das Ziel der Etablierung waren Cochlea-Schnitte von 12 µm Dicke aus der mittmodiolaren Region, sodass die Spiralganglien unterschiedlicher Windungen in einem Schnitt verglichen werden konnten. Zunächst wurde der Messerhalter CN mit Stahlklinge Profil C (Abb. 7A; Leica, 14021607100) in den Kryostaten (Leica, CM30050S) eingespannt und folgende Parameter zum Schneiden eingestellt: die Temperatur in der Schneidekammer auf -30 °C; die des Objektisches auf -25°C und die Trimmstärke auf 100 µm. Als Vorbereitung wurden die eingebetteten Innenohr - Tissue-TEK® - Blöcke von -80°C auf -30°C in der Schnittkammer akklimatisiert. Währenddessen wurden pro Cochlea 15 OT bereitgelegt (Abb. 15B) und mit der ID der Cochlea und den OT-Nummern beschriftet. Der Grund für dieses Vorgehen war, die unterschiedlichen Schnittebenen auf alle OT zu verteilen und mehrere OT mit mittmodiolaren Schnittebenen zu erzeugen.

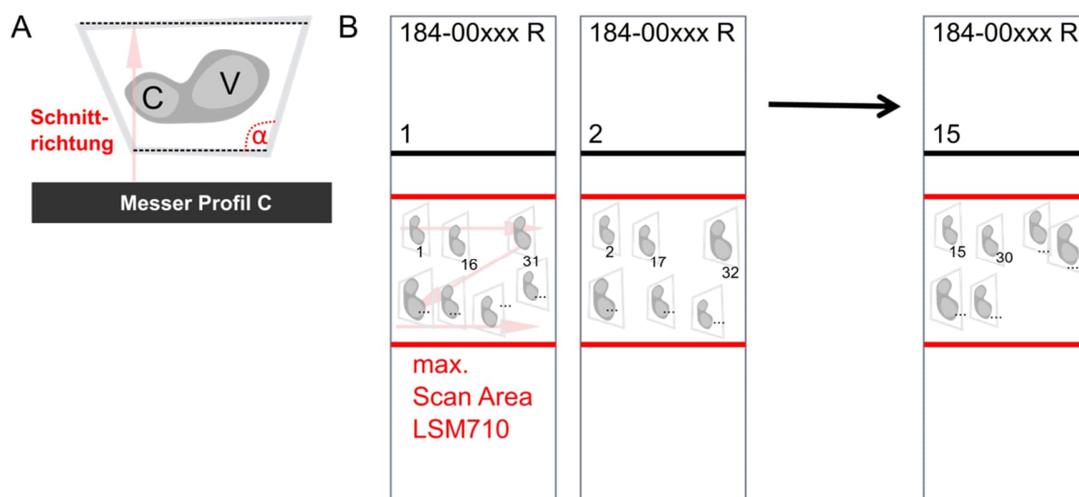


Abbildung 7: Schema zur Anfertigung von Gefrierschnitten der Cochlea.

A, B, Orientierungshilfen zur Lage des Innenohrs im getrimmten Tissue-TEK® - Block (**A**) und der Schnitte auf den OT (**B**). **A,** Nach dem Anschnitt des eingebetteten Innenohrs im Tissue-TEK® musste der vorher runde Block trapezförmig zugeschnitten werden. Dabei war die kürzere Grundseite (kürzere gestrichelte Linie) zum Messer orientiert (Schnittrichtung, rot) und der Winkel der Trapezeschenkel (α) nicht zu groß gewählt- etwa 110°-130°. **B,** Schema einer Reihe OT mit angedeuteter Reihenfolge der Schnitte. Die

Nutzungsfläche der OT war durch den maximalen Scanbereich des zur Auswertung verwendeten Mikroskops LSM 710 limitiert (rot).

Da der Probenstisch am LSM710 der Arbeitsgruppe einen begrenzten Verfahrweg hat, wurde dieser auf dem OT eingezeichnet (Abb. 7B, rot). Anschließend wurde der runde Innenohr - Tissue-TEK® - Block mit Tissue-TEK® auf den Objektstisch des Kryostaten geklebt. Die Orientierung war so, dass der Boden, auf dem das Innenohr lag, Richtung Objektstisch – weg vom Messer – lag. Tissue-TEK® oberhalb des Präparats wurde mit Hilfe grober Schnitte getrimmt, bis die Bogengänge des Vestibularorgans sichtbar wurden. Nach erneuter Kontrolle der Innenohr-Lage im Block wurde das Tissue-TEK® entsprechend der Darstellung an den Seiten auf ein Trapez getrimmt (Abb. 7A). Das Innenohr sollte in der Längsachse parallel zum Messer liegen. Durch die Eigenschaften des Trapezes wurden die Spannung im Präparat beeinflusst, was einen Einfluss auf die Qualität der Schnitte hatte. Dabei sollte die Höhe des Trapezes kleiner sein als die längere der Grundseiten und die Winkel an der kürzeren Grundseite (Abb. 7A, α) zwischen 110° und 130° . Anschließend wurde die Schnittdicke auf $50\ \mu\text{m}$ eingestellt und das Innenohr soweit geschnitten, bis die Cochlea angeschnitten wurde. Alle Zwischenschritte wurden immer wieder unter dem Mikroskop geprüft. An diesem Punkt wurde der Schnittstrecker zum Messer und zum Präparat positioniert werden, um zu verhindern, dass die Schnitte rissen bzw. sich rollten. Sofern dies doch der Fall war, erfolgte entweder eine Säuberung des Messers oder eine Drehung an der Rändelmutter des Schnittstreckers, die den Abstand zwischen Schnittstrecker und Messerklinge bestimmt. Zusätzlich konnten die Winkel des Trapezes variiert werden, um die Qualität der Schnitte zu optimieren. Zum eigentlichen Schneiden der Cochlea wurde die Schnittdicke auf $12\ \mu\text{m}$ eingestellt und ein frischer Bereich des Stahlmessers verwendet. Nach den ersten Schnitten wurde nochmals geprüft und sichergestellt, dass eine flache Positionierung der Schnitte vorlag und dass diese unbeschädigt und stabil auf dem Messer auflagen, um eine erfolgreiche Aufnahme mittels des OT zu gewährleisten. Bei der Länge der Messer (16 cm) ließen sich etwa acht bis zehn Präparate mit einem Messer sauber schneiden. Die Schnitte wurden nun der Reihe nach auf die OT (Abb. 7B) aufgebracht und anschließend in einem OT-Kasten bei -80°C gelagert.

2.6 Herstellen einer Membranpräparation für den Western-Blot

Um ein Lysat von membranständigen Proteinen, wie dem Slack-Protein zu erzeugen, sind hohe Zentrifugalkräfte nötig. Da das Protein im Gehirn hohe Expressionslevel hat (Bhattacharjee et al., 2005), wurde dieses Gewebe zur Lysatgewinnung verwendet. Zunächst wurden dazu je etwa 150 mg Gehirn einer Slack^{+/+}-Maus (P34) und einer Slack^{-/-}-Maus (P29) entnommen und in eiskaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Das Gewebe wurde in je ein 2 ml *Tissue homogenizing CKMix-Tube* überführt und mit ca. 1 ml Lysepuffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, pH 8,0 + Proteinaseinhibitor (PI, 5 Units, Roche)) in einem Minilys Homogenisator (bertin, Montigny-le-Bretonneux) zweimal bei 5000 rpm für 10 s mit je 10 s Pause homogenisiert. Die Suspension wurde bei -80°C für 30 min (mit Beads) eingefroren und anschließend auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension erneut für 10 s bei 5000 rpm lysiert und 5 ml Saccharosepuffer (250 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 + PI) zugeben.

Zum Entfernen der Zelltrümmer und löslicher Proteine wurden nun drei Zentrifugierungsschritte durchgeführt:

Zentrifugation I: 1.000 rcf, 4°C, 20 min

→ Überstand weiterverarbeiten

Zentrifugation II: 1.000 rcf, 4°C, 20 min

→ Überstand weiterverarbeiten

Zentrifugation III: 20.000 rcf, 4°C, 20 min

→ Überstand verwerfen

Das Pellet wurde in 200 µl Saccharosepuffer resuspendiert und im *0,5 ml Tissue homogenizing Kit* – Tube für 10 s bei 3000 rpm gelöst und durchmischt.

Die Proteinmenge der Lysate wurde spektroskopisch durch BCA (Bicinchoninic acid assay, Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher) nach Herstellerangaben bestimmt und 40 µg Proteinlysate zur Gelelektrophorese aufgetragen.

2.7 Proteinbiochemische Methoden zur Validierung von AK-Spezifität

Ein Western-Blot ist eine etablierte Methode, um die Spezifität eines Antikörpers zu testen. Dazu werden Proteine aus dem Gewebe in einem Lysat angereichert, die durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt, auf eine Trägermembran übertragen und über Antikörper nachgewiesen werden.

2.7.1 SDS-Page

Um die Proteine auf einer Membran zu detektieren, werden sie zunächst mittels einer Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) sortiert. Dieser Prozess ist an die Wandergeschwindigkeit der Proteine Richtung Anode im Gel gekoppelt, die durch Größe und Ladung der Proteine bestimmt wird. Die Eigenladung der Proteine wird durch das anionische

Tensid SDS maskiert, sodass letztlich nur die Größe der linearisierten Proteine (Denaturierung bei 95°C für 5 min in 2-Mercaptoethanol (AcrosOrganics, Montreal, 125472500) die Geschwindigkeit definiert.

In einem großporigen 5 % Sammelgel (Tab. 2) werden die Proteine zunächst auf einer Laufhöhe gesammelt um dann durch die elektrische Spannung (120 V) in ein feinporiges 8 % Trenngel (Tab. 2) getrieben zu werden, in dem sich Proteine gleicher Größe als Bande sammeln. Als Größenstandard wurde der Dual Colour Marker (BioRAD, Feldkirchen, 1610374) verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Gele für Western-Blot und SDS-Page.

Pipettierschema für 8 % Trenngel: 2,5 ml Trenngelpuffer: pH 8,8 in H₂O_d		
1,6 M	Tris-HCl (Trizma)	Sigma Aldrich, Darmstadt, T1503
0,4 %	SDS	AcrosOrganics, Montreal, 327315000
2,0 ml	Acrylamid	Sigma Aldrich, Darmstadt, A7168
5,41 ml	H ₂ O _d	
75 µl	Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich, Darmstadt, 248614-56
15 µl	Tetramethylethyldiamin	Sigma Aldrich, Darmstadt, T9281
Pipettierschema für 5 %- Sammelgel: 1,25 ml Sammelgelpuffer: pH 6,8 in H₂O_d		
0,5 M	Tris-HCl	Sigma Aldrich, Darmstadt, T1503
0,4 %	SDS	AcrosOrganics, Montreal, 327315000
0,63 ml	Acrylamid	Sigma Aldrich, Darmstadt, A7168
3,08 ml	H ₂ O _d	
37,5 µl	Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich, Darmstadt, 248614-56
7,5 µl	Tetramethylethyldiamin	Sigma Aldrich, Darmstadt, T9281
Transferpuffer: pH 8.3 in H₂O_d		
20 %	Methanol	Fisher Chemicals, Schwerte, M3950
1 %	SDS	AcrosOrganics, Montreal, 327315000
250 mM	Tris-HCl	Sigma Aldrich, Darmstadt, T1503
1,92 M	Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, R030
Antikörperlösung (AK-Verdünnung in 5 ml 1x PBS)		
1 %	Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Darmstadt, A9418
0,02 %	Natriumacid	Sigma Aldrich, Darmstadt, S8032
TBST-Waschpuffer: pH 7.5 in H₂O_d		
500 mM	Tris-HCl	Sigma Aldrich, Darmstadt, T1503
1,5 M	NaCl	Fisher Chemical, Schwerte, S/3160/60
0,1 %	Tween	Sigma Aldrich, Darmstadt, P1379
Sammelgelpuffer pH 6,8 in H₂O_d		
0,5 M	Tris-HCl	Sigma Aldrich, Darmstadt, T1503
0,4 %	SDS	AcrosOrganics, Montreal, 327315000
Trenngelpuffer pH 8,8 in H₂O_d		

1,6 M	Tris-HCl	Sigma Aldrich, Darmstadt, T1503
0,4 %	SDS	AcrosOrganics, Montreal, 327315000

2.7.2 Western-Blot

Der Transfer der Proteine vom SDS-Page auf eine Nitrozellulose-Membran (Trägermembran; Amersham, 10600016) tritt durch eine elektrische Spannung (350 mA) ein. Diese fließt quer zur Laufrichtung der Proteinbanden. Das „blotten“ oder Übertragen der Proteine erfolgte im Transferpuffer für 90 min bei 4°C. Die Markerbanden wurden auf der Trägermembran nachgezeichnet.

Nach dem Blocken unspezifischer Bindemöglichkeiten der Trägermembran durch Wipp-Schütteln in 5 % Magermilch (Sucofin, DM; in TBST, 60 min; RT), inkubierte selbige über Nacht in einer Antigen-spezifischen Primärantikörperlösung (Tab. 2, Tab. 3) bei 4°C unter Rotation. Nach dem Waschen (3x 10 min; TBST) wurde die Membran in einer Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörperlösung (Tab. 3) für eine Stunde auf dem Wippschüttler bei RT inkubiert.

Tabelle 3: Antikörper im Western-Blot.

Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
PAK			
Slo2.2 (mk)	ms	1:300	NeuroMab, Davis, MABN2463
Slack2 (pk)	rb	1:300	AG Peter Ruth, Tübingen
Slack3 (pk)	rb	1:300	AG Peter Ruth, Tübingen
Serum 1633/1634a (pk)	rb	1:300	AG Martin Jung, Homburg
Serum 1634/1634a (pk)	rb	1:300	AG Martin Jung, Homburg
Serum 1635/1635a (pk)	rb	1:300	AG Martin Jung, Homburg
SAK			
Amersham-ECL Rabbit IgG-HPR	rb	1:25000	Cytiva, Marlborough, NA9340
Amersham-ECL Mouse IgG-HPR	rb	1:5000	Cytiva, Marlborough, NA9310

Nach zweimaligem Waschen (10 min in TBST) sowie einem weiteren 10 min Waschschrift (500 mM Trizma; 1,5 M NaCl) wurde die Membran mittels Chemilumineszenz des Clarity Western ECL-Kit (BioRad, Feldkirchen) im ChemiDoc™ XRS-System entwickelt.

2.8 Proteinbiochemie zur Lokalisation bestimmter Proteine im Corti-Präparat

2.8.1 Immunfluoreszenz

Eine gängige Methode der Lokalisation von Proteinen im Gewebe ist die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung (IF). Bei dieser kann das Target-Protein über eine Kombination eines spezifischen Antigen-Primärantikörper-Komplex (PAK) und eines fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpers (SAK) nachgewiesen werden.

Die einzelnen Inkubationsschritte der Methode erfolgten auf OT in einer feuchten dunklen Kammer in 50 µl Reaktionspuffer (Tab. 4).

Tabelle 4 Verwendete Puffer für immunhistochemische Färbungen für Corti-Präparate.

BSA aus 30 % Stocklösung in PBS		Sigma Aldrich, Darmstadt, A9418
Blockierungs- + Permeabilisierungspuffer (BP) in 1x PBS		
10 %	Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Darmstadt, A9418
0,5 %	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, T8787
Reaktionspuffer (RP I) in 1x PBS		
1 %	Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Darmstadt, A9418
0,1 %	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, T8787
Waschpuffer (WP I) in 1x PBS		
0,1 %	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, T8787

Zunächst wurde das CP nach der Fixierung in kaltes PBS überführt, das dann durch den BP (Tab. 4) ausgetauscht wurde, worin es eine Stunde bei 4°C verblieb. Der BP permeabilisierte das CP, indem die Zellmembranen durch das Detergens aufgebrochen werden. Zudem maskierte BSA im Puffer alle potentiellen Bindungsstellen reversibel. So können die AKs intrazellulär an spezifische Epitope binden. Dazu inkubierten die CP in PAK-Reaktionspuffer (Tab. 4) mit bestimmten AK-Konzentrationen (Tab. 5) entweder für 90 min oder für 14-16 Stunden bei 4°C. Nach zweimal 10 min Waschschritten (WP I; Tab. 4) wurde der sekundäre Antikörper (in RP I, Tab. 4, Tab. 5) für 70 min bei RT inkubiert und erneut gewaschen (2x 5 min WP I). Dem SAK-RP I wurde noch zusätzlich DAPI und/oder Phalloidin-405 hinzugefügt und vor der Inkubation für 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5424 R). Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen mitgeführt. Dafür wurden CP in der Zeit der Inkubation des PAK in PBS gelagert, erhielten aber die SAK-Lösung mit DAPI. Damit ließ sich testen, ob und wo die SAK-Lösung

unspezifische IF-Signale im CP erzeugt. Die CPs wurden mit 13-20 µl Vectashield® Vibrance™ eingedeckt und bei 4°C gelagert.

Die IF für 1 % - PFA fixierte CP wurden analog zum oben beschriebenen durchgeführt, jedoch wurden alle Puffer statt mit PBS mit B49 angesetzt.

Tabelle 5: Verwendete Materialien für Immunfloreszenz-Markierungen.

Antikörper			
Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
PAK			
CtBP2 (mk)	ms	1:500	BD Biosciences, San Jose, 612044
CtBP2 (pk)	gp	1:1000	Synaptic Systems, Göttingen, 192104
Homer1 (pk)	rb	1:1000	Synaptic Systems, Göttingen, 160003
Neurofilament H (pk)	ck	1:100	Synaptic Systems, Göttingen, 171106
PSD95 (mk)	ms	1:500	NeuroMab, Davis, 449-1AK-71
Slo2.2 (mk)	ms	1:50	NeuroMab, Davis, MABN2463
SAK			
Anit-ck-AF647	g	1:500	Invitrogen, Eugene, 2186435
Anit-rb-AF647	d	1:500	Invitrogen, Eugene, 2181018
Anti-gp-AF488	g	1:500	Alliquot AG Kirchhoff
Anti-ms-AF488	d	1:500	Invitrogen, Eugene, A21202
Anti-ms-AF568	g	1:500	Invitrogen, Eugene, A11019
Anti-rb-Cy3	g	1:1500	Jackson ImmunoResearch Lab, Ely, 1116652
Phalloidin-FluoProbes® 405		1:100	INTERCHIM, Montluçon, CA9870
Chemikalien			
Bovines Serum Albumin (BSA)			Sigma-Aldrich, Darmstadt, A3912-106
DAPI		1:333	Sigma-Aldrich, Darmstadt, D9542
Triton™ X-100			Sigma-Aldrich, Darmstadt, T8787
Vectashield® Vibrance™			Vector Laboratories, Burlingame, H-1700

2.8.2 LacZ-Färbung

Das LacZ-Gen, welches für die Synthese des Enzyms β -Galactosidase codiert, wird als Reportersystem in Mausmodellen genutzt. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid,) eine farblose Indikatorsubstanz, wird durch β -Galactosidase unter Bildung des blauen 5-Brom-4-chlorindigos gespalten. Diese zelluläre Blaufärbung erfolgt dort, wo das LacZ-Gen unter dem Promotor des eigentlichen Gens aktiviert wurde. So ist ein indirekter Rückschluss auf die Aktivität des ersetzten Gens zulässig. In dieser Arbeit wurde die Expression von Cldn12 anhand der LacZ-Expression im Corti-Organ der Maus untersucht.

Nachdem ein CP nach Protokoll präpariert war, erfolgten alle Inkubationsschritte in einem Objektträger mit Hohlschliff in einer feuchten Kammer bei 37°C. So konnte ein Reaktionsvolumen von ca. 200 µl über die Reaktionszeit aufrechterhalten bleiben.

Tabelle 6: Materialliste für X-Gal-Färbung für Corti-Präparate.

Lösungen			
Fixierlösung I in 1x PBS			
4 %	PFA	Thermo Scientific, Braunschweig, 28908	
0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (PB) pH 7,3			
	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Darmstadt, S7907	
	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Darmstadt, S8282	
Fixierlösung II in 0,1 M PB pH 7,3			
2,2 %	Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Darmstadt, G7651	
5 mM	EGTA	Honeywell, Charlotte, 03779	
2 mM	MgCl ₂	Calbiochem, San Diego, 442611	
Waschpuffer (WP II) in 0,1M PBS pH 7,3			
0,02 %	Igepal® CA-630	Sigma-Aldrich, Darmstadt, 18896	
0,01 %	Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich, Darmstadt, D6750	
2 mM	MgCl ₂	Calbiochem, San Diego, 442611	
Färbepuffer pH 7,3			
0,02 %	Igepal	Sigma-Aldrich, Darmstadt, 18896	
0,01 %	Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich, Darmstadt, D6750	
2 mM	MgCl ₂	Calbiochem, San Diego, 442611	
5 mM	K ₃ Fe(CN) ₆	Sigma-Aldrich, Darmstadt, P8131	
5 mM	K ₄ Fe(CN) ₆	Sigma-Aldrich, Darmstadt, P9787	
X-Gal Stocklösung: 25 mg/ml in Dimethylformamide			
1 mg/ml	X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim, 03117073001	
Antikörper			
Antigen	Wirt	Verdünnung	
PAK			
Calbindin D-28k (pk)	rb	1:500	Swant, Marly, CB38
SAK			
Cy3 anti-rb	g	1:500	Jackson Immuno Research, Ely, 1116652
Phalloidin-i Fluor™ 488		1:100	Invitrogen, Eugene, A12379
Chemikalien			
	DAPI	1:100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, D9542
	Dimethylformamide (DMF)		Sigma-Aldrich, Darmstadt, PHR-1553
	DAKO®		Agilent Technologies, Santa Clara, S3023

Im ersten Schritt wurden der Färbepuffer und die X-Gal-Stammlösung (Tab. 6) auf 37°C vorgewärmt und dann zügig in einem Verhältnis 40:1 gemischt. Die CP verbrachten unterschiedlich lange (30 min - 3 h) in unterschiedlichen Färbelösungen. Es wurden immer Cldn12^{+/+}-Gewebe und Cldn12^{-/-}-Gewebe parallel inkubiert, um herauszufinden, ab wann bei transgenen CP eine Färbereaktion einsetzte, der Wildtyp aber noch keine unspezifische Hintergrundfärbung zeigte.

Nach erfolgreicher Dokumentation der LacZ-Färbung im CP folgte anschließend eine IF-Färbung zur Analyse der subzellulären Lokalisation der LacZ-Expression. Anschließend wurden die CP, die das Protokoll der LacZ-Färbung durchlaufen hatten, in 3 % BSA mit 0,1 % TritonX-100 (in PBS; RP II; Tab. 6) für 2,5 Stunden geblockt. Daraufhin erfolgte die PAK-Inkubation in RP II für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Dann musste dreimal im WP II (Tab. 6) für 5 min gewaschen werden. Die Inkubation des SAK (+ DAPI) in RP II erfolgte ebenfalls für 2 Stunden bei RT. Nach erneutem dreifachem Waschen in WP II für 5 min wurden die CP mit DAKO eingedeckelt.

2.9 Nachweis von mRNA in Gefrierschnitten

Die Methode des RNAscope® Fluorescent Multiplex Assay (ACD biotechne, 320850) ist eine *in situ* Hybridisierung von mRNA-Molekülen. Dabei werden die Target-Hybridisierungsmoleküle (*probes*) an sogenannte Kanäle (*channels*, C) gebunden, die im letzten Amplifizierungsschritt an bestimmte Fluorophore gekoppelt werden.

OT mit den Gefrierschnitten (Kapitel 2.4) konnten für diese Methode bis zu drei Monate bei -80°C gelagert werden. Für jeden Ansatz wurden Schnitte von drei Wildtyp-Cochleae mit drei Slack^{-/-}-Cochleae parallel mit einer Positiv-Kontrolle und einer Negativ-Kontrolle verwendet. Bei der Positiv-Kontrolle wurden drei ubiquitäre mRNAs mit unterschiedlicher Expressionsstärke detektiert. Die *Ready-To-Use-Mixtur* beinhaltet *probes* gegen *polr2a* (RNA Polymerase II A, niedrige Expression an C1 gebunden), *ppib* (Peptidylprolyl-Isomerase B, moderate Expression an C2 gebunden) und *ubc* (Ubiquitin C, hohe Expression an C3 gebunden). Die Negativ-Kontrolle war spezifisch für mRNA eines Bakteriengens (*dapb*, Dihydrodipicolinate Reduktase, an C1-C3 gebunden), die nicht in den Gewebeproben zu detektieren sein sollten.

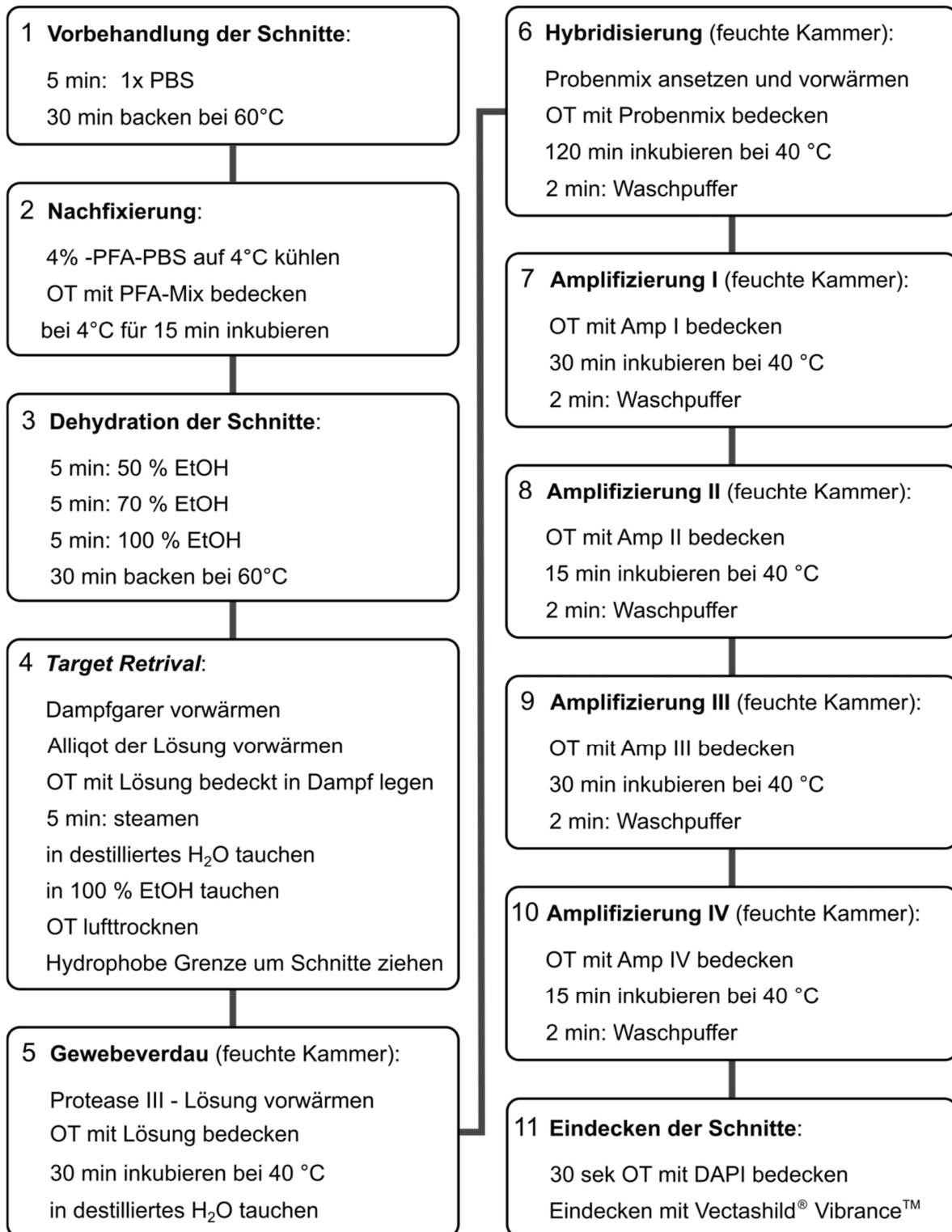


Abbildung 8: Arbeitsschritte der RNAScope®-Methode in Gefrierschnitten der Cochlea.

Methode variiert nach Herstellerangaben von ACD Biotechnie für fixiertes, gefrorenes Gewebe. Amp: Amplifikationslösung.

Die OT wurden nach dem Protokoll in Abbildung 8 behandelt. Nachdem die Schnitte aus dem Tiefkühler entnommen wurden, wurden sie bei RT akklimatisiert und in PBS gewaschen (Abb. 8; 1), um die Rückstände vom Tissue-TEK® zu entfernen. Für alle Waschschrte (Abb. 8; 1, 6-10) und die Dehydrierung (Abb. 8; 3) wurden die OT in einen gläsernen Färbereinsatz mit Drahtbügel (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, 4200005) gestellt. Dieser wurde dann wiederholt (ca. 1-mal pro s) über den angegebenen Zeitraum in die passende Glasfärbekammer (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, 4200005) getaucht. Die Vorbehandlung der Schnitte wurde mit einem Backschritt abgeschlossen, um die Gewebeschnitte auf dem OT zu fixieren. Der nächste Arbeitsschritt (Abb. 8; 2), die Nachfixierung mit 4 %-PFA, diente ebenfalls der Optimierung des Gewebeerhalts. Für die Dehydrierung (Abb. 8; 3) wurde je eine Glasfärbekammer mit den unterschiedlich konzentrierten Alkohollösung gefüllt und die OT wie in den Waschschrten in die Flüssigkeit getaucht. Es zeigte sich bei der Etablierung, dass die Cochlea-Schnitte einen zusätzlichen Backschritt benötigten, um den Erhalt des Gewebes auf den OT zu verbessern. Während dessen wurde der Dampfger (Aigostar Fitfoodie Steel 30INA) aufgebaut und das Gerät und ein Aliquot der *Target Retrieval*®-Lösung vorgewärmt (Abb. 8; 4). Die OT wurden direkt in den Dampf gelegt, mit der Lösung bedeckt und für 5 min inkubiert. Nach dem einmaligen Eintauchen in Wasser und Ethanol konnten die OT trocknen und die Schnitte für die weiteren Schritte mit einem Immuno-Pen umkreist werden. Nach dem Trocknen erfolgte der Verdau des Gewebes (Abb. 8; 5) in einer vorgewärmten feuchten Kammer bei 40°C. Dazu wurde die Protease III®-Lösung verwendet. Die feuchte Kammer wurde in der Zeit der Arbeitsschrte 5-10 immer wieder in den Ofen (40°C) gestellt, damit die Inkubationstemperatur schneller erreicht werden konnte, nachdem die OTs wieder hineingelegt wurden. Die Volumina der einzelnen Amplifikations-Lösungen (Abb. 8; 6-10) wurden so gewählt (zwischen 130 und 180 µl), dass alle Schnitte bedeckt waren und auch bei der Erhitzung auf 40°C während der kompletten Inkubationszeit bedeckt blieben. Trotzdem sollten keine unnötig großen Mengen der Flüssigkeiten eingesetzt werden. Das war vor allem bei der Verwendung der *probes* bei der Hybridisierung wichtig. Bei der Hybridisierung sollten die mRNA der Target-Gene gebunden werden. Neben den Kontroll-mRNA, wurden die mRNA für *kcnt1* (SLACK auf C2), *calb2* (Calbindin2, SGN Typ1 auf C3) und *th* (Tyrosinhydroxylase, SGN Typ2 auf C1) untersucht. Bei der Hybridisierung wurden 150-180 µl pro OT verwendet. Für die Waschschrte mussten die OT wieder in die Färbereinsätze gestellt werden. Nach der Hälfte der Waschzeit wurde der Färbereinsatz von einer ersten mit Waschpuffer gefüllten Waschkammer in eine zweite mit Waschpuffer gefüllte Waschkammer überführt, um das Ergebnis zu optimieren. Nach den Schritten, in denen die OT komplett in die Lösungen getaucht wurden, wurden sie nach der Inkubation vorsichtig von Flüssigkeitsrückständen befreit, bevor der nächste Arbeitsschritt erfolgte. Die Fluorophore wurden

im letzten Amplifizierungsschritt (Abb. 8; 10) festgelegt. Zur Etablierung wurden verschiedene Kopplungen ausprobiert. Zuletzt wurde C1 mit Alexa 488, C2 mit Atto 550 und C3 mit Atto 647 verbunden. Vor der Analyse an Mikroskop mussten die Schnitte nach dem Eindecken mit 20 μ l Vectashield® Vibrance™ (Abb. 8 11) inkubieren. Als optimal für das Fluoreszenzsignal erwies sich eine Inkubationszeit von mindestens vier Stunden, so dass die OTs über Nacht bei 4°C zwischengelagert wurden. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen LSM710.

2.10 Elektrophysiologische Methoden

Um die Auswirkungen bestimmter Proteine auf das Hören von Mäusen zu charakterisieren, wurden neben molekularbiologischen und biochemischen Methoden in dieser Arbeit auch elektrophysiologische Messungen und Analysen durchgeführt. Neben Hirnstammaudiometrie (ABR-Messung, *auditory brainstem response*) wurden Schalltraumata durchgeführt, um sowohl das normale Hörvermögen, als auch das herausgeforderte Hörsystem zu untersuchen. Dabei wurde nicht nur die Schwere des Schadens, welches durch das Trauma verursacht wurde, sondern auch die Regeneration vier Wochen danach untersucht. Die Veränderung des Audiogramms, die sich bei einer Schwerhörigkeit gegenüber normalem Hören zeigt, wird als *threshold shift* bezeichnet, also einer Erhöhung der Hörschwellen. Wenn dieser nur von begrenzter Zeit (7 - 14 Tage) ist und sich vollständig erholt, spricht man von einem *temporary threshold shift* (TTS). Eine Schwellenerhöhung, die noch nach 14 Tagen besteht, bezeichnet einen *permanent threshold shift* (PTS; Abb.9).

Vor eigenen elektrophysiologischen Messungen der Slack^{-/-}-Mäuse wurden erste Hörmessdaten in der HNO-Universitätsklinik Homburg von Dipl.-Ing. Dr. Dietmar Hecker und Dr. Katharina Sorg erhoben. Hierbei wurden Distorsionsprodukt otoakustische Emissionen (DPOAE) und Klick-ABR an 15 Wochen alten Tiere des gleichen genetischen Hintergrunds gemessen.

2.10.1 DPOAEs

In der Cochlea werden akustischen Signale durch die Elektromotilität der ÄHZ verstärkt. Otoakustische Emissionen (OAE) sind Signale, die nach akustischer Stimulation in der Cochlea entstehen und ein Maß für das Funktionieren des Verstärkermechanismus sind. Damit sind diese Messungen indirekt eine Kenngröße für die Gesundheit der ÄHZ (Kemp, 2002). Um DPOAEs zu messen, werden parallel zwei Sinustöne mit den Frequenzen f_1 und f_2 präsentiert, woraufhin Verzerrungsprodukte entstehen, wobei das Signal bei $2*f_1 - f_2$ am größten ist und gemessen wird. Die Stimulationsfrequenzen hatten ein Verhältnis von $f_2 = 1.2*f_1$ (mit $Lf_1 = 55$ dB SPL und $Lf_2 = 45$

dB SPL, bei 10 bis 16 kHz, Mittelung von 0.5 kHz-Schritten (Hecker et al., 2011; Schimmang et al., 2003).

2.10.2 Hirnstammaudiometrie und Schalltrauma

Ein akustisches evoziertes Signal, das vom gesunden Ohr empfangen wird, löst eine Reihe von messbaren neuronalen Potentialen entlang der Hörbahn aus. Bei dieser Methode werden die Potentialdifferenzen zwischen zwei Ableitelektroden erfasst. Die Intensität einer Ableitung über dessen Zeitverlauf hat ein charakteristisches Muster – die sogenannten ABR-Wellen - deren gemittelte Ableitung den Knotenpunkten der auditorischen Verarbeitung zugeordnet ist. Die Amplitude entspricht der Intensität der neuronalen Signale und die Latenz den Verarbeitungs- und Laufzeiten. Amplituden und Latenzen sind durch den Schallpegel und die Frequenz des akustischen Signals bestimmt. Durch die Präsentation verschiedener Frequenzen und Schalldrücke entsteht ein frequenzspezifisches Audiogramm des jeweilig gemessenen Ohres. Dieses ermöglicht im Anschluss die Bestimmung von Hörschwellen und Analyse der Wachstumskurven von Amplituden und Latenzen.

2.10.3 Versuchsplanung

Die Versuchsgruppen für das milde und das moderate Schalltrauma wurden so geplant, dass acht Wildtypen und acht Slack^{-/-}-Mäuse das gleiche Trauma erhielten. Dabei wurde auf ein Gleichgewicht an Geschlechtern geachtet und darauf, dass die Tiere an Tag -2 möglichst genau acht Wochen alt waren (Tab. 7).

Tabelle 7: Übersicht über die Versuchstiere in den verschiedenen Versuchsgruppen.

Slack Trauma	Tag	Sex (m,w) /Ohren		Alter (Tage)		Gewicht (g)	
		WT	KO	WT	KO	WT	KO
100 dB	-2	4,4 / 16	4,4 / 16	55,0 ± 0,9	54,8 ± 0,6	19,6 ± 2,8	21,2 ± 2,1
	28	4,4 / 16	4,4 / 16	84,6 ± 0,5	84,8 ± 0,4	22,9 ± 3,0	23,8 ± 1,8
106 dB	-2	4,4 / 16	4,4 / 16	55,3 ± 0,7	55,0 ± 0,0	21,8 ± 3,1	18,6 ± 1,8
	28	4,4 / 16	4,4 / 16	85,4 ± 0,7	85,0 ± 0,0	25,2 ± 3,4	22,4 ± 1,8
Kontrollen	-2	2,5 / 14	0,7 / 14	55,0 ± 3,4	58,0 ± 7,3	20,9 ± 3,2	17,6 ± 1,4
	28	2,5 / 14	0,7 / 13*	79,6 ± 3,8	87,2 ± 4,4	23,5 ± 4,8	20,3 ± 3,3
Cldn12	-2	4,4 / 16	4,4 / 16	56,0 ± 1,0	53,3 ± 1,1	23,6 ± 2,4	23,2 ± 3,3

* einem Tier konnte aufgrund technischer Probleme nur ein Ohr gemessen werden

Die nach diesen Kriterien für den Versuch ausgesuchten Tiere wurden drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn vom Zuchtraum in einen Rückläuferraum umgezogen. In diesem gelten niedrigere Hygienestandards, so dass der Zugang für geschultes wissenschaftliches Personal

möglich war. So hatten die Versuchstiere die Möglichkeit, sich an einen neuen Käfig und eventuell neue Mäuse in der Gruppe zu gewöhnen. Weibliche Mäuse wurden mit bis zu vier Tieren in einem Käfig zusammengesetzt, sofern die individuellen Ohrmarkierungen gut zu unterscheiden waren. Um das Stresslevel der männlichen Versuchstiere möglichst niedrig zu halten, wurden maximal zwei Böcke zusammen gehalten, sofern sie Wurfgeschwister waren; ansonsten blieben sie in Einzelkäfigen.

Es gab pro Trauma acht Tiere pro Genotyp (Tab. 7). Der zeitliche Ablauf der ABR-Messungen und der Applikation des Schalltraumas für Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-Mäuse sind in Abb. 9 dargestellt. Innerhalb einer Genotypengruppe gab es vier Tiere pro Geschlecht. Diese Versuchsanforderung konnte für die Kontrolltiere (ohne Trauma) nicht aufrechterhalten werden. Die Kontrolltiere erhielten nur am Tag -2 eine initiale ABR-Messung und dann vier Wochen später an Tag 28 (Abb. 9), um einen möglichen Altersprozess bewerten zu können, der innerhalb der Messreihe einen Einfluss haben könnte. Auf den Tierschutz achtend, wurden nur sieben Mäuse verwendet, um das Mindestmaß an stochastisch notwendiger Gruppengröße zu haben. Für Kontrollmessungen der Slack^{-/-}-Tiere waren nur Weibchen vorhanden. Zur Vervollständigung der Rohdaten der WT-Kontrolltieren wurde zuzüglich zu den von mir gemessenen Tieren auf Messdaten von 2 WT-Tieren zurückgegriffen, die von P. Derleder erhoben wurden. Diese Rohdaten wurden von mir neu ausgewertet.

Zur Ermittlung des Hörvermögens von Cldn12^{+/+}- und Cldn12^{-/-}-Tieren wurde je Ohr eine Klick- und eine frequenzspezifische ABR-Messung im Alter von acht Wochen durchgeführt, ohne Trauma und ohne weitere Analyse der Amplituden und Latenzen.

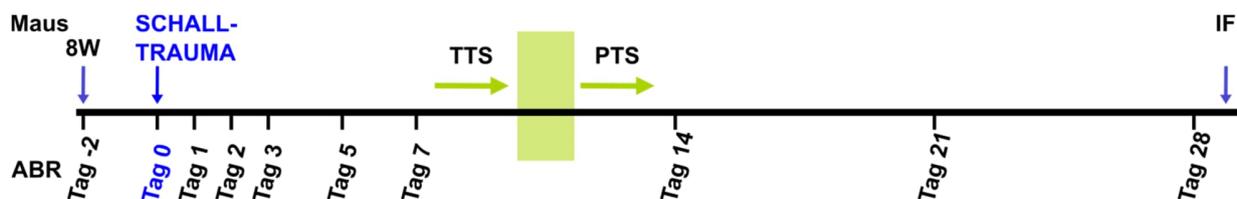


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Messreihenfolge von ABR-Messungen mit Schalltrauma.

Die TTS geht zwischen Tag 7 und Tag 14 in PTS über (grün) Die Versuchstiere, die einem Schalltrauma unterzogen wurden, erhielten innerhalb von 30 Tagen zehnmals eine ABR-Messung. Es gab immer eine initiale ABR-Messung (Tag -2), um den normalen Hörzustand der Versuchstiere zu erfassen. Zur Erholung der Tiere nach der ersten Narkose lagen zwei Tage zwischen der ersten Messung und dem eigentlichen Schalltrauma (Tag 0). Anschließend wurde engmaschig (Tag 1-3 und Tag 5) die Hörleistung der Versuchstiere bis zum Messtag 7 (Tag7) nach Trauma erfasst. Anschließend wurde wochenweise gemessen (Tag 14, Tag 21 und Tag 28). Nach der Messung an Tag 28 wurden die Mäuse in Narkose für die Histologie getötet (maximal einen Tag später) und mittels Immunfluoreszenzanalyse (IF) weiter untersucht.

2.11 Ablauf der ABR-Messungen und Schalltrauma

Am Versuchstag wurden die Mäuse im Käfig vom Rückläuferraum in den Versuchsraum getragen und dort zur Seite gestellt. Die Versuchstiere bekamen Rotlicht, damit die Mäuse möglichst entspannt in den Versuch gehen konnten. Währenddessen wurde das Mess-Setup hochgefahren und die Narkose vorbereitet.

2.11.1 Vollantagonisierbare Narkose

Versuchstaugliche Mäuse erhielten für die ABR-Messungen und das Schalltrauma eine vollantagonisierbare Narkose, wobei pro 1 g Körpergewicht der Maus, 0,01 ml Narkose/Antidot verabreicht werden musste. Dieses Verfahren fördert ein schnelleres Aufwachen der Tiere nach dem Versuch.

Für die Dosierung der Narkose wurde eine Medikamentenmischung in Natriumchloridlösung (0,9 %) und wie folgt in $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht angesetzt (Deichelbohrer et al., 2017): Fentanyl: 0,05 mg (Hamel Pharma Plus GmbH, Hameln); Midazolam: 5 mg (Hamel Pharma Plus GmbH, Hameln); Medetomidin: 0,5 mg (Orion Corporation, Espoo, Finland). Ansatz der Narkose in 20 ml; als Aliquot von je 1,5 ml bei -20°C gelagert (für drei Monate verwendbar).

Die Narkose wurde intraperitoneal verabreicht. Nach der Injektion wurden die Mäuse in eine abgedunkelte Box mit einem Papphäuschen gesetzt und eine Zeiterfassungsuhr gestartet. Nach ca. 8 min war bei den meisten Mäusen die Wirkung der Narkose so tief, dass der Zwischenzehen-Schmerzreflex ausgeschaltet war. Die Narkosedauer ohne Antidot-Gabe war maximal ca. 75 min, wobei individuelle Unterschiede zu beobachten waren. Im Falle einer unzureichenden Narkose nach 15 min wurde ein Drittel der ursprünglichen Narkosemenge nachgespritzt. Die Elektroden wurden erst bei der vollständig narkotisierten Maus gelegt.

Nach dem Versuch wurde das Antidot subkutan verabreicht und die Maus zum Aufwachen unter Rotlichtbestrahlung zurück in den Käfig gelegt.

Für die Dosierung des Antidots wurde die Medikamentenmischung ebenfalls in Natriumchloridlösung (0,9 %) und wie folgt in $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht angesetzt (Deichelbohrer et al., 2017): Naloxon: 1,2 mg (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg); Flumazenil: 0,5 mg (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg); Atipamezol: 2,5 mg (Orion Corporation, Espoo, Finland). Ansatz des Antidots in 10 ml; als Aliquot von je 1,5 ml bei -20°C gelagert (für drei Monate verwendbar).

Bei einem Käfig mit mehreren Versuchstieren wurde etwa ab Minute 36 der laufenden Narkosezeit die nachfolgende Maus narkotisiert. Dieses Tier war in der Regel tief narkotisiert, wenn die

Messung bei der vorherigen Maus fertig war. Ein routinemäßiges ABR-Experiment hatte eine Narkosedauer von etwa 45 min pro Maus bis zur Gabe des Antidots. Zur Stressreduktion bereits gemessener Mäuse wurden diese allein in einen gesonderten Aufwach-Käfig gelegt, bis sie soweit wach waren, um den anderen Tieren wenn notwendig ausweichen zu können. Nach wenigen Minuten nach der Antidot-Gabe bewegten sich die Mäuse wieder im Käfig.

Zeigte eine Maus Probleme mit den Folgen der Narkose/Antidot, das heißt das Tier wurde nicht innerhalb von ca. 15 min weitgehend munter, wurde ein kleines Depot (max. die Hälfte der Narkosemenge) Natriumchloridlösung (0,9 %) subkutan verabreicht. Zusätzlich wurde das Tier engmaschig kontrolliert, und unter Umständen auch die Tierpfleger hinzugezogen. Nach den langen Narkosezeiten durch das Schalltrauma bekamen alle Mäuse Erdnussbutter als hochkalorischen Futtersnack angeboten, um die Futterraufnahme zu stimulieren und den Narkoseabbau zu fördern.

2.11.2 Scoresheet

Während der Messreihe wurden die Mäuse auf Stressverhalten und Gewichtsverlust überwacht, und die Ergebnisse in *Scoresheets* festgehalten. Innerhalb dieser Versuchsreihe musste keine Maus nach den Kriterien des Tierschutzes getötet werden, weil sie erhöhte Stresssymptome aufwies. Nach dem Schalltrauma gab es bei fast allen Tieren einen relativen Gewichtsverlust, der aber geringer als 10 % des Ausgangsgewichts war. Alle Mäuse hatten im Laufe der Messreihe von vier Wochen Gewicht gewonnen und blieben handzahn. Während der Narkose beziehungsweise während der Messungen wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte (37°C) gelegt, und nach der Antidot-Gabe mit Rotlicht bestrahlt, um den Kreislauf der Tiere zu unterstützen und einer Auskühlung vorzubeugen.

2.11.3 Vorbereitungen der ABR-Messung

Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde dem narkotisierten Versuchstier Augencreme (Bepanthen®, Bayer AG, Leverkusen) aufgetragen. Die Maus wurde anschließend in die schallisolierte Versuchsbox auf eine Wärmeplatte (37°C) gelegt und die Elektroden (Silberdraht Durchmesser: 0,25 mm 99,99%, Good Fellow, Hamburg) subkutan platziert. Dies geschah, indem eine Kanüle an der Stirn (Vertex) durch eine Hautfalte gestochen wurde. Im Anschluss daran musste der Elektrodendraht gegenläufig in die Kanüle gefädelt und die Kanüle anschließend entfernt werden. Ebenso wurde am Ohr auf Höhe des Mastoids verfahren. Zwischen diesen beiden Elektroden verrechnet der Computer die gemessenen Potentiale als differentielle Ableitung. Bei der oben beschrieben über der Schwanzwurzel gesetzten Elektrode handelt es sich

um eine Referenz-Elektrode. Über diese wurden alle elektrischen Potentiale, die im Körper entstehen, herausgerechnet, etwa Herzschlag, Atmung oder Muskel-kontraktionen. Liegen alle drei Elektroden ohne ein großes Hintergrundrauschen, so erscheint auf dem Oszilloskop (DS 1054, Rigol Technologies, Peking) eine charakteristische Gesamt-Ableitung, mithilfe derer sich zusätzlich zu den akustisch evozierten Ableitungen auch der Herzschlag und die Atmung der Tiere überprüfen lassen (Abb. 10; Signal der Ableitung auf dem Oszilloskop (gelb)).

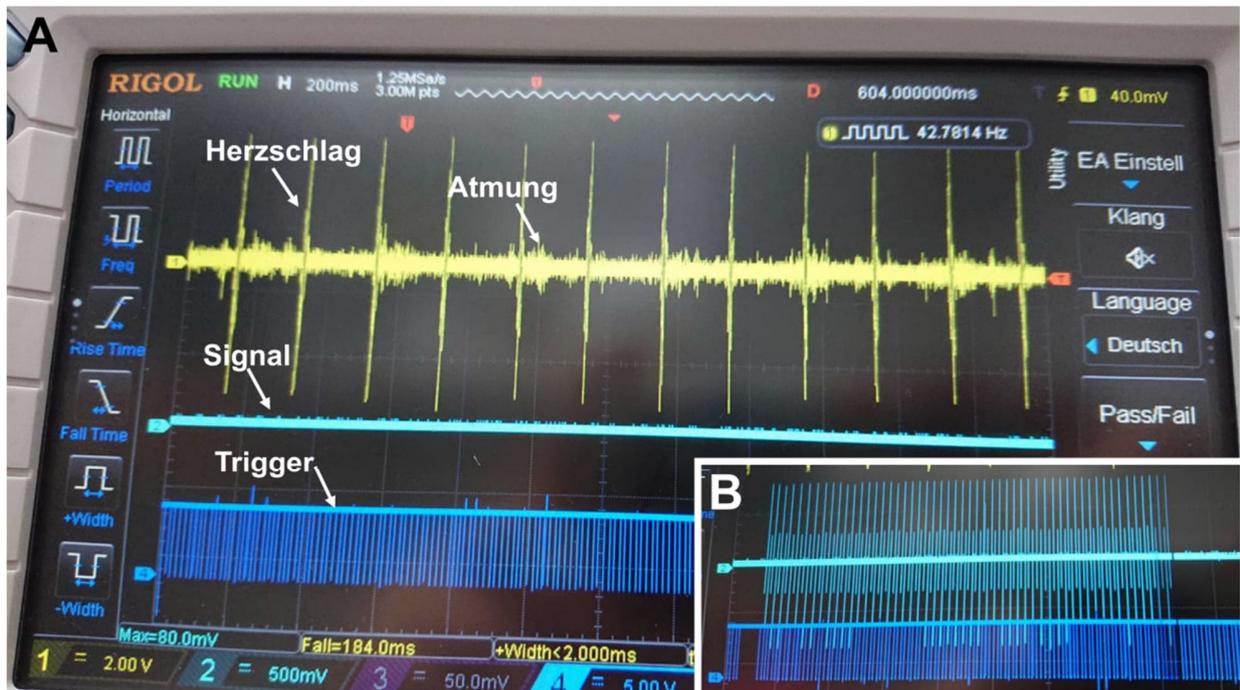


Abbildung 10: Übersicht der Anzeigen auf dem Oszilloskop während einer Ableitung.

A, Kanal 1 (gelb) zeigt die Gesamtableitung mit Herzschlag und Atmung. Auf Kanal 2 (hellblau) werden emittierte akustischen Stimuli angezeigt, je lauter umso höher ist die Amplitude (**B**). In **A** sieht man das elektronische Signal eines leisen Stimulus, während in Teilabbildung **B** ein lautes, hochfrequentes Signal appliziert wird. Kanal 4 zeigt den Trigger, also den Start jedes Tonereignisses (Stimulus).

Im nächsten Schritt wurde die Maus mit ausgestrecktem Körper auf der Wärmeplatte vor einen Breitband-Lautsprecher positioniert, die Nasenspitze etwa einen Zentimeter entfernt vom Lautsprecher. Das Kalibrierungs-Mikrofon wurde im 45 Grad Winkel zum Lautsprecher mit circa einen Zentimeter Abstand neben das zu messende Ohr der Maus platziert (Abb. 11) und die Versuchsbox verschlossen (Technische Details siehe Kap. 2.11.4). Gemäß der Messroutine wird immer erst das rechte Ohr einer Maus, dann das linke gemessen und entsprechend protokolliert.

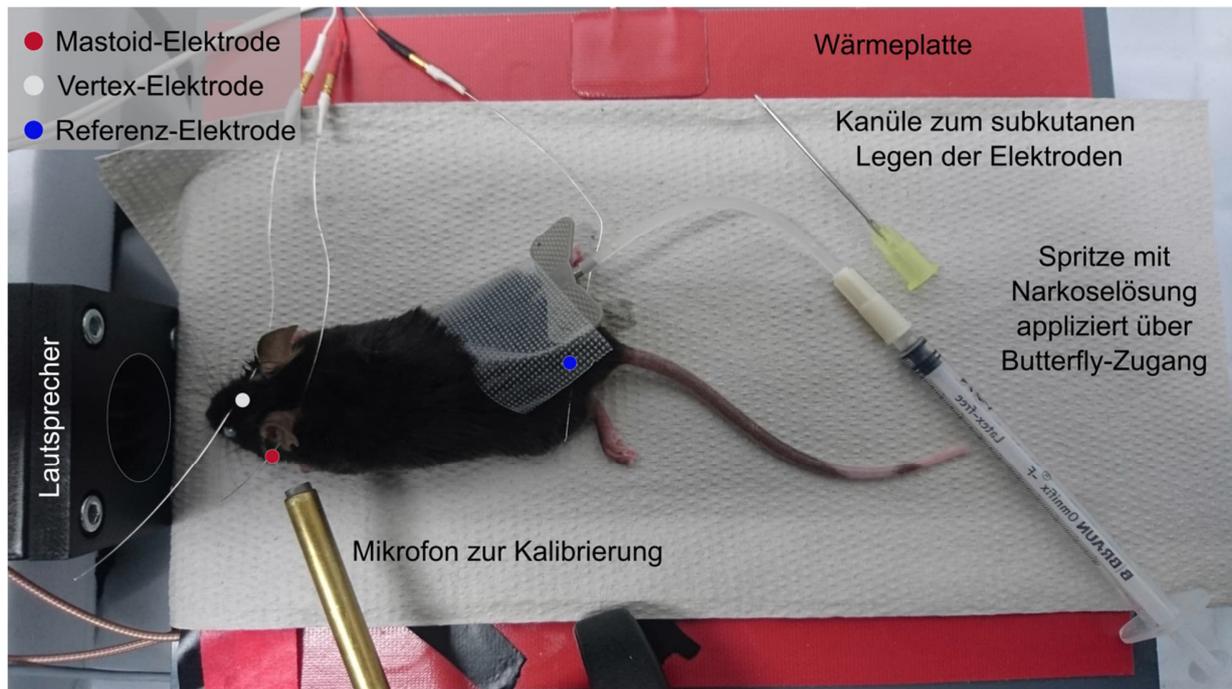


Abbildung 11: Versuchssituation zur ABR-Messung einer Maus.

Das narkotisierte Versuchstier (hier nach der Vertäubung) liegt auf einem Papiertuch auf einer warmen Wärmeplatte, mit der Nasenspitze in Richtung des Lautsprechers in der schallisolierten Versuchsbox. Die Elektrode (roter Punkt) liegt subkutan am linken Ohr oberhalb des Mastoids, die Vertex-Elektrode (weißer Punkt) an der Stirn und die Referenz-Elektrode (blauer Punkt) unter der Haut oberhalb der Schwanzwurzel.

2.11.4 Das Mess-Setup

Das Mess-Setup wurde über das Programm AudiologyLab gesteuert (OTOCONSULT, Frankfurt am Main). Es konnte sowohl Töne mit einer gewünschten Frequenz einer bestimmten Lautstärke erzeugen und präsentieren (Stimulus), als auch die akustisch evozierten elektrischen Potentiale messen und darstellen. Dafür wurde ein Stimulus aus dem Computer durch einen 16bit-, 125 MS/s-, D/A- A/D-Wandler (PCIe-6351, National Instruments, Austin, Texas, USA) in ein analoges Signal umgewandelt. Modifikationen dieses Signals erfolgten über einen Verstärker (OTOCONSULT, Frankfurt am Main), der den Stimulus verstärkt und entsprechend abschwächt wurde. Diese Signale erreichten sowohl das Oszilloskop (Abb. 10, Stimuli und Trigger), als auch den Breitband-Lautsprecher (AS04004PR-R, PUI Audio, Dayton, Ohio, USA). Die hier generierten akustischen Stimuli erreichten die Ohren der Maus, sowie das beige stellte Mikrofon zur Kalibrierung (Sennheiser KE4, Sennheiser, Wedemark-Wennebostel). Die durch das Mikrofon aufgenommenen Stimuli gelangten über Signalverteiler (OTOCONSULT, Frankfurt am Main) zurück zum D/A- A/D-Wandler, welcher das Signal von analog zu digital wandelte. Diese Rückkoppelung von Signalen diente der Kalibrierung des Systems. Dadurch konnten Töne

verschiedener Frequenzen mit gleicher Lautstärke präsentiert werden. Diese Kalibrierung führte das System im Programm vor jeder Messung aus.

Die durch die Elektroden erfassten Potentiale wurden an einem Differenzverstärker (OTOCONSULT, Frankfurt am Main) vertausendfacht, um aus dem Nanovolt (nV)-Bereich in den Mikrovolt (μV)-Bereich zu wechseln. Diese Signale wurden an einen Bandpassfilter, der sowohl Frequenzen unter 0,2 kHz und über 5 kHz entfernte als auch die gemessene elektrische Spannung um den Faktor 1000 in den Millivolt-Bereich verstärkte, gefiltert. Der D/A-A/D-Wandler wandelte dieses gefilterte, verstärkte, analoge Signal in ein digitales, vom Computer lesbares Signal, welches für die spätere Datenauswertung (Audiogramme) gespeichert wurde.

2.11.5 Akustische Stimuli für die ABR-Messung

Bei einer Messung von Klick-ABR-Signalen wurde als Stimulus ein Frequenzband zwischen 2 kHz und 46 kHz präsentiert. Bei einem Vergleich mit der Frequenzkarte der Maus-Cochlea (Abb. 14) ist zu erkennen, dass dadurch fast die gesamte Hörschnecke angeregt wird. Im Gegensatz dazu wurden bei einer Messung einer frequenzspezifischen ABR (f-ABR) mit Reintönen nur bestimmte Bereiche der Cochlea aktiviert. Somit sind Aussagen über unterschiedliche cochleären Regionen möglich. Aus diesem Grund wurde für jedes Ohr sowohl eine Messung von Klick-ABR als auch f-ABR durchgeführt.

Der Klick wurde für 0,1 Millisekunden (ms) mit einem Schalldruckpegel zwischen 0 und 80 Dezibel (dB) in 5 dB SPL-Schritten präsentiert. Die Reihenfolge der Lautstärke war dabei zufällig. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurde das Mittel aus 256 Wiederholungen eines Klick-Stimulus als Ergebnis gespeichert.

Die Stimuli für die f-ABR bestanden aus 3 ms langen Reintönen mit Frequenzen zwischen 2 und 45,2 kHz und einer Schrittweite von halb-Oktav-Intervallen. Anders als beim homogenen Schalldruck des Klicks wurde hier der Schalldruck für 1 ms auf den gewünschten Pegel erhoben (Rampe), blieb für 1 ms auf dem Level und fiel dann in 1 ms wieder ab. So wurden der Maus in 5 dB-Schritten die Lautstärken zwischen 0 und 100 dB SPL für die Frequenzen 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz, 5,6 kHz, 8 kHz, 11,3 kHz, 16 kHz, 22,6 kHz, 32 kHz, 45,2 kHz randomisiert präsentiert. Das Ergebnis jedes Stimulus wurde auch hier nach 256 Wiederholungen gemittelt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Je verrauschter das Signal war, umso langsamer war die Frequenz der Wiederholungen, da eine Korrektur durch das Programm erfolgte. Das „Clipping“ entfernte alle Ableitungssignale mit einer Spannung größer 0,9 μV und wurde per Hand festgelegt.

2.11.6 Ablauf eines Schalltraumas

Zur Untersuchung der Slack^{-/-}-Mäuse wurden die Auswirkungen von zwei Schalltraumata analysiert. Eine Kohorte Versuchstiere beider Genotypen erhielt ein zweistündiges weißes Breitbandrauschen der Frequenzen 8-16 kHz mit einem Pegel von 100 dB SPL, eine zweite mit einem Pegel von 106 dB SPL.

Anders als die Kontrolltiere (CTRL) erhielten in diesem Versuchsaufbau die Versuchstiere (WT/KO) eine Vertäubung durch ein Schalltrauma. Dafür wurden die Tiere in Narkose gelegt (Kapitel 5.6) und in der schallisolierten Versuchsbox auf eine Wärmeplatte gelegt. Es wurden jeweils zwei Tiere pro Durchlauf vertäubt, im optimalen Fall eine Slack^{+/-}-Maus und eine Slack^{-/-}-Maus, damit eine interne Versuchskontrolle gegeben war. Anders als bei der ABR-Messung wurde der Schall bei der Vertäubung von einem leistungsstärkeren Lautsprecher (MHD-220N/RD, MONACOR INTERNATIONAL GmbH & Co. KG, Bremen) im Deckel der Box produziert. Das Zentrum des Lautsprechers war auf die Wärmeplatte in der Mitte der Versuchsbox abgebildet (Abb. 12). Es wurde darauf geachtet, die Mäuse mit der Nasenspitze zum Zentrum zu positionieren, sodass alle vier Ohren der Versuchstiere möglichst der gleichen Intensität des Schalldrucks ausgesetzt waren. Nach verschließen der schallisolierten Versuchsbox wurde das Programm NoiseExposure (OTOCONSULT, Frankfurt am Main) aufgerufen. Über dieses Programm wurde ein 100 oder 106 dB SPL lautes weißes Breitbandrauschen der Frequenzen 8-16 kHz zeitgleich mit einer Zeiterfassungsuhr für zwei Stunden gestartet.

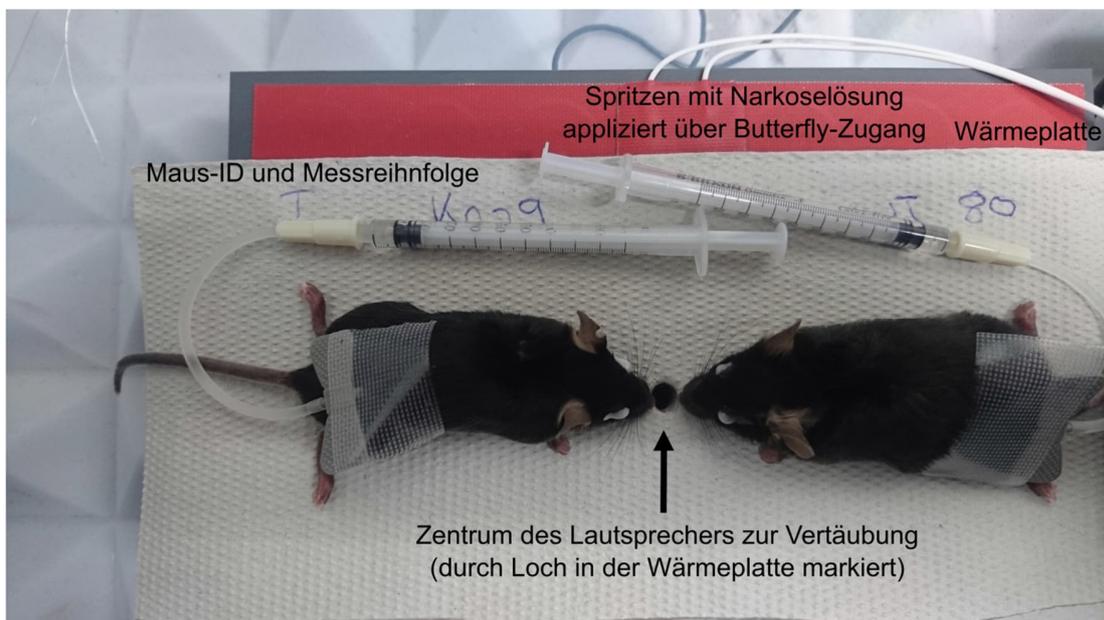


Abbildung 12: Zwei narkotisierte Mäuse vor dem Schalltrauma.

Die Tiere liegen auf der Wärmeplatte mit der Nasenspitze an der markierten Mitte der Versuchsbox. Auf

dem Papiertuch sind die ID der Mäuse dokumentiert und die Versuchsplanung (I / II), welcher Genotyp zuerst nach der Vertäubung in die ABR-Messung genommen wird. Dies förderte einen reibungslosen Ablauf der Messungen mit möglichst kurzen Narkosezeiten für die Tiere. Die Narkosespritzen lagen während der kompletten Zeit subkutan, um beim Nachspritzen während des Schalltraumas möglichst reizarm agieren zu können.

Aufgrund der begrenzten Narkosedauer wurde die Vertäubung nach einer Stunde ab Narkosegabe, also ca. 52 min Vertäubungsdauer, kurzzeitig unterbrochen. Vertäubung und Zeiterfassungsur wurden gestoppt und die noch narkotisierten Tiere nachgespritzt. Wenn die Mäuse ruhig blieben, wurde die Box verschlossen und das Vertäubungssignal und die Uhr zur Erfassung der Vertäubungsdauer erneut gestartet. In der Regel dauerte diese Unterbrechung keine zehn Sekunden. Die restliche Vertäubungszeit wurde ohne Unterbrechung durchgeführt. Nach der Vertäubung wurden beide Mäuse erneut mit einem Drittel Ausgangsmenge Narkosemittel nachgespritzt. Für eine Maus wurde direkt eine ABR-Messung gestartet, während die andere auf einer zweiten Wärmeplatte außerhalb der Versuchsbox auf die Messung wartete.

Als zweiter Versuchskontrollaspekt wurden die Wildtyp-Tiere und die Slack^{-/-}-Mäuse alternierend von Versuch zu Versuch zur linken und zur rechten Seite des Zentrums platziert und in die erste oder zweite ABR-Messung genommen. Vor dem Start der Vertäubungs-Versuche wurde das System zur Vertäubung kalibriert. Das Mikrofon (Brüel & Kjaer 4939, Brüel & Kjaer, Bremen) wurde im Zentrum der Versuchsbox aufgestellt und das empfangene Signal über einen Vorverstärker (Brüel & Kjær 2670; Brüel & Kjær, Bremen) und einen Messverstärker (Brüel & Kjær 2636; Brüel & Kjær, Bremen) geleitet und die Lautstärke kalibriert. Das emittierte Frequenzspektrum wurde zusätzlich durch einen Spektrumanalysator (Ono Sokki Multi-purpose FFT Analyzer CF-5220, Ono Sokki Technology, Yokohama, Japan) kalibriert (Joachimsthaler et al., 2014).

2.11.7 Besonderheiten bei der Verwendung der Narkose

Die Mäuse wurden am Tag 0 wie oben beschrieben in Narkose gelegt, wurden aber zusätzlich subkutan über einen Butterfly-Zugang mit genau berechneten Narkosemenge in einer 1 ml-Spritze verbunden, sobald das Tier tief schlief (Abb. 12). Dies hat sich als wertvoll erwiesen, da es für die Tiere einen stressfreien, effizienten Ablauf des Experiments ermöglichte, so dass die anschließende ABR-Messung schneller durchgeführt werden konnte.

Die Menge für die Dauer der voraussichtlichen Narkose wurde berechnet, indem ein Drittel des Körpergewichts mit der Anzahl der „Nachspritz-Ereignisse“ multipliziert wurde. Diese Anzahl war von der Versuchsplanung abhängig, da die routinemäßige Vertäubung einer Maus maximal vier Stunden dauerte und eine Narkosegabe die Maus knapp eine Stunde tief schlafen ließ. Ein

Beispiel: Maus (21 g) → 0,07 ml Nachspritzen/h, 1x 0,07 ml Nachspritzen für zweite Stunde Vertäubung, 1 x 0,07 ml Nachspritzen für Warten auf ABR-Messung, 1 x 0,07 ml Nachspritzen für ABR-Messung → in der Spritze sollten 0,28 ml Narkose aufgezogen sein.

2.12 Mikroskopische Bildaufnahmen

2.12.1 Aufnahmen am Olympus BX51

Aufnahmen der Cldn12-CP wurden im Labor von Todd Alexander, Universität von Alberta, Edmonton, an einem Olympus BX51 mit der Software *Infinity3 Capture* erstellt. Übersichtsaufnahmen wurden mit einem 20x/0,75/infinity/0,17/ FN26.5 Objektiv und Detailaufnahmen mit dem 60x/1,42/infinity/0,17/FN26.5 Öl-Objektiv aufgenommen.

2.12.2 Aufnahmen am konfokalen Laserscanning Mikroskop

Die Aufnahmen der IF-, LacZ- und RNAScope- Färbungen wurden am konfokalen LSM710 (Zeiss LSM 710, Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) aufgenommen. Übersichtsaufnahmen wurden mit dem 10x/ 0,3 M27 Objektiv (420340-9901; Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) oder 20x/0.8 NA Objektiv (420650-9901; Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) aufgenommen. Z-Stacks mit dieser Vergrößerung hatten ein z-Intervall von 1 µm. Für die Dokumentation der Cldn12-Übersichtsaufnahmen wurde eine *frame size* von 607,3 x 607,3 µm und eine Pixelgröße von 0,59 µm eingestellt. Detailaufnahmen wurden mit dem 63x/1.4 NA DIC M27 Öl-Objektiv (Öl: Carl Zeiss™ Immersol™ 518F; 10539438) aufgenommen. Z-Stacks mit dieser Vergrößerung hatten ein z-Intervall von 0,32 µm, bei vier SAK-Kombinationen betrug der Abstand 0,5 µm. Die Laserleistung betrug für alle Aufnahmen 2%, während die Verstärkereinstellungen individuell so angepasst wurden, dass die Signale eine optimale Signalstärke zeigten.

Für die Analyse der Synaptopathie war eine definierte Größe der Detailaufnahmen notwendig, die etwa acht innere Haarzellen umspannten. Hier wurde die *frame size* wie folgt gewählt: 948 x 546 Pixel, was einem Bildausschnitt von 64,3 x 37 µm entspricht (Pixelgröße: 0,07 µm). Die *frame size* bei den Cldn12-Detailaufnahmen der äußeren Haarzellen war 67,5 x 40,5 µm (Pixelgröße: 0,08 µm).

Die Aufnahmen der Bilder wurden mit dem Programm ZEN 2012 SP1, Version 8.1.10.484, erzeugt, dabei wurden immer 16-bit Aufnahmen erzeugt.

Überarbeitungen der Mikroskop-Aufnahmen (z.B. Einfügen des Maßstabs und Projektionen Stapelaufnahmen auf eine Ebene als Maximale Intensitätsprojektion (MIP)) wurden mit dem Open Source Programm FIJI (Schindelin et al., 2012) durchgeführt.

2.13 Auswertungsverfahren

2.13.1 Cochleäre Synaptopathie

Die Dokumentation der Prä- und Postsynapse nach einem Schaltrauma erfolgte nach Tag 28 der Hörmessungen mittels IF. Dabei wurde die Präsynapse durch das *C-Terminal Binding Protein 2* (Ribeye, CtBP2) charakterisiert. Es gibt zwei Isoformen des Proteins, das eine fungiert als Transkriptionsfaktor und das andere ist eine Hauptkomponente der Ribbons in den inneren HZ (Schmitz, 2009). Der Antikörper anti-CtBP2 aus Maus erkennt beide Isoformen und färbt deswegen sowohl den Nukleus als auch die Ribbons der IHZ (Reijntjes et al., 2020). Die Postsynapse wurde durch ein Protein des postsynaptischen Protein-Komplexes, Homer1, charakterisiert. Die Proteine der dendritischen Homer-Familie regulieren metabotrope Glutamatrezeptor-Funktionen und dienen auch als indirekte Scaffold-Proteine für AMPA-Rezeptoren (Martinez-Monedero et al., 2016; Reijntjes et al., 2020). Die relative Lage der Proteine zueinander ist in Abbildung 13 dargestellt (nach Iasevoli et al., 2014). Homer1 wurde wegen eines soliden Signal-Rausch-Verhältnisses des AKs in der IF als Target-Protein gewählt.

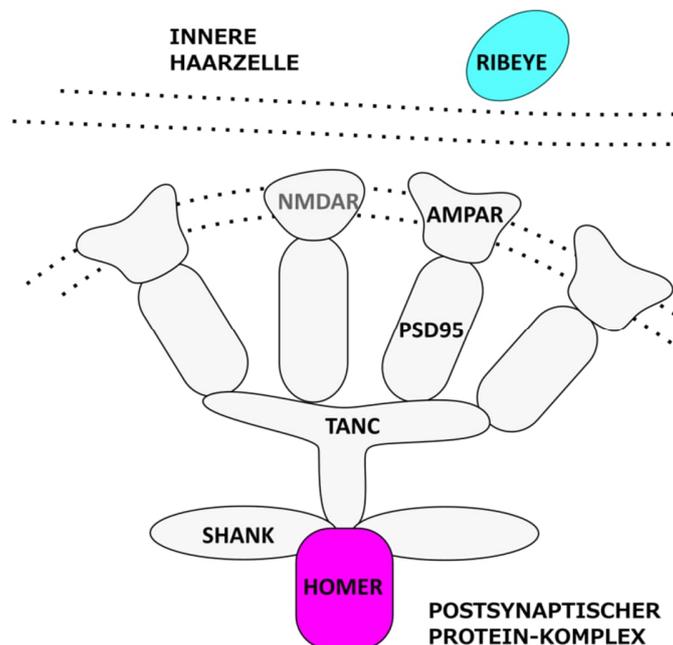


Abbildung 13: Schematische Abbildung einer Synapse der Inneren Haarzelle und afferenten Boutons eines Spiralganglion-Neurons.

Dargestellt sind die relative Lage des präsynaptischen Proteins Ribeye (CtBP2) und des postsynaptischen Proteinkomplexes. Der Glutamatrezeptor (AMPA) ist indirekt über Postsynaptische-Dichte-Protein95 (PSD95), und TANC bzw. Shank an das Scaffold-Protein HOMER gekoppelt (Iasevoli et al., 2014).

Das konsistente Protokoll der IF (PAK: anti-CtBP2, 1:500 mit SAK: Alexa488 anti-ms, 1:500 und PAK: anti-Homer, 1:1000 mit SAK: Cy3 anti-rb, 1:1500; Details Tab. 5) erlaubte eine semi-automatische Auswertung mit einem Makro, einem Particle Analysis Plugin, in dem Programm FIJI (Fell et al., 2016). In dem Makro legt man für jede MIP-Aufnahme Parameter fest und erhält eine automatische Zählung, Output-Graphen und -Tabelle für Anzahl und Größe der Fluoreszenzsignale. Daher ist es nur möglich, die Fluoreszenzkanäle getrennt voneinander zu analysieren. Neben festgelegten Werten, wie einer Mindestfläche eines Clusters um als „Signal“ erkannt zu werden ($\text{minArea} = 0,05 \mu\text{m}^2$) und einem Hintergrund-Subtraktionswert ($\text{RBDiam} = 5$), die für alle Bilder gleichermaßen festgelegt wurde, musste der Schwellenwert für die Intensität eines Signales von MIP zu MIP definiert werden. Dieser beeinflusst die relative Größe der Cluster und ist abhängig von tonotoper Region, Dicke und Verknöcherung des Gewebes und der Lage der IHZ im Gewebe. Die Schwellenwerte lagen zwischen 8 und 15, zu hohe Werte haben den Nachteil, dass schwache Intensitäten, obwohl optisch als spezifisches Signal zu erkennen, vom Makro vernachlässigt werden. Hingegen haben zu tiefe Werte den Nachteil, dass eventuelle Hintergrundcluster vom Makro zu einem validen Datenpunkt erhoben werden. Bei sorgfältiger Erwägung des Schwellenwertes sind „vernachlässigte“ Signale als auch „falsche“ Signale möglich, da sich dieser Bias systematisch durch alle Aufnahmen zieht und damit statistisch zu

vernachlässigen. Zur Kontrolle der definierten Schwellenwerte wurde eine Graphik ausgegeben, welche die gewerteten Signale anzeigte und so einen leichten Abgleich mit dem Original ermöglichte, um den Schwellenwert gegebenenfalls zu korrigieren. In der Output-Tabelle wurden unter anderem die Anzahl der Cluster und die durchschnittliche Größe der Cluster angegeben. Da aber nicht immer acht Haarzellen auf jeder MIP abgebildet sind, obwohl der Messbereich beibehalten wurde, wurden die Ergebnisse auf die entsprechende Anzahl der Haarzellen normiert. Als weiteres Charakteristikum der MIPs wurden händisch ungepaarte CtBP2-Cluster und Homer1-Cluster gezählt und in die Output-Tabelle pro Aufnahme hinzugefügt.

Final wurden die Aufnahmen noch mit Hilfe von Mitschriften und Übersichtsaufnahmen den tonotopen Regionen der Cochlea- Windungen zugeordnet (Abb. 14).

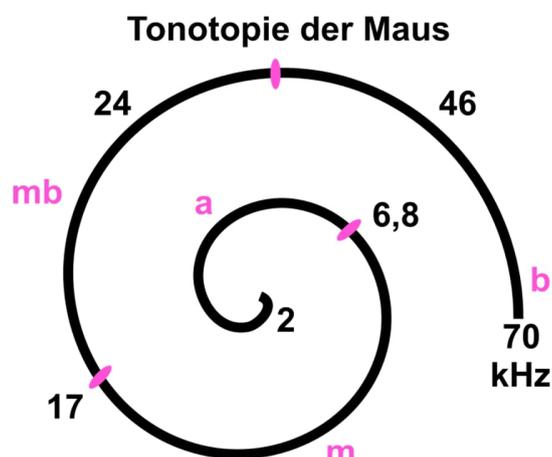


Abbildung 14: Schematische Frequenzkarte der Maus mit tonotoper Organisation der Cochlea. Die Cochlea-Spirale kann in einen apikalen Bereich (2 bis < 6,8 kHz), einen medialen Frequenzbereich (6,8 bis < 17 kHz) und einen midbasalen Bereich (17 bis ≤ 32 kHz) eingeteilt werden, ab 32 kHz beginnt der basale Bereich mit Verarbeitung sehr hoher Frequenzen (nach Müller et al., 2005; Engel et al., 2006)

2.13.2 Analyse der Hörmessdaten

2.13.2.1 Hörschwellen

Als Ergebnisse der ABR-Messungen ergeben sich Audiogramme (Abb. 15), in denen die gemittelten Spannungssignale der Ableitung, die ABR-Wellenformen, aufgetragen sind. Bei der f-ABR ergibt sich aus diesen Wellen, sortiert nach Schalldruckpegel als Funktion der Frequenz eine typische Hörkurve einer Maus mit dem Höroptimum im mittelfrequenten Bereich von 8-16 kHz.

Die Auswertung der Audiogramme erfolgte im Programm AudiologyLab (OTOCONSULT, Frankfurt am Main). Um die Hörschwellen zu bestimmen wurde der Schalldruck ermittelt, bei dem die auswertende Person erkennt, dass eine Welle aus dem Rauschen erwächst (Kurt et al., 2009).

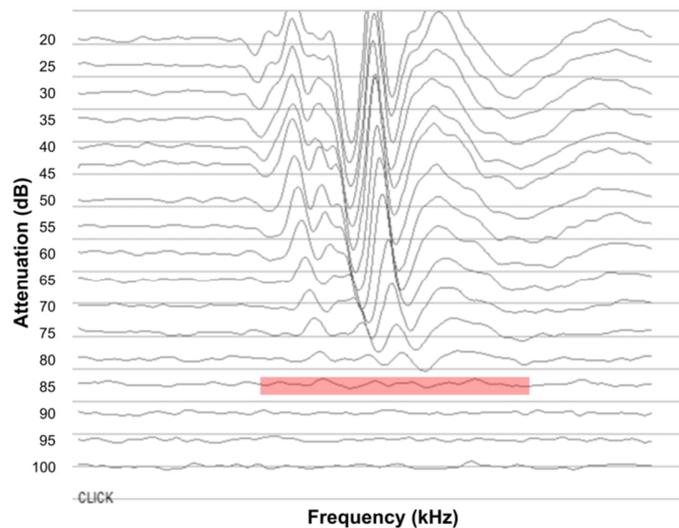
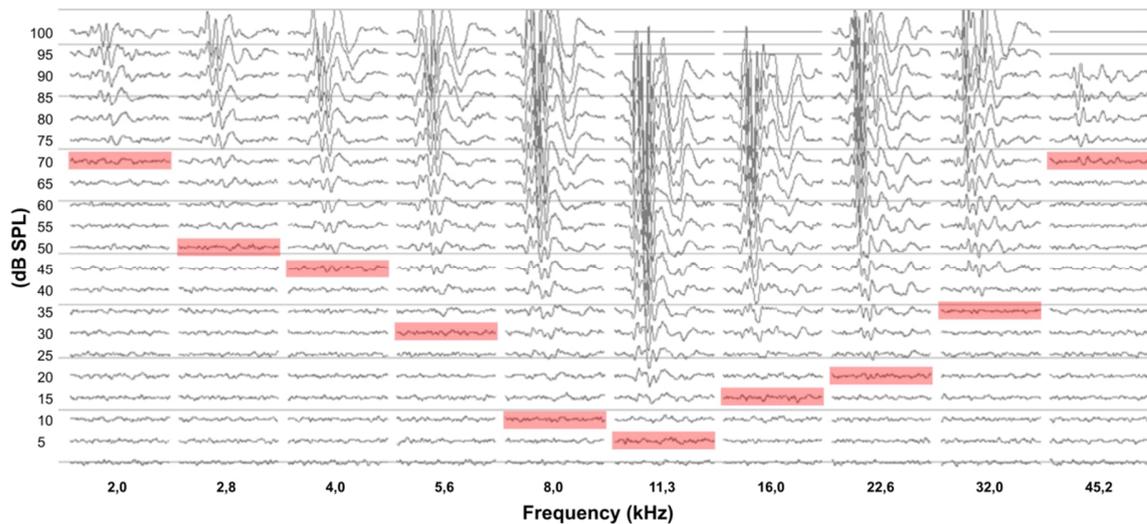
A**B**

Abbildung 15: Rohdaten der Messung einer Klick-ABR und ein f-ABR-Audiogramm.

A, B, Audiogramme der Maus 184-0352 (WT) an Tag -2 für die Stimulation mit Klick (**A**) und die f-ABR (**B**) eines Ohres aus dem Programm AudiologyLab. **A,** Für die Lautstärke während des Klicks werden im Programm die Attenuation (dB) angegeben, also die Abschwächung des Signals, das bedeutet 100 dB Attenuation entspricht 0 dB SPL und 20 dB Attenuation entspricht 80 dB SPL. Hörschwelle hier bei 15 dB SPL (rot nachgezogen). **B,** Für die f-ABR wurde hier für ein Ohr die Lautstärke in dB SPL über der Frequenz angegeben. Die frequenzspezifische HS wird durch die rote Markierung angedeutet.

Dabei galten folgende Kriterien: Die erkannte Welle muss bei höheren Schalldrücken „verfolgbar“ sein und ihre Latenz wird dabei kürzer und die Amplitude höher. Diese Charakteristika wurden zur Auswertung der Amplituden und Latenzen näher beschrieben. In dem Bereich der Hörschwelle waren nicht immer fünf Wellen erkennbar, es genügte eine Welle, die den oben genannten Ansprüchen entsprach. Konnte für eine bestimmte Frequenz keine Wellenform aus dem

Rauschen festgestellt werden, wurde für diese Frequenz 105 dB SPL eingetragen, was für die Auswertungen das Ergebnis „nicht messbar“ war.

2.13.2.2 Amplituden und Latenzen

Für diese Arbeit wurden nur die Messtage vor dem Schalltrauma (Tag -2) und vier Wochen nach dem Schalltrauma (Tag 28) für die Latenzen und Amplituden ausgewertet. In dem Auswertungsprogramm waren alle Wellen eines Audiogramms einzeln anwählbar und konnten in einem gesonderten Fenster vergrößert dargestellt werden (Abb. 16). In diesem wurde mit dem Cursor das Minimum (blauer Punkt) und Maximum (roter Punkt) angesteuert und mit einem Doppelklick bestätigt, um die Amplituden und Latenzen der Welle 1 zu bestimmen. Kriterien, um eine Welle I im Rauschen zu bestimmen, waren folgende:

1. Welle I hat eine Latenz zwischen 1,2 und 2,3 ms nach Beginn des akustischen Signals.
2. Die Amplitude einer Welle nimmt von laut nach leise ab.
3. Die Latenz wird mit Zunahme der Lautstärke und höherer Frequenz kürzer.
4. Die Auswertung erfolgt von hohen Schalldrücken zu niedrigen.

Diese Werte wurden im Anschluss automatisch als ein Wert mit der entsprechenden Frequenz, dem Schallpegel und dem Volt-Wert sowie der Zeit für jedes Ohr einzeln in ein MS Excel Tabellenblatt zu Dokumentations- und Berechnungszwecken eingetragen. Als erster Wert wurde die Amplitude aus Differenz zwischen zwei Voltwerten (geklicktes Minimum und Maximum) berechnet. Dann wurden alle Amplitudenwerte eines Genotyps und Versuchstags in eine gemeinsame Tabelle überführt und Mittelwerte pro Schalldrücke pro Frequenz (11,3 kHz, 16 kHz, 22,6 kHz, 32 kHz) gebildet. Für die Latenzen wurde analog verfahren. Mittelwerte wurden aus Ergebnissen bestehend aus mindestens drei Einzelwerten erfasst und weiter ausgewertet. Dies bedeutet, dass gerade für die Frequenz 32 kHz viele Ergebnismittelwerte aus der weiteren Darstellung herausgenommen wurden, da hier nicht ausreichend viele Messwerte vorlagen.

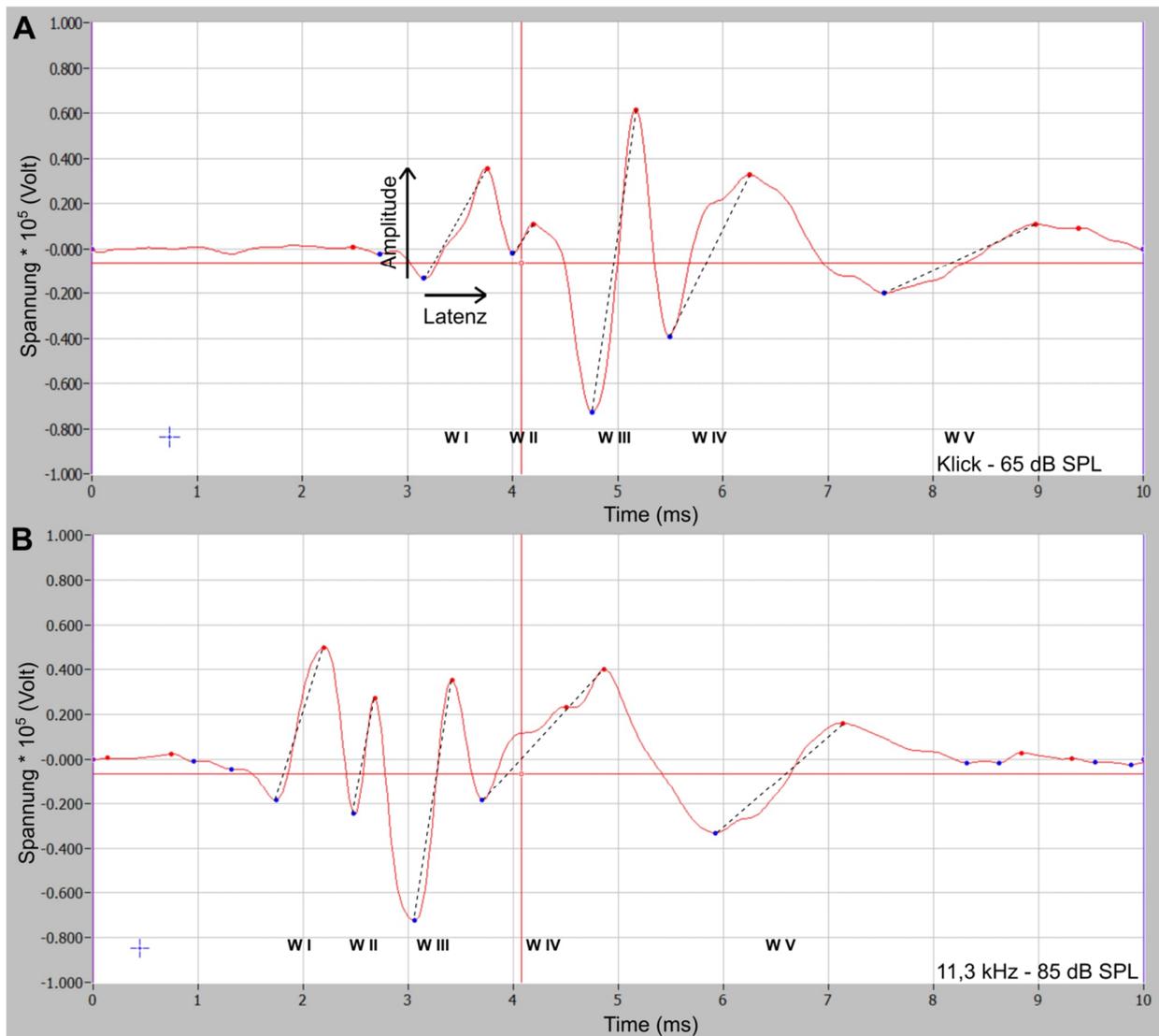


Abbildung 16: Darstellung der Rohdaten zur Analyse der Amplituden und Latenzen.

A, B, Gemittelte ABR-Wellenformen (rot) eines Ohres bei Präsentation eines Klicks bei 65 dB SPL (**A**) und einem Stimulus von 11,3 kHz bei 85 dB SPL zum Zeitpunkt $t = 0$ (**B**). Blaue Punkte zeigen die Minima und rote Punkte die Maxima der Wellen an; zur Darstellung der einzelnen Wellen I-V (W I, W II, W III, W IV, W V) wurden hier zugehörige Minima und Maxima verbunden (gestrichelte Linie). Diese beschreibt in ihrer Höhe die Amplitude und in der Dauer die Latenz.

2.13.2.3 Artefakte

Bei hohen Frequenzen größer als 22,6 kHz und hohen Schalldrücken (etwa 90 dB SPL) war das Mess-Setup an der Leistungsgrenze, sodass es zu Artefakten in den Audiogrammen kommen konnte. Diese waren deutlich erkennbar, da sie meist deutlich höhere Amplituden und einen Sprung in den Latenzen hatten, bezogen auf die niedrigeren Schalldrücke. Diese Wellen wurden nicht analysiert.

2.14 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurde mit dem Programm SPSS (Version 25, IBM) gearbeitet. Signifikanzniveaus wurden für alle Berechnungen wie folgt vergeben:

5 % Fehlerwahrscheinlichkeit:	*	= p <	0,05
1 % Fehlerwahrscheinlichkeit:	**	= p <	0,01
0,1 % Fehlerwahrscheinlichkeit:	***	= p <	0,001

Über deskriptive Analysen wurden die Verteilungen von Datenmengen untersucht und entschieden, ob parametrische oder nicht-parametrische statistische Verfahren angewendet werden mussten.

Der statistische Test wurde so gewählt, dass unverbundene Stichproben, etwa zwischen den Genotypen, anders behandelt wurden als verbundene Stichproben, etwa eine Kohorte zwischen Tag -2 und Tag 28.

Zur Berechnung statistischer Signifikanzen zwischen zwei unverbundenen Versuchsgruppen, die nicht normal verteilt waren, wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde ein Student T-Test angewandt. Bei nicht-parametrischen, verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon-Test angewandt mit der exakten Signifikanz (2-seitig).

Für Mehrfachvergleiche wurden sowohl parametrische als auch für nicht-parametrische Tests verwendet. Für Mehrfachvergleiche von unabhängigen Gruppen mit Normalverteilung wurde eine ANOVA verwendet. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben und des Friedman-Tests bei verbundenen Stichproben. Signifikanzwerte wurden mit der Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche angepasst.

In den Darstellungen von Histogrammen und Kurven der Ergebnisse werden Mittelwerte und Standardabweichung angegeben. Die Boxplots sind mit den Einzelwerten, dem Median (Querstrich) und dem Mittelwert (x) dargestellt. Die Boxen zeigen 25% und 75% Perzentile an; Whisker den Wertebereich vom Minimum bis zum Maximum. Darüberhinausgehende Datenpunkte sind Ausreißer gemäß Ausreißertest. Für die Darstellungen der Boxplots wurden extreme Ausreißer berechnet, jedoch nicht angezeigt, wenn sie den dreifachen Interquartilsabstand überschritten.

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation des Slack-Kanals in der Cochlea

Der erste Abschnitt zeigt die Erkenntnisse, welche beim Versuch der Lokalisation des Slack-Proteins anhand von Immunfluoreszenz erworben wurden. Zunächst wurden die Antikörper mittels Western-Blot charakterisiert und anschließend im Cortipräparat überprüft. Im Weiteren werden die Ergebnisse des molekularen Nachweises der mRNA *kcnt1* durch die Methode der *in situ* Hybridisation dargestellt. Die Methode des RNAScope® wurde in Gefrierschnitten der Cochlea etabliert und validiert.

3.1.1 Spezifität der Slack-Antikörper

3.1.1.1 Ergebnisse des Westerns-Blots einer Membranpräparation

Um die Expression des Slack-Kanals in der Cochlea nachzuweisen, musste die Spezifität verschiedener Antikörper (AK) überprüft werden. Eine gängige Methode dazu ist der Western-Blot; Abbildung 17 zeigt das Ergebnis eines Westerns-Blots einer Membranpräparation.

Dasselbe Lysat eines Slack^{+/+} (WT)- und Slack^{-/-} (KO)- Mausgehirns wurde zur Testung der Funktionalität verschiedener AK verwendet. Die Antikörperseren 1634-1635 wurden zur Optimierung der Reinheit zusätzlich affinitätsgereinigt, was in Abb. 17 mit (a) nach der Nummer des Serums gekennzeichnet ist. Im Blot ist deutlich zu erkennen, dass dieser Prozess eine Reduzierung der Banden bewirkte, jedoch gibt es bei allen Seren keinen Hinweis darauf, dass sie das Epitop im Slack-Protein überhaupt erkennen können. Ähnlich verhält es sich mit den AK anti-Slack2 und anti-Slack3. Alleine der kommerziell erwerbliche AK Slo2.2 (Blot rot umrandet) zeigt eine deutliche Diskriminierung vom Lysat des WT gegenüber dem KO auf der erwarteten Bandenhöhe, und erkennt damit spezifisch ein Epitop im Slack-Protein.

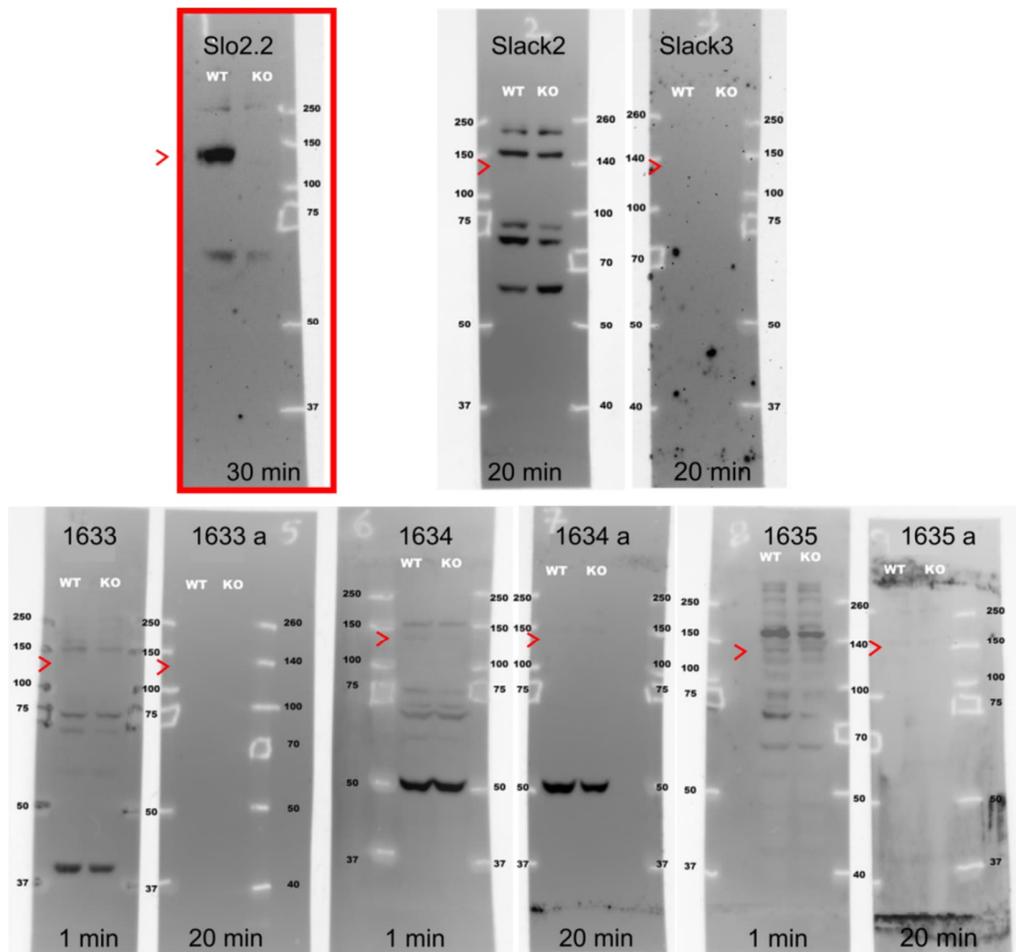


Abbildung 17: Spezifität des monoklonalen Antikörpers anti-Slo2.2 im Western-Blot.

Es wurden die Antikörper (AK) anti-Slo2.2, anti-Slack2, anti-Slack3 und der drei Antiseren 1633, 1634 und 1635 gegen spezifische Peptidsequenzen des Slack-Kanals auf dem Lysat von Slack^{+/+} (WT) bzw. Slack^{-/-} - Gewebe (KO) getestet. Im Western-Blot waren viele unspezifische Banden bzw. nach der Affinitätsaufreinigung der Seren (mit a bezeichnet) keine Banden mehr vorhanden. Selbst der einzige AK (anti-Slo2.2), der einen eindeutigen Unterschied zwischen Slack^{+/+}-Lysat und Slack^{-/-}-Lysat zeigte, wies eine zusätzliche Bande auf der Laufhöhe von 70 kDa auf. Die Laufhöhe des Proteins Slack ist auf allen Blots mit einem roten Pfeilkopf angezeigt (140 kDa). Zusätzlich wurde für jeden Blot die Bandengröße des Markers und die Expositionsdauer auf dem ChemiDocTM angegeben. Details zu den AK: siehe Material und Methoden.

3.1.1.2 Anwendung des Antikörpers anti-Slo2.2 im Corti-Präparat

Nachdem der anti-Slo2.2 AK der Firma Neuromab sich als einziger im Western-Blot als spezifisch erwiesen hatte, wurde er im Corti-Präparat (CP) von WT-Mäusen und Slack^{-/-}-Mäusen getestet (Abb.18). Da eine neuronale Expression erwartet wurde, erfolgte eine Co-Färbung mit dem neuronalen Marker anti-NFH (Neurofilament H). Die charakteristische neuronale Färbung des afferenten Faserbündels erlaubt eine Zuordnung des gewählten Ausschnittes, der den Bereich des basalen Pols von zirka 4 bis 5 IHZ zeigt. Für das CP wurde abweichend eine Fixierung mit

1 % PFA verwendet, da das reguläre Protokoll mit Zamboni (4 % PFA) für 30 min wiederholt kein Ergebnis für den AK Slo2.2 gezeigt hatte.

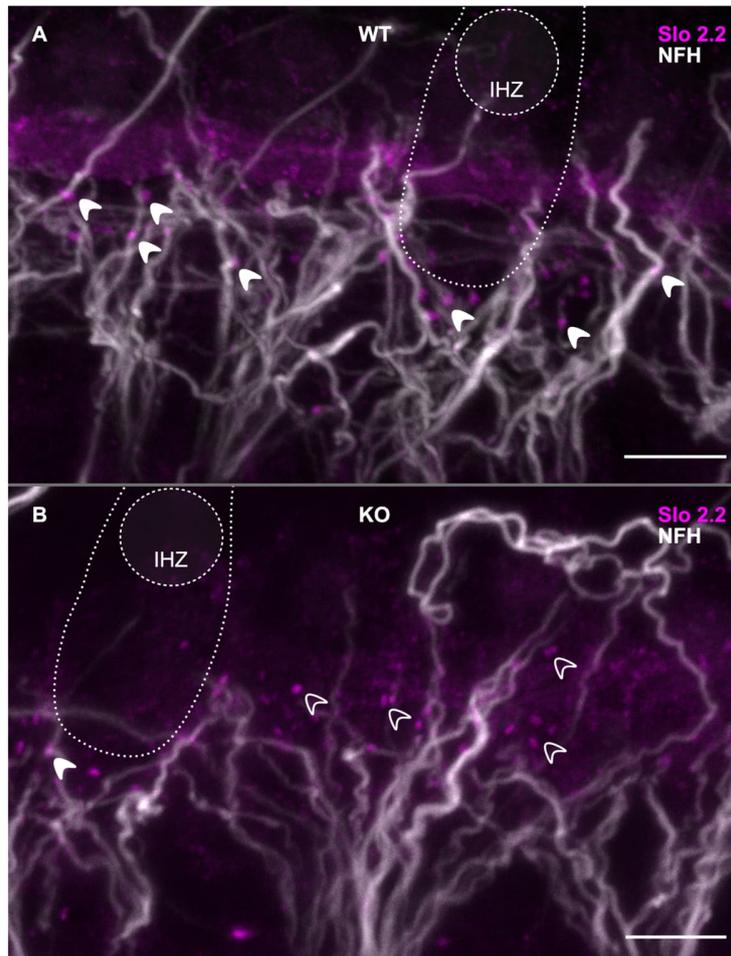


Abbildung 18: Fehlende Spezifität des Antikörpers anti-Slo2.2 in der immunhistologischen Färbung von Corti-Präparaten.

A, B, MIP vom basalen Pol von 4 inneren Haarzellen (IHZ) und den afferenten Nervenfasern (markiert mit anti-Neurofilament H, anti-NFH mit SAK AF647 anti-ck, weiß) unterhalb der IHZ von einer *Slack*^{+/+}-Maus (**A**) und einer *Slack*^{-/-}-Maus (**B**). In beiden Geweben erkennt man immunpositive Cluster gleicher Intensität und Größe gegen das Slackprotein (anti-Slo2.2 mit AF568 anti-ms, pink), die für den WT (**A**) häufiger neuronal (weiß) assoziiert zu sein scheinen (gefüllte Pfeilköpfe), aber im KO-Gewebe (**B**) eher nicht auf Neuronenfasern liegen (leere Pfeilköpfe). Maßstab: 10 μ m.

Im Gegensatz zur eindeutigen Spezifität des AK im Western-Blot war in der immunhistochemischen Färbung des CP keine eindeutig spezifische Färbung zu erkennen. Vergleicht man die MIP der Fluoreszenzsignale des anti-Slo2.2 AK der WT- (Abb. 18A) und KO-Färbung (Abb. 18B), zeigen beide CP fluoreszenzmarkierte Cluster im Bereich der Faserbündel unterhalb der IHZ. Beide Ausschnitte zeigen ein hohes Hintergrundsignal für die AK Slo2.2. Als einziger Unterschied fällt auf, dass beim WT die Cluster eher mit den Fasern assoziiert sind

(gefüllte Pfeilköpfe), während die Cluster im KO-Gewebe seltener mit den Fasern zusammenliegen (ungefüllte Pfeilköpfe). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei Wiederholungen des Versuchs an WT- und KO-Gewebe.

3.1.2 RNAScope® in Gefrierschnitten der Cochlea

3.1.2.1 Etablierung der Kontrollen für RNAScope®

Da auf Proteinebene kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte, sollte die mRNA des Slack-Gens *kcnt1* innerhalb der SGN nachgewiesen werden. Dazu wurde *single molecule* Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (*smFISH*) an Gefrierschnitten der Cochlea mittels RNAScope® Fluorescent Multiplex Assay etabliert. Bei diesem Assay entspricht ein Fluoreszenzpunkt einem mRNA-Molekül des entsprechenden Target-Gens, welches im Gewebe zunächst durch eine Hybridisierungssonde erkannt und gebunden wird. Die erfolgreich hybridisierte *probe* (Sonde gebunden an mRNA-Sequenz) durchläuft anschließend mehrere Amplifikationsschritte, wird so räumlich vergrößert und schließlich mit einem Fluorophor gekoppelt, das man mit einem Lichtmikroskop darstellen kann.

Zunächst wurde die RNAScope®-Methode etabliert, d.h. es wurden als Positivkontrolle mRNAs der ubiquitär exprimierten Gene *polr2a*, *ppib* und *ubc* detektiert. Anfangs war die Qualität der Ergebnisse nicht ausreichend, da die Anzahl der einzelnen Punkte zu gering war (Abb. 19A). Die Änderung des Dekalzifizierungsmittels der Cochlea vom *Rapid Bone Decalcifier* zu EDTA erhöhte die Anzahl der Punkte deutlich (vgl. Abb. 19A und 19C). Ein weiterer wichtiger Etablierungsschritt war die Zuordnung von Fluoreszenzbereichen an die im Vorfeld den Target-Genen zugewiesenen RNAScope®-Kanälen C1 - C3. Ausschlaggebende Kriterien sind die Häufigkeit des Targets und damit einhergehende Nachweisbarkeit einzelner Fluoreszenzpunkte. Bei der Positivkontrolle erwies sich die Kombination des Fluorophors mit den RNAScope®-Kanälen C1- C3 der Positiv-*probes* *polr2a*, *ppib* und *ubc* als kritischer Parameter (Abb. 19): Obwohl bei *smFISH* die Anzahl und nicht die Intensität der Punkte wichtig ist, ergab eine veränderte Zuordnung der Fluorophore zu den Kanälen einen Unterschied. An unserem LSM war die Intensität von Atto550 höher als von Alexa488, was die Detektion seltener oder kleinerer Fluorophor-Punkte erleichtert (vgl. Abb. 19B und 19C). Deswegen wurde die finale Zuordnung (Abb. 19C) so gewählt, dass Atto 550 dem Kanal C2, somit der *probe* für *kcnt1* zugeordnet wurde.

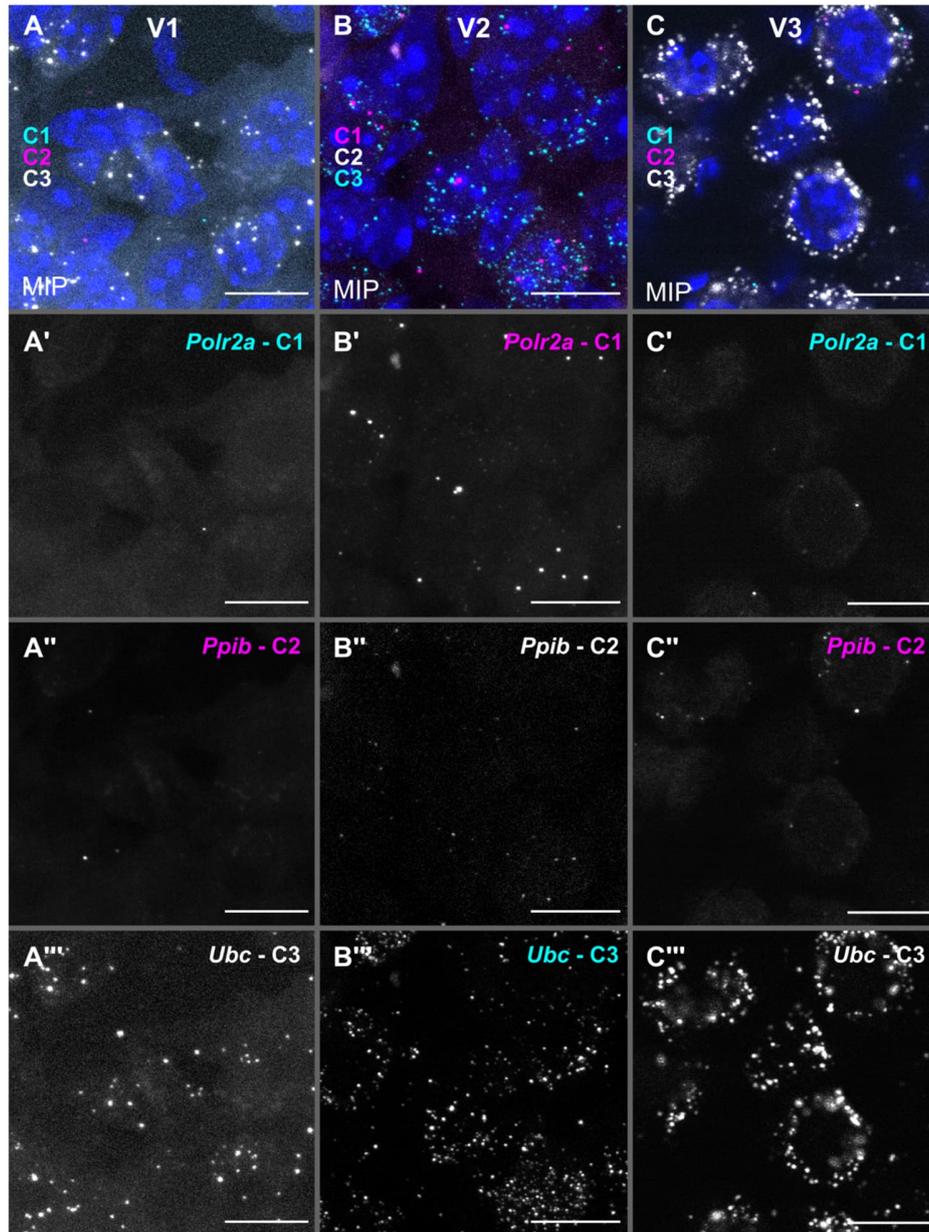


Abbildung 19: Etablierung der Positivkontrollen der RNAScope®-Methode für Gefrierschnitte der Cochlea.

A-C, Detailaufnahmen der Ergebnisse von drei Versuchen (V1-V3) der RNAScope®-Methode in Gefrierschnitten von Spiralganglien von *Slack*^{-/-}-Mäusen im Überlagerungsbild aller Kanäle mit DAPI (**A-C**) und den Einzelkanälen (**A'-C'''**) in Graustufen. Es wurden Standardsonden gegen die ubiquitär exprimierte mRNA von *polr2a*, *ppib* und *ubc* verwendet. **A-A'''**, V1 verdeutlicht, dass die Qualität der Ergebnisse zunächst nicht ausreichend war. Alle Einzelkanäle zeigten geringe Amplifizierungszahlen (Anzahl der Punkte). **B**, Die in V2 variierte Fluorophor-Kopplung ergab, dass die Detektion des an Atto550 (hier C1) gekoppelten Kanals besser funktioniert als bei Kopplung an Atto647 (C1). Zudem zeigte Alexa488 (C3) ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. **C-C'''**, Die Fluorophor-Kombination, bei der Atto550 an C2 gekoppelt ist, stellte sich als überlegen heraus, da in den *probes* das Target *kcnt1* an C2 gebunden ist. Alle Bilder sind MIPs über die komplette Tiefe des Schnitts von 12 µm. Maßstab: 10 µm.

Die *Negativ-probe* hybridisieren eine mRNA des Bakteriengens *dapb*. Die Hybridisierungsergebnisse auf diesen Gefrierschnitten sind folglich falsch-positive Treffer und müssen in Relation zu den Treffern der Positivkontrolle gesetzt werden. Ein Beispiel einer erfolgreichen Negativkontrolle ist in Abbildung 20 gezeigt.

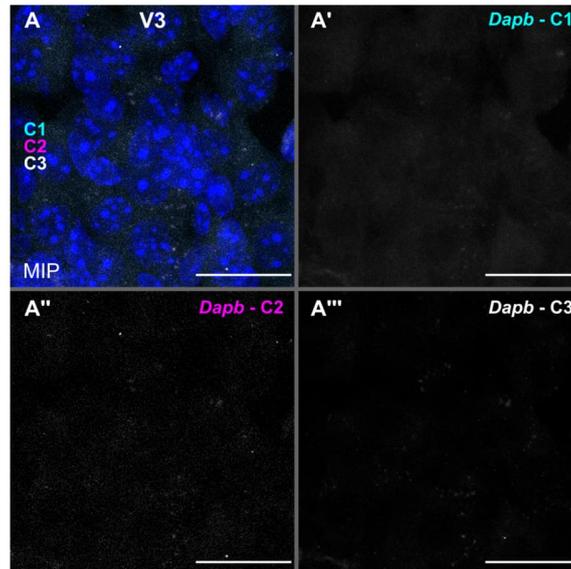


Abbildung 20: Negativkontrollen der RNAScope®-Methode an Gefrierschnitten der Cochlea.

A-A''', Exemplarisches Ergebnis der RNAScope®-Methode bei der Versuchsdurchführung nach V3 (siehe Abb. 19) im Spiralganglion einer *Slack^{+/+}*-Maus. **A**, Überlagerungsbild aller Kanäle und Einzeldarstellung der Kanäle C1 (Alexa488), C2 (Atto550), C3 (Atto647) in Graustufen der Amplifikation des Bakteriengens *dapb* (**A'-A'''**). Alle Bilder sind MIPs über die komplette Tiefe des Schnitts von 12 µm. Maßstab: 20 µm.

3.1.2.2 Erhöhung der Qualität des Gewebeerhalts der Gefrierschnitte

Neben der erfolgreichen Etablierung der Kontrollen musste auch der Erhalt der Gewebeschnitte verbessert werden. Die Herausforderung eines Cochlea-Schnittes ist die Inhomogenität des filigranen Gewebes, da es sowohl knöcherne als auch häutige Strukturen besitzt. Dazu ist es nicht „durchgehend kompakt“, sondern ein Kammern-System, was die gesamte Stabilität des Schnittes reduziert. Deswegen wurde das Protokoll schrittweise verändert (Abb. 8). So wurde ein Steamer statt eines Kochvorgangs verwendet und zusätzliche Backschritte bei 60 °C eingeführt, damit die Schnitte wie in Abbildung 21 gezeigt ausgewertet werden konnten.

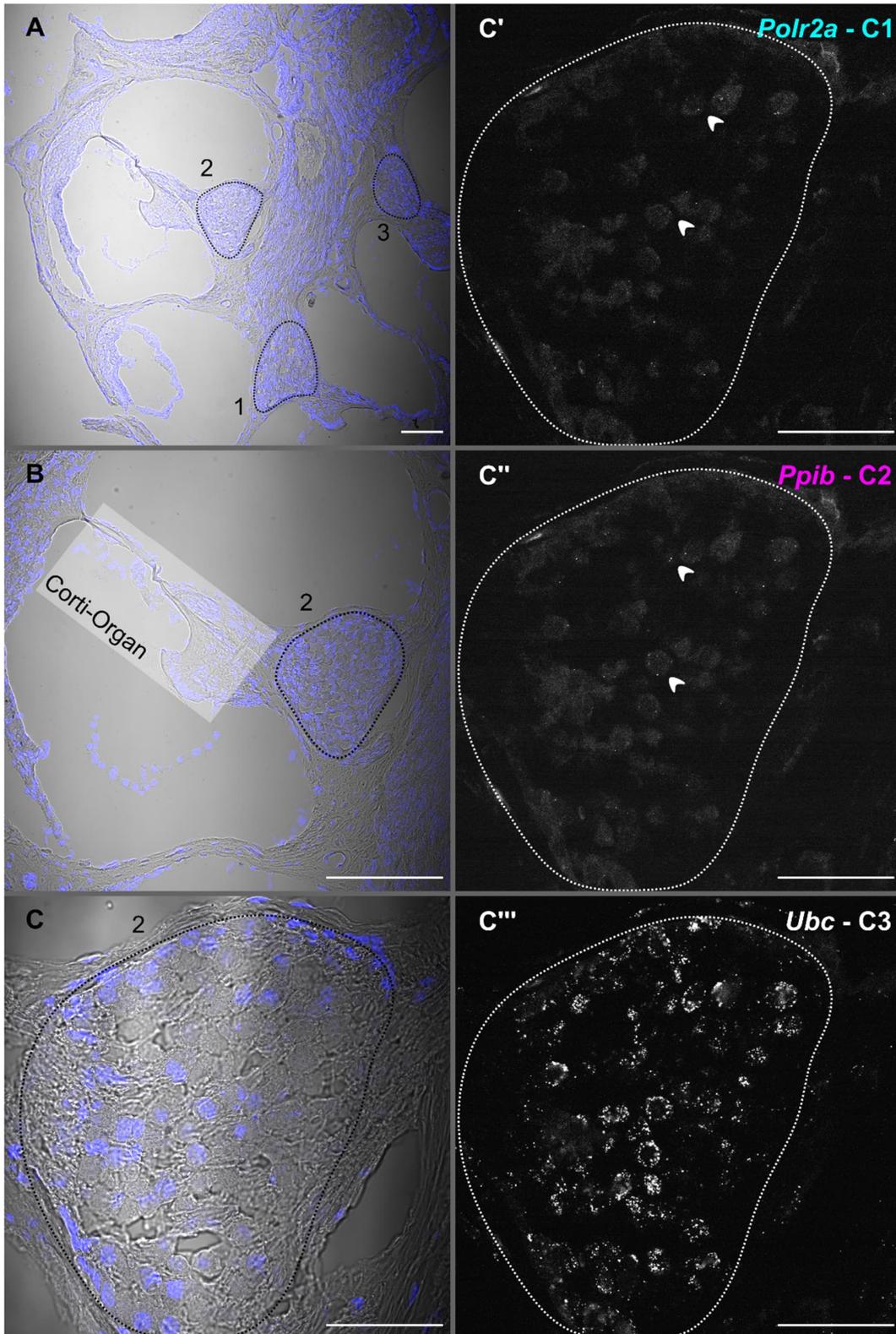


Abbildung 21: Cochlea-Gefrierschnitt mit gutem Gewebeerhalt einer erfolgreichen Positivkontrolle.
A, Übersicht eines Gefrierschnitts der Cochlea in der Kombination von Durchlicht- und Fluoreszenzbeleuchtung; DAPI-markierte Zellkerne fluoreszieren blau. Der Schnitt erfolgte mittmodiolar

(durch den Modiolus) und durch drei Spiralganglien (mit schwarzer Strichellinie umrandete Bereiche 1-3); 1: apikales Ganglion, 2: mediales Ganglion und 3: midbasales/basales Ganglion. **B**, *Ductus cochlearis* mit medialem Ganglion (2) und der Basalmembran mit aufliegendem Corti-Organ. **C**, Mediales Ganglion in Durchlichtbeleuchtung mit DAPI-Fluoreszenz. **A-C** sind Aufnahmen einer Ebene. **C'-C''''**, MIPs verschiedener Fluoreszenzkanäle der Positivkontrolle der RNAScope®-Methode. **C'**, MIP im C1-Kanal (Alexa 488) mit niedriger Expression für *polr2A* zeigt eine eindeutige Expression von *polr2A* in SGN (Pfeilköpfe). **C''**, MIP im C2-Kanal (Atto 550) mit mittlerem Expressionsniveau von *ppib* zeigt deutliche Fluoreszenzpunkte (Pfeilköpfe). **C''''**, MIP im C3-Kanal (Atto 647) mit einer hohen Expression der mRNA für *ubc*. Maßstab: **A, B**: 100 µm; **C-C''''**: 50 µm.

Abbildung 21A zeigt eine Übersichtsaufnahme eines mittlmodiolaren Schnittes im Durchlicht mit DAPI-Färbung, bei der die *Ducti cochlearis* als einzelne Kammern vorliegen und die Spiralganglien (umrandet, 1-3) am Modiolus anliegen. Beim Vergrößern (Abb. 21B) erkennt man im *Ductus cochlearis* das intakte Corti-Organ und das querschnittene Spiralganglion (2). Mit der Detailaufnahme des Spiralganglions (2) im Durchlicht (Abb. 21C) und in den einzelnen Fluoreszenzkanälen (Abb. 21C'-C'') einer Positivkontrolle kann man die Anzahl und Verteilung der Punkte im Präparat nun genauer erkennen.

3.1.2.3 Bewertung der Zelltypen der Gefrierschnitte mit RNAScope®

In den Spiralganglien befinden sich vor allem Typ I -SGN (95 %), Typ II -SGN sowie Hüll- und Stützzellen wie Fibroblasten, aber auch vereinzelt Zellen des Immunsystems. Durch kleine Risse im Gewebe in den nur 12 µm dicken Schnitten, aber auch durch Bereiche mit vielen Fasern, kann der Anschein erweckt werden, dass die „Ausbeute“ an neuronalen Somata im Ausschnitt niedrig ist. Vergleicht man Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 22), erkennt man, dass ein durchaus flächiges Gewebestück (Abb. 22A) im Fluoreszenzkanal „löchrig“ (Abb. 22A') aussieht. Dieser Eindruck kommt dadurch zustande, dass man hier keine neuronale Volumenmarker eines Proteins, wie etwa β -Tubulin, nutzt, sondern einzelne mRNA-Moleküle. Dazu kommt die unterschiedliche zelluläre Expressionsstärke einzelner mRNAs.

Calbindin2 (c3- *calb2*) ist ein Marker für Typ I-Fasern. Unterschiedliche Expressionsniveaus sind charakteristisch für unterschiedliche Subtypen der SGN Typ I. SGN Typ Ia und Typ Ib (Abb. 22A'/B': 1, 3) zeigen hohe bis mittlere Expression von *calb2*; SGN Typ Ic (Abb. 22A'/B': 2) zeigt kaum Expression von *calb2* (Shrestha et al., 2018). Tyrosinhydroxylase (*th*, Abb. 22A'/B': 4), ein Marker für SGN Typ II, war nur vereinzelt in den Präparaten zu finden (C1- Abb. 22B'). *Kcnt1*-mRNA wurde vereinzelt ebenfalls in den Somata der SGN nachgewiesen (C2- Abb. 22A'). Da es sich um eine geringe Anzahl an Fluoreszenzpunkten handelte, wurde die Methode parallel mit WT- und KO- Gewebe durchgeführt, um die Ergebnisse besser einordnen zu können.

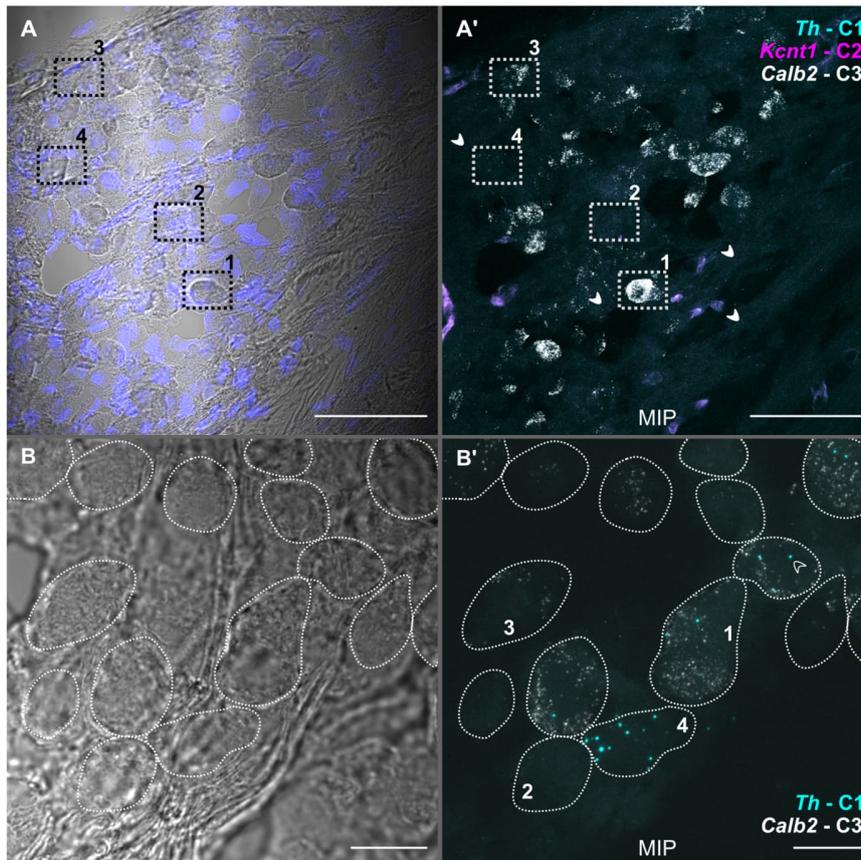


Abbildung 22: Unterscheidung der Neuronentypen in Spiralganglien durch Expressionsnachweis der mRNA von *th*, *calb2* und *kcnt1* mit der RNAScope®-Methode.

A, Durchlichtbild des Gefrierschnitts eines Spiralganglions mit überlagerter konfokaler DAPI-Fluoreszenz für die Markierung von Zellkernen. **A**, **A'**, Kästchen (K) 1-4: Spiralganglionneurone (SGN) mit unterschiedlichem Expressionsniveau von Calbindin 2 (*calb2*, C3, weiß) und Tyrosinhydroxylase (*th*, C1, türkis). K1: SGN mit hoher Expression *calb2*. K2: SGN ohne Expression von *calb2*. K3: SGN mit mittlerer Expression von *calb2*. K4: SGN mit hoher Expression von *th*. Vereinzelt zeigt sich eine Expression von *kcnt1* (C2, pink, gefüllte Pfeilköpfe). **B**, **B'**, Detailbild eines Spiralganglions im Durchlicht (**B**) und als Fluoreszenzbild (**B'**, C1 - *th*, C3 - *calb2*, MIP). **B'**, SGN Typ I -Subtypen können durch unterschiedliche mRNA-Expressionsintensitäten von *calb2*, C3, weiß) differenziert werden. *th* (C1, türkis), zeigt vereinzelt Expression (leere Pfeilköpfe) auch in SGN Typ I. Maßstab: **A**, **A'**: 100 µm; **B**, **B'**: 10 µm.

3.1.2.4 Expression von *kcnt1*-mRNA in den SGN

Um die Expression von *kcnt1*-mRNA in den SGN besser bewerten zu können, wurde ein Versuch parallel an Gefrierschnitten von WT-Mäusen und *Slack*^{-/-}-Mäusen getestet (Abb. 23). Im Ergebnis zeigten sich Unterschiede in der Anzahl von Fluoreszenzpunkte im C2-Kanal (*kcnt1*-mRNA) in den *Slack*^{+/+}-SGN (Abb. 23A'') gegenüber den *Slack*^{-/-}-SGN (Abb. 23B''), was auf die Spezifität der Methode mit der *kcnt1*-probe hinweist.

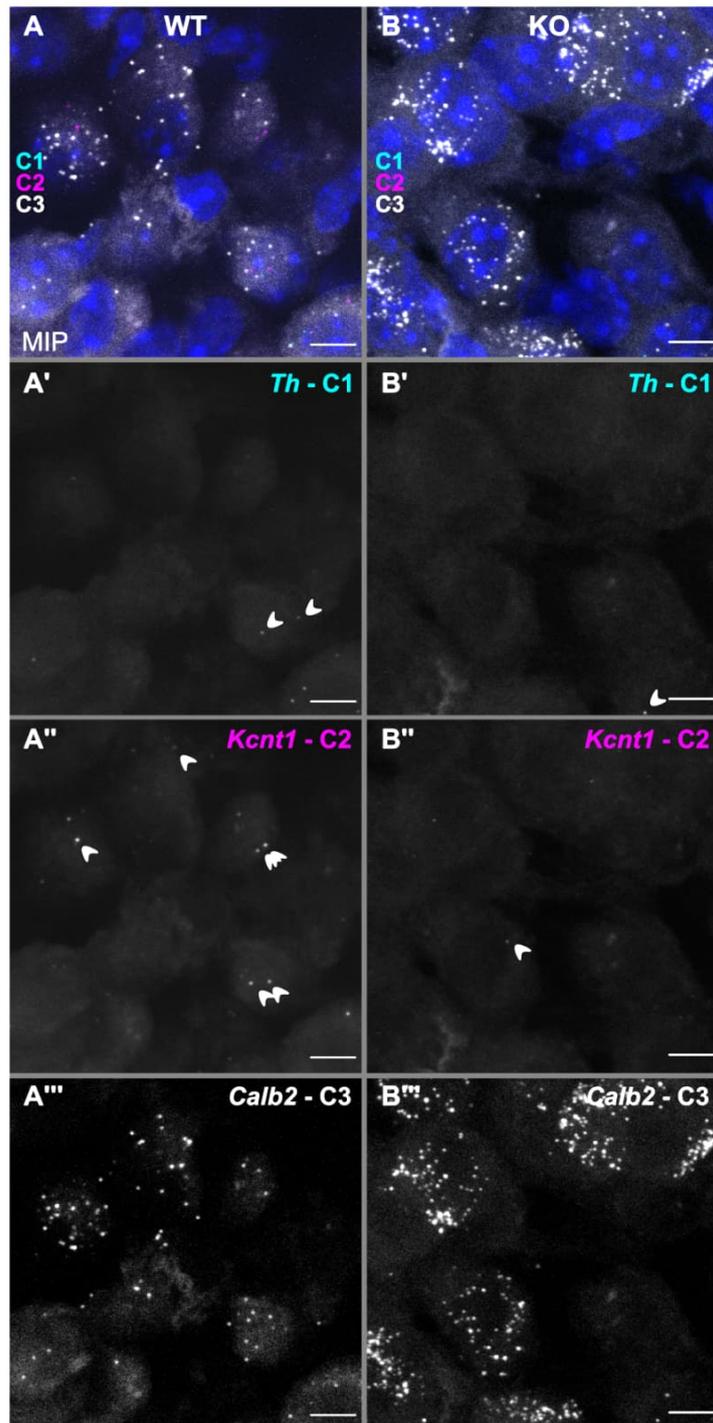


Abbildung 23: Nachweis von Slack-mRNA in SGN von Slack^{+/+}- Mäusen mit der RNAScope®-Methode.

A, B, Überlagerungsbild der Fluoreszenzsignale (MIP) von C1-th, C2-kcnt1, C3-calb2 und DAPI in SGN-Somata einer Slack^{+/+}- Maus (**A**) und einer Slack^{-/-}- Maus (**B**). **A'-B'''**, MIPs der Einzelkanäle in Graustufen. **A', B'**, Seltene Fluoreszenzpunkte von *th*-mRNA (Pfeilköpfe) weisen darauf hin, dass es in diesem Ausschnitt keine SGN Typ II -Zellen gibt. **A'', B''**, Deutliche Unterschiede in der Anzahl von Fluoreszenzpunkten im C2-Kanal (*kcnt1*-mRNA) in den Slack^{+/+}- Zellen (**A''**) gegenüber den Slack^{-/-}- Zellen

(B''). A'', B'', Derselbe Ausschnitt zeigt eine vermeintlich höhere Expression für *calb2* in *Slack*^{-/-}- Zellen (B'') gegenüber *Slack*^{+/+}- Zellen (A'') – dieser Befund erwies sich jedoch nicht als repräsentativ in 3 Experimenten. Maßstab: 5 µm.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass das Ziel der Lokalisation des Slack-Proteins in der Cochlea nicht erreicht wurde. Der vielversprechendste AK anti-Slo2.2 der Firma Neuromab war in der Immunfluoreszenz im Gewebe (CP) - im Gegensatz zum Western-Blot - nicht spezifisch. Nach der erfolgreichen Etablierung der in situ-Hybridisation der *kcnt1*-mRNA in Gefrierschnitten der Cochlea war eine zelluläre Expressionsanalyse im Rahmen dieser Doktorarbeit ebenfalls nicht realisierbar, da aufgrund der geringen absoluten Expression der mRNA auf den Schnitten der WT-Mäuse eine Zuordnung der Expression von *kcnt1* zu SGN-Subtypen nicht möglich war.

3.2 Hörvermögen von Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-Mäusen

Neben den Untersuchungen zur Lokalisation des Slack-Proteins wurden Hörmessdaten von Slack^{+/+}-Mäusen (WT) und Slack^{-/-}-Mäusen (KO) erhoben. Zunächst wurde in Kooperation mit Dietmar Hecker und Katharina Sorg, Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Klick-ABR- und DPOAE-Messungen an 15 Wochen alten Mäusen durchgeführt, um einen ersten Eindruck über das Hörvermögen der Tiere zu erhalten. Anschließend wurden die Konsequenzen eines milden und eines moderaten Schalltraumas für die Hörschwellen von 8 Wochen alten Mäusen beider Genotypen analysiert. Weiterhin wurden Latenzen und Amplituden der ABR-Welle I ausgewertet.

3.2.1 Erste Klick-Hörschwellen adulter Slack^{-/-}-Mäuse

In Abbildung 24A sind die Ergebnisse der Hörschwellen (HS) durch Klick-Stimulation von 15 Wochen alten Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-Mäusen dargestellt und zusammen mit den Ausgangsdaten der Klick-ABR für die 8 Wochen alten Mäuse abgebildet, die anschließend einem Schalltrauma ausgesetzt wurden.

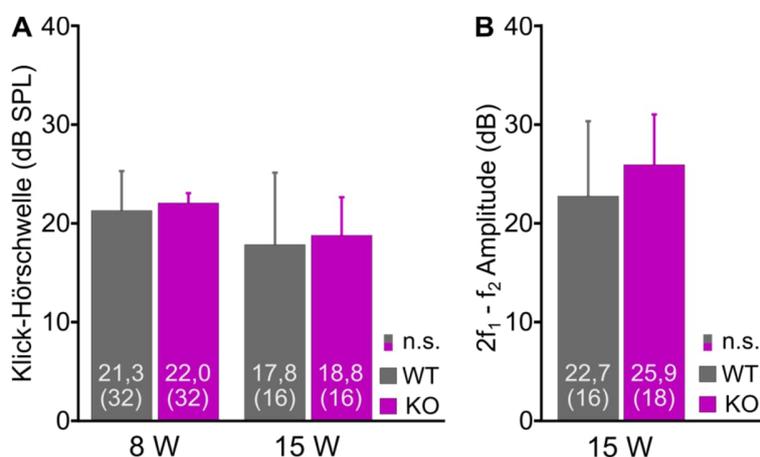


Abbildung 24: Jung-adulte Slack^{-/-}-Mäuse besitzen eine normale Hörschwelle.

A, B, Klick-ABR Hörschwellen (**A**) und 2f₁-f₂ DPOAE-Amplituden (**B**) von Slack^{+/+}-Mäusen (grau) und Slack^{-/-}-Mäusen (pink) zeigen keine signifikanten Unterschiede. **A,** Gemittelte Klick-Hörschwellen von 8 Wochen (n = 32 Ohren) und 15 Wochen (n = 16 Ohren) alten Versuchstieren zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Versuchstiere der 15 Wochen alten Gruppe erhielten zusätzlich eine DPOAE-Messung (**B**), wobei die DPOAE-Amplituden nach Stimulation mit L1 = 55 dB SPL und L2 = 45 dB SPL von 10 bis 18 kHz in 0,5 kHz Schritten gemessen und gemittelt wurden. Die mittleren DPOAE-Amplituden von Slack^{-/-}-Mäusen vergleichen mit Slack^{+/+}-Geschwistertieren, die ein Maß für die Leistungsfähigkeit der ÄHZ darstellen, waren nicht unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test).

Es konnten normale Klick-HS sowohl für die Slack^{+/+}- als auch für die Slack^{-/-}-Mäuse beider Altersstufen festgestellt werden. Die Daten für die unterschiedlichen Altersstufen wurden an

unterschiedlichen Messanlagen erhoben. Da die Schwellen sich für ein Ohr nur auf 5 dB genau bestimmen lassen, kann man aus dem beobachteten Unterschied der mittleren Klick-Hörschwellen beider Genotypen zwischen den zwei Messanlagen von ~4 dB folgern, dass beide Anlagen vergleichbare Werte liefern. DPOAE-Amplituden, ein Maß für die Tätigkeit der ÄHZ, sind - in Übereinstimmung mit den guten HS - normal und unterscheiden sich nicht zwischen Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}- Wurfgeschwistern.

3.2.2 Normale Hörleistung bei Kontrollmäusen ohne Schalltrauma

Um die Auswirkungen eines Schalltraumas im Zeitverlauf einordnen zu können, bedarf es einer Einschätzung der Entwicklung der Hörleistung für den Zeitraum der Untersuchung von Tieren gleichen Alters ohne Trauma für beide Genotypen (Abb. 25).

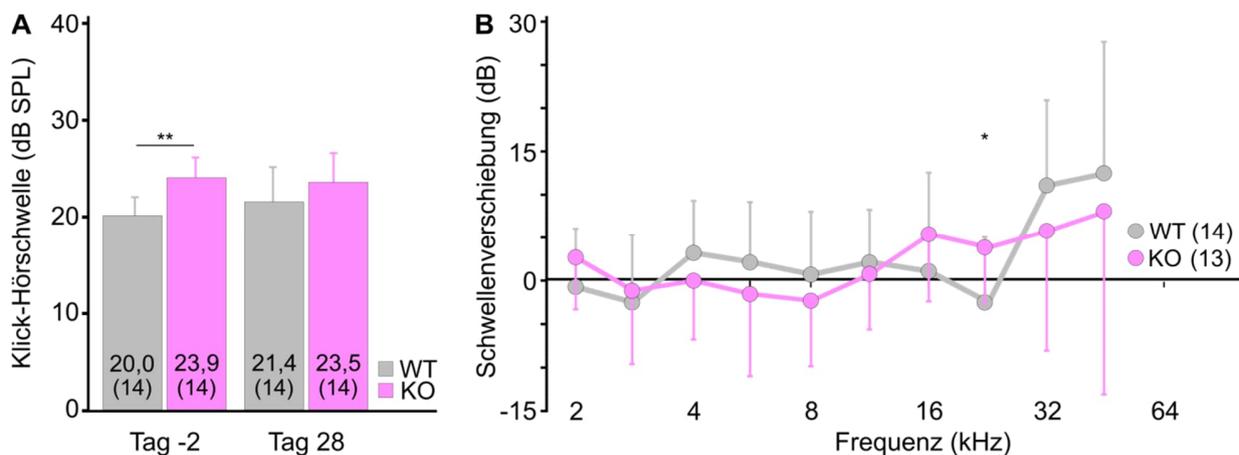


Abbildung 25: Kontrolltiere ohne Trauma zeigen eine leichte Schwellenerhöhung im hochfrequenten Bereich nach vier Wochen.

A, Gemittelte Klick-Hörschwellen für Kontrolltiere (Slack^{+/+}-Mäuse: hellgrau; Slack^{-/-}-Mäuse: hellpink), die mit 8 Wochen eine initiale Hörmessung an Tag -2 erhalten hatten, gefolgt von einer Hörmessung vier Wochen später (Tag 28). Am Tag -2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-Mäusen ($P < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test), der an Tag 28 nicht mehr vorhanden war. **B**, Mittlere Hörschwellenverschiebung an Tag 28 bezogen auf die initiale f-ABR-Messung (Tag -2). * $P < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test.

Dafür wurden ABR-Messungen mit einem breitbandigen Klick-Stimulus (Abb. 25A) und mit frequenzspezifischen Stimuli (Abb. 25B) im Alter von 8 und 12 Wochen durchgeführt. Obwohl diese Tiere kein Schalltrauma erhielten, wurde zur Vergleichbarkeit die erste Messung auch mit Tag -2 betitelt und die zweite Messung mit Tag 28.

Am Tag -2 (Abb. 25A) war die Klick-HS der Slack^{-/-}-Mäuse signifikant gegenüber der Schwelle der Slack^{+/+}-Mäuse erhöht. Dieser Unterschied zwischen den Genotypen bestand am Tag 28 nicht mehr. Für beide Genotypen wurde jeweils keine signifikante Veränderung der HS zwischen den

Tagen -2 und 28 nach Klick-Stimulus gefunden.

Um die Veränderung der frequenzspezifischen Hörschwellen zu veranschaulichen, wurde die Schwellenverschiebung (dB) zwischen den Tagen -2 und 28 dargestellt (Abbildung 25B). Die Veränderung der HS der WT-Tiere variierte kaum für Frequenzen zwischen 2 – 22,6 kHz, erreichte jedoch bei hohen Frequenzen Werte von $11,1 \pm 9,8$ dB (32 kHz) und $12,5 \pm 15,2$ dB (45,2 kHz). Bei den Slack^{-/-}-Mäusen lagen die Abweichungen der HS nach vier Wochen zwischen $0 \pm 6,8$ dB (4 kHz) und $8,1 \pm 21,2$ dB (45,2 kHz) ohne Schalltrauma. Signifikant unterschiedlich war die Verschiebung der HS zwischen Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}- Mäusen bei 22,6 kHz.

3.2.3 Hörschwellen der Versuchstiere vor Vertäubung

Um die Effekte eines Schalltraumas bewerten zu können, mussten mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vor Versuchsbeginn erfasst werden. Die Ausgangssituation der HS an Tag -2 ist in Abbildung 26 für den Vergleich der Genotypen (Abb. 26A) und aller Versuchsgruppen (Abb. 26B) dargestellt. Für das Audiogramm aller Slack^{+/+}- und aller Slack^{-/-}-Tiere (Abb. 26A) gab es auf den ersten Blick kaum qualitative Unterschiede in der Hörleistung. Nur bei den niedrigen Frequenzen lagen die HS des KO leicht über denen des WT, bei einer Abweichung von maximal $3,9 \pm 1,1$ dB (2,8 kHz) hörten beide Versuchskohorten vergleichbar. Die besten HS lagen bei beiden Gruppen bei 11,3 kHz und waren nicht unterschiedlich (WT: $15,4 \pm 5,9$ dB; KO: $16,8 \pm 5,3$ dB). Die HS wurden zu tiefen (2 kHz, WT: $70,8 \pm 5,0$ dB; KO: $73,5 \pm 4,5$ dB) und hohen Frequenzen (45,2 kHz, WT: $78,6 \pm 19,0$ dB; KO: $78,5 \pm 20,1$ dB) hin schlechter. Bei hohen Frequenzen streuten die individuellen Messwerte sehr viel stärker als bei niedrigen Frequenzen, was zu großen Standardabweichungen führte. Da die HS bei niedrigen Frequenzen konsistenter waren, führen in diesem Bereich kleine Abweichungen der Mittelwerte bereits zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen. Die gemittelte Klick-HS zwischen den Genotypen war bei den Slack^{+/+}-Tieren leicht, aber signifikant, gegenüber den Slack^{-/-}-Tieren erhöht (WT: $20,9$ dB \pm 3,5; KO: $22,6$ dB \pm 2,7). Hier ergibt sich durch eine hohe Anzahl an Individuen eine gewisse Effektstärke bei den signifikanten Unterschieden bei niedrigen Frequenzen, bei dem Slack^{-/-}-Tiere schlechtere HS besitzen als der Wildtyp.

Während sich bei dem auf Genotypen reduzierten Vergleich zwischen Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-HS ein relativ homogenes Bild zeigte, stellten sich die gemittelten f-ABR-HS der getrennten Versuchsgruppen etwas differenzierter dar (Abb. 26B). Es war wichtig, die Unterschiede der Gruppen in der Ausgangssituation zu erfassen, da diese Ergebnisse die Grundlage für die Auswirkungen der folgenden Versuchsanordnungen (Schalltrauma-Gruppen oder Kontroll-Gruppen) bildeten.

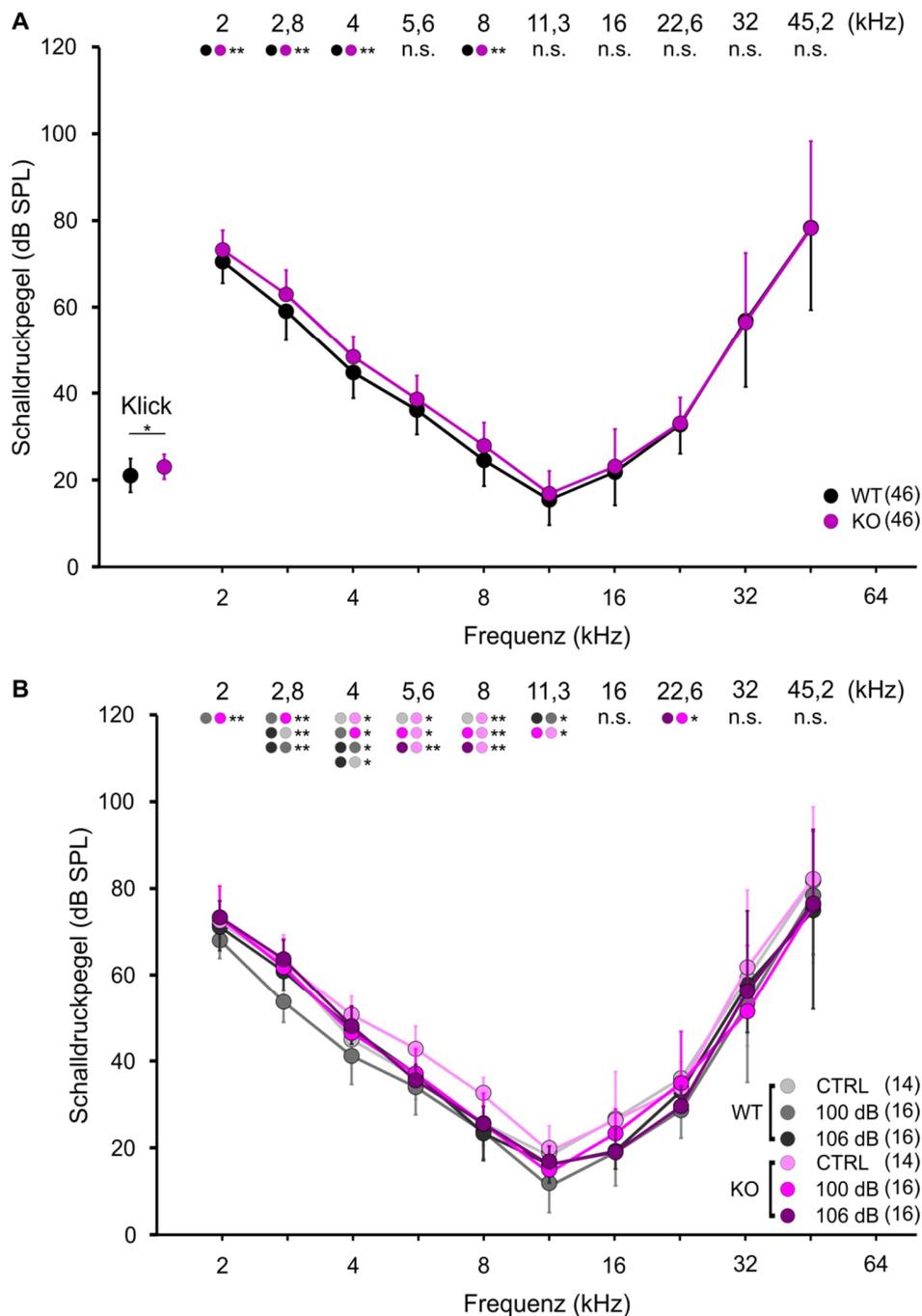


Abbildung 26: Initiale Audiogramme aller Versuchsgruppen im Vergleich.

A, B, Audiogramme der zwei Genotypen (**A**) und der verschiedenen Versuchsgruppen (**B**) im Vergleich. **A**, Gemittelte f-ABR-HS und gemittelte Klick-HS aller *Slack*^{+/+}-Mäuse (WT, schwarz, n = 46 Ohren) und *Slack*^{-/-}-Mäuse (KO, pink, n = 46 Ohren) an Tag -2 (Mann-Whitney-U-Test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). **B**, Die Audiogramme zeigen die gemittelten f-ABR-HS für jede Versuchsgruppe zu Beginn der Hörmessungen an Tag -2. Für jede Frequenz wurden die Gruppen gleichen Genotyps mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließender Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche auf statistische Signifikanz hin getestet. Ergänzt wurde diese Analyse durch den paarweise Mann-Whitney-U-Test zwischen den Genotypen, die

zusammen eine Versuchsanordnung (Kontrolle = CTRL, 100 dB SPL oder 106 dB SPL Schalltrauma) durchliefen; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Analog zu Abbildung 26A zeigten sich die deutlichsten Unterschiede im unteren Frequenzbereich in Abbildung 26B. Innerhalb des Genotyps „WT“ fällt die Gruppe der Tiere, die das 100 dB SPL Schalltrauma erhielten, heraus. Bei den Frequenzen 2,8 und 4 kHz lagen die gemittelten HS deutlich unter den HS anderer Versuchsgruppen. Die Abweichungen zum Mittel aller WT-Kurven betragen jedoch nur maximal 5,2 dB (bei 2,8 kHz) und sind damit physiologisch als nicht besonders abweichende HS zu bezeichnen. Ähnlich lag an Tag -2 das Audiogramm der KO-Kontrollmäuse im mittelfrequenten Bereich deutlich über denen der anderen Versuchsgruppen. Aber auch hier betragen die mittleren maximalen Abweichungen 4,6 dB (bei 8 kHz) und waren damit bei einer 5 dB-Schritt genauen Auswertung noch im normalen Bereich. Da gerade im tieffrequenten Bereich die Standardabweichungen der HS gering waren, ergaben sich auch hier einige signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, sowohl innerhalb eines Genotyps als auch zwischen unterschiedlichen Genotypen mit gleichem Versuchsdesign. Darüber hinaus lagen die Audiogramme gerade im hochfrequenten Bereich sehr eng zusammen, sodass alle Gruppen in den folgenden Versuchen in Bezug zueinander gesetzt werden können und Rückschlüsse zwischen unterschiedlichen Versuchstagen und Genotypen zulässig waren.

3.2.4 Auswirkungen eines milden Schalltraumas

3.2.4.1 Veränderung der Hörschwellen nach Klick-Stimulus

Jeweils acht $Slack^{+/+}$ - und $Slack^{-/-}$ -Mäuse im Alter von $P55 \pm 0,6$ Tagen wurden einem Schalltrauma von 100 dB SPL für 2 h mit einem Breitbandrauschen von 8 - 16 kHz ausgesetzt. Bei jedem Tier wurden nach dem Trauma zunächst an einem Ohr eine Klick-stimulierte ABR-Messung und anschließend eine f-ABR-Messung durchgeführt, danach erfolgte der Seitenwechsel.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der gemittelten Klick-HS (Abb. 27A) und die gemittelten ABR-Wellenformen (Abb. 27B) vor (Tag -2), direkt nach (Tag 0) und vier Wochen nach dem Trauma (Tag 28).

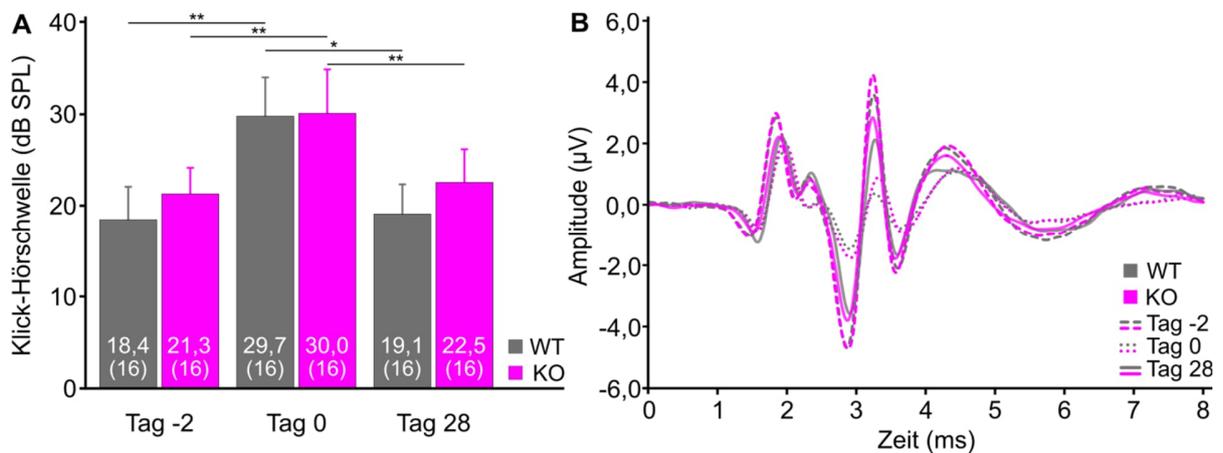


Abbildung 27: Keine dauerhafte Erhöhung der Klick-Hörschwellen nach einem 100 dB SPL Trauma, jedoch Reduktion der gemittelten Amplituden der ABR-Wellen.

A, B, Klick-ABR-Hörschwellen (**A**) und gemittelte Amplituden der ABR-Wellen (**B**) 30 dB über der Hörschwelle von *Slack*^{+/+}-Mäusen (grau) und *Slack*^{-/-}-Mäusen (pink) vor dem 100 dB-SPL Trauma (Tag -2), direkt nach dem Trauma (Tag 0) und nach vier Wochen Regeneration (Tag 28). **A,** Das Schalltrauma erhöhte die Hörschwellen an Tag 0, bis Tag 28 sanken die Schwellen wieder ab. Statistik: WT/KO: Mann-Whitney-U-Test, Versuchstage: Wilcoxon-Rang-Test mit Bonferroni-Korrektur; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. **B,** Gemittelte Klick-ABR-Wellen 30 dB über der individuellen Hörschwelle der einzelnen Versuchstierohren vor dem Trauma (Tag -2, gestrichelte Wellenform), direkt nach (Tag 0, gepunktete Wellenform) und 28 Tage nach dem Trauma (durchgezogene Wellenform).

Die Klick-Schwellen erhöhten sich im Mittel nach dem Trauma um ca. 10 dB (WT: + 11,3 dB; KO: + 8,7 dB). und regenerierten innerhalb von vier Wochen weitgehend (von auf Tag -2 zu Tag 28 WT: + 0,7 dB; KO: + 1,2 dB). Am jeweiligen Versuchstag gab es zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede, wohingegen zwischen den aufeinanderfolgenden Versuchstagen innerhalb eines Genotyps signifikante Unterschiede auftraten. Zwischen Beginn und Ende des Experiments (Tag -2 und Tag 28) traten bei den Klick-HS keine signifikanten Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Amplituden der gemittelten Wellenformen (30 dB über HS) von *Slack*^{+/+}- und *Slack*^{-/-}-Mäusen nach starker Reduzierung direkt nach dem Trauma vier Wochen später nur eine teilweise Erholung (Abb. 27B). Dies wird besonders bei Welle III, die den Bereich des *Superior olivary complex* widerspiegelt, deutlich. Für Welle I deutet sich eine leichte Amplitudenreduktion an.

3.2.4.2 Veränderung der frequenzspezifischen Hörschwellen

Nach der Klick-ABR-Messung erfolgte zur frequenzspezifischen Analyse der HS immer eine f-ABR-Messung.

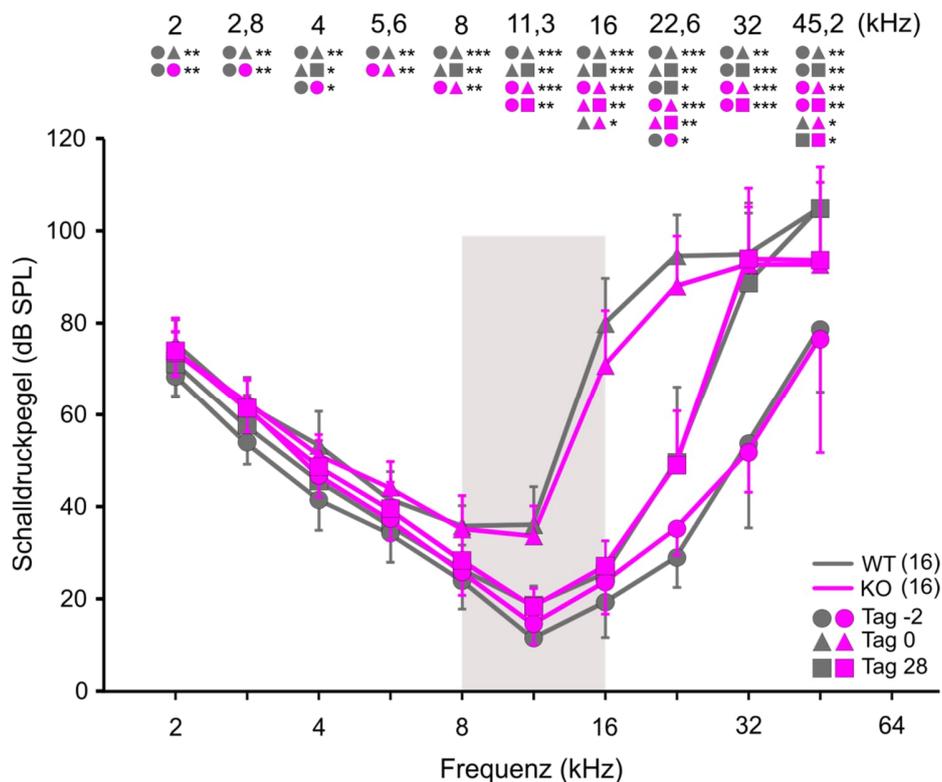


Abbildung 28: Kurzfristige und dauerhafte frequenzabhängige Hörschwellenveränderungen bei Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-Mäusen nach einem Schalltrauma von 100 dB SPL.

Gemittelte f-ABR-Schwellen der Slack^{+/+}-Mäuse (WT, grau, n = 16 Ohren) und Slack^{-/-}-Mäuse (KO, pink, n = 16 Ohren) vor (Tag -2, Kreise), nach (Tag 0, Dreiecke) und vier Wochen nach Trauma (Tag 28, Quadrate). Der graue Bereich deutet das Frequenzband des Traumas (8 – 16 kHz) an. Pro Frequenz und pro Zeitpunkt wurden paarweise Mann-Whitney-U-Tests zwischen WT und KO durchgeführt. Diese wurden durch frequenzspezifische, Genotyp-interne Gruppenvergleiche (Friedmann-Test mit Bonferroni-Korrektur) ergänzt. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Die gemittelten HS vor dem Trauma (Abb. 28; Tag -2, Kreise) zeigten für beide Genotypen die niedrigsten Werte im Bereich des besten Hörens bei 11,3 kHz. Zu besonders niedrigen und besonders hohen Frequenzen stiegen die Schwellen an, wobei bei hohen Frequenzen die individuellen Unterschiede deutlich ausgeprägter waren, was sich an den großen Standardabweichungen zeigt. Direkt nach dem Schalltrauma (Tag 0, Dreiecke) waren die HS zwischen 2 und 8 kHz kaum verändert, jedoch bei Frequenzen ≥ 8 kHz z.T. deutlich erhöht. Diese temporäre Schwellenverschiebung (*temporary threshold shift*, TTS) erholte sich vier Wochen nach dem Schalltrauma (Tag 28, Quadrate) weitgehend. Jedoch blieb im Hochfrequenzbereich (32 kHz, 45 kHz) eine permanente Schwellenverschiebung (*permanent threshold shift*, PTS) zurück. Statistisch wurden die Unterschiede zwischen den Genotypen sowie zwischen den Tagen pro Frequenz untersucht. Dabei wurde deutlich, dass signifikante Unterschiede bei hohen Frequenzen häufiger auftraten als im bei niedrigen Frequenzen. Am Tag -2 (Kreise) waren die mittleren HS der Slack^{-/-}-Mäuse bei den tiefen Frequenzen von 2 kHz - 4 kHz minimal, aber

signifikant höher als die als die HS der Slack^{+/+}-Mäuse, was auch bei 22,6 kHz beobachtet wurde. Am Tag direkt nach dem Trauma (Dreiecke) lagen die HS der Slack^{-/-}-Mäuse im hochfrequenten Bereich unter denen der Slack^{+/+}-Mäuse. Das bedeutet, dass die Schwellen der Wildtypen durch das Trauma stärker erhöht wurden als für die KO-Tiere. Vier Wochen nach dem Trauma (Tag 28, Quadrate) zeigten Wildtypen nur noch bei 45,2 kHz signifikante schlechtere HS als die Slack^{-/-}-Mäuse. Zwischen den Versuchstagen gab es für die HS im hochfrequenten Bereich pro Frequenz insgesamt mehr signifikante Unterschiede. Bezogen auf den Genotyp gab es bei den WT-Tieren mehr signifikante Unterschiede als bei den Slack^{-/-}-Tieren, sogar im niedrigfrequenten Bereich im Vergleich vor dem Trauma (Kreise) bezogen auf direkt nach dem Trauma (Dreiecke, Abb. 28).

Abbildung 29 zeigt die Folgen eines Schalltraumas von 100 dB SPL als Schwellenverschiebung für die Zeitpunkte direkt nach dem Trauma (Tag 0, gestrichelte Linie) und 4 Wochen nach Trauma (Tag 28, durchgezogene Linie).

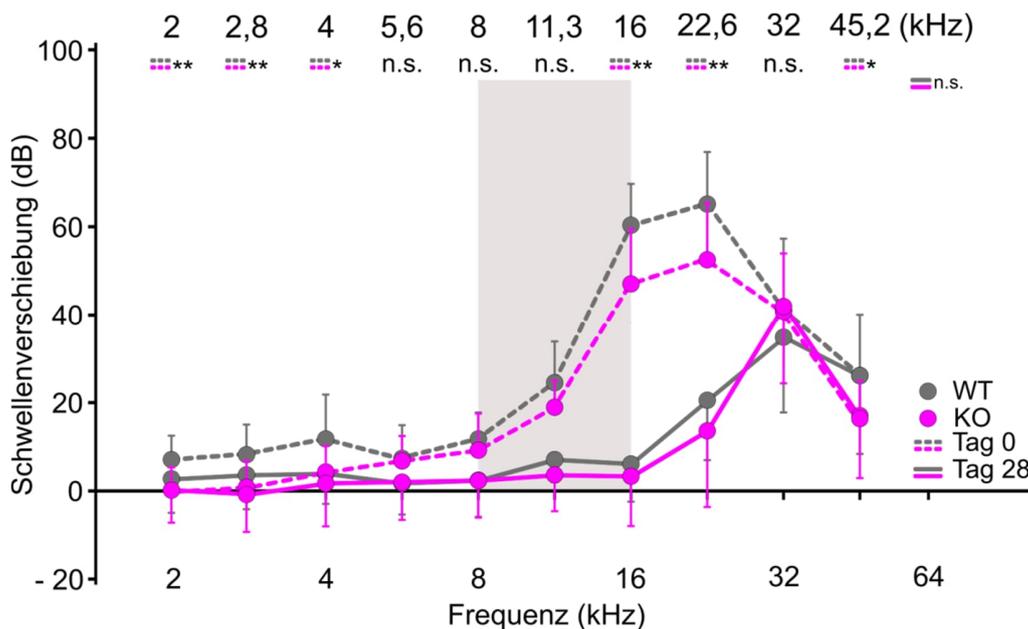


Abbildung 29: Hörschwellenverschiebung direkt und vier Wochen nach einem 100 dB SPL Trauma. Mittlere Hörschwellendifferenz zur initialen Hörmessung an Tag -2 direkt nach dem 100 dB Trauma (Tag 0, gestrichelte Linien, TTS) und 4 Wochen später (Tag 28, durchgezogene Linien, PTS) der Slack^{+/+}- (grau) und der Slack^{-/-}-Versuchsgruppe (pink). Der graue Balken deutet das Frequenzband der Vertäubung an. Zur statistischen Analyse wurden für beide Messzeitpunkte und jede Hörfrequenz jeweils Mann-Whitney-U-Tests zwischen WT und KO durchgeführt (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Die Schwellenverschiebungen wurden besonders oberhalb der Frequenzen des Traumas (8-16 kHz, grauer Kasten) sichtbar. Über den gesamten Frequenzbereich waren bei 22,6 kHz die Effekte sowohl bei den Slack^{+/+}-Mäusen mit 65,6 dB als auch bei den Slack^{-/-}-Mäusen mit 52,8 dB am deutlichsten. Überraschenderweise war die TTS bei den Slack^{+/+}-Mäusen für viele Frequenzen

signifikant größer als bei den Slack^{-/-}-Mäusen. Nach vier Wochen erholten sich die HS im hochfrequenten Bereich nicht vollständig und es blieben bei 32 kHz eine PTS von 35 dB bei der Slack^{+/-}- und von 42,2 dB bei der Slack^{-/-}-Gruppe zurück. Diese Effekte waren zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich.

Hingegen war die Regeneration der Hörschwellen (Abb. 30) innerhalb von vier Wochen bei einigen Frequenzen zwischen Slack^{+/-}- und Slack^{-/-}-Mäusen signifikant verschieden. Für die vom Schalltrauma am stärksten betroffenen Frequenzbereiche (16 - 22,6 kHz) zeigten die WT-Gruppe eine bessere Regenerationsfähigkeit als die Slack^{-/-}-Gruppe. Obwohl bei 32 kHz generell nur wenig Regeneration stattfand, erfolgte bei den WT-Mäusen eine signifikant bessere Erholung der Hörschwellen als bei den KO-Mäusen.

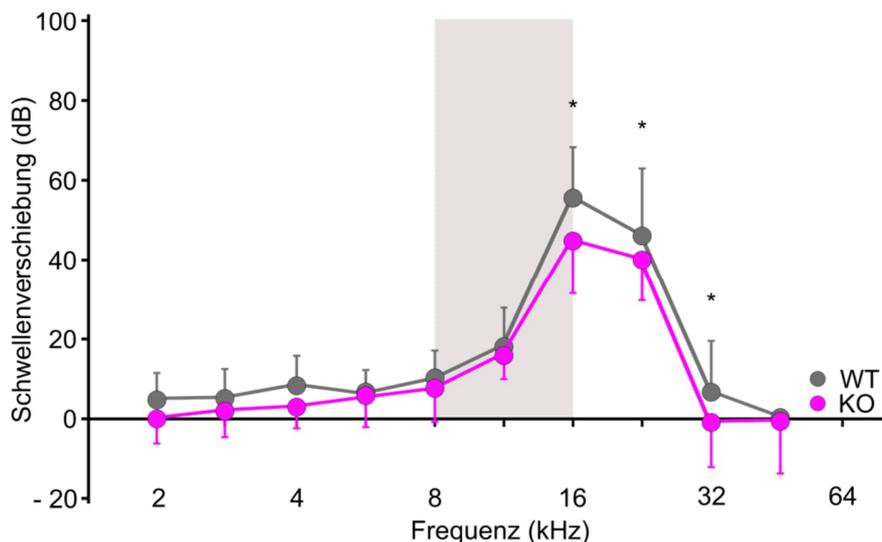


Abbildung 30: Regenerationsvermögen der f-ABR-Hörschwellen vier Wochen nach einem Schalltrauma von 100 dB SPL.

Frequenzabhängige Regeneration als mittlere Differenz der Hörschwellen direkt nach dem 100 dB SPL Trauma (Tag 0) und am Tag 28 für die Slack^{+/-}- (grau) und die Slack^{-/-}-Versuchsgruppe (pink). Der graue Balken deutet das Frequenzband der Vertäubung an. Zur statistischen Analyse wurden paarweise Mann-Whitney-U-Tests zwischen WT und KO durchgeführt (* $P < 0.05$).

3.2.4.3 Analyse der ABR-Welle I ohne und mit 100 dB SPL Schalltrauma

3.2.4.3.1 Amplituden

Die Amplituden der ABR-Welle I sind ein Maß für die synchronisierte Aktivität der Spiralganglienneurone (Liberman, 1982). Je höher der Schalldruckpegel, umso mehr Neurone/Fasern werden rekrutiert, daher steigen die Amplituden mit dem Schalldruckpegel an („Wachstumsfunktion“). Die Wachstumsfunktion hängt mit der Hörschwelle zusammen und ist daher in ihrer Spannweite und Form abhängig von der jeweiligen Frequenz (Abb. 31, linke Spalte).

Für die ausgewählten Frequenzen von 11,3, 16, 22,6 und 32 kHz führte das Trauma von 100 dB SPL bei beiden Genotypen nach 4 Wochen zu einer Abnahme der Amplituden der Welle I (Abb. 31, rechte Spalte).

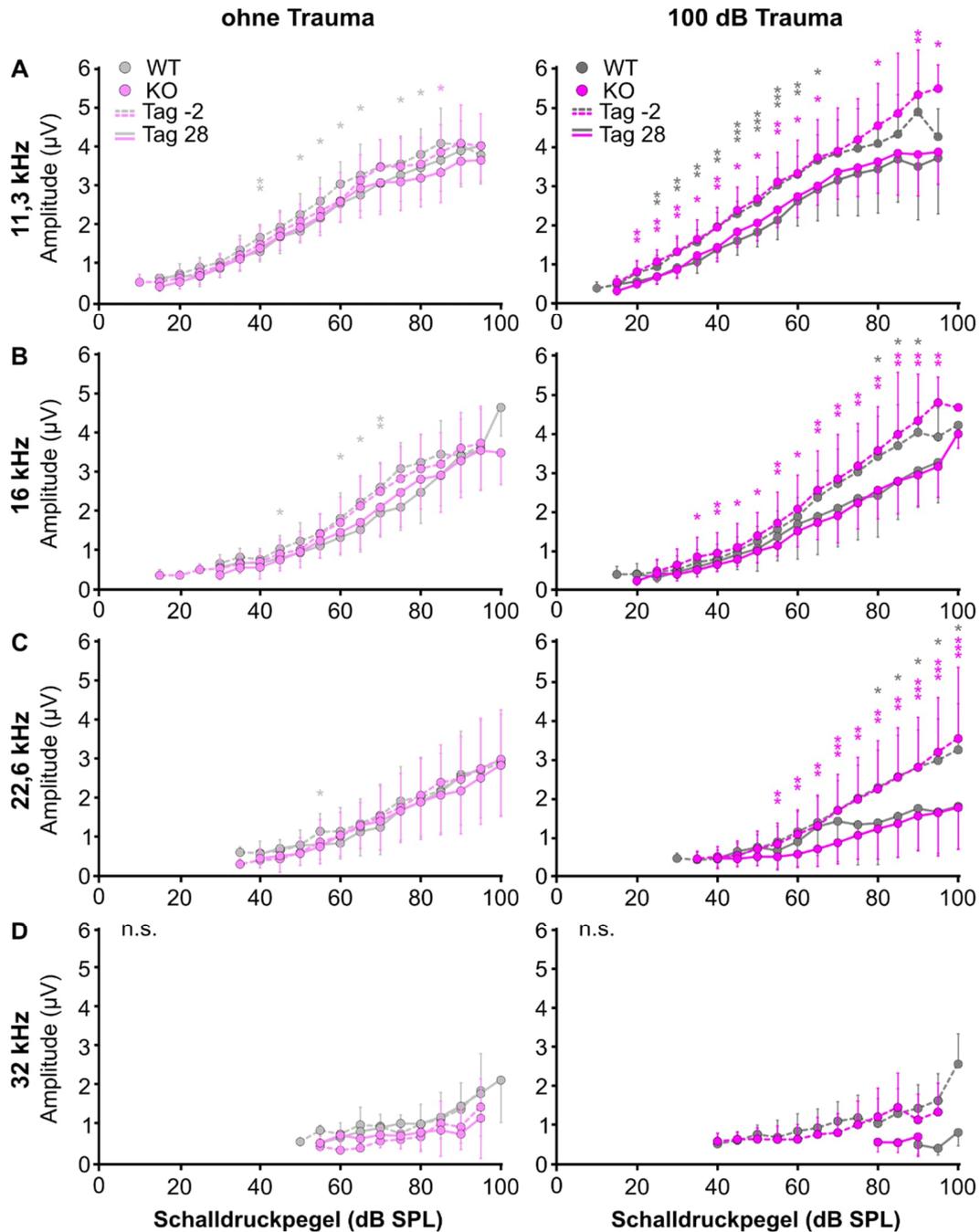


Abbildung 31: Wachstumsfunktionen der Amplituden der ABR-Welle I für ausgewählte Frequenzen bei *Slack*^{+/+}- und *Slack*^{-/-}-Mäusen ohne bzw. mit einem Schalltrauma von 100 dB SPL.

A-D, Die Wachstumsfunktionen wurden für die Versuchsgruppen der *Slack*^{+/+}-Mäuse (hellgrau und grau) und der *Slack*^{-/-}-Mäuse (hellpink und pink) ohne Trauma (linke Spalte) und mit 100 dB SPL Trauma (rechte Spalte) an Tag -2 (gestrichelte Linie) und Tag 28 (durchgezogene Linie) für 11,3 kHz (A), 16 kHz (B),

22,6 kHz (C) und 32 kHz (D) ermittelt. Der zunehmende Hörschaden nach Trauma und bei hohen Frequenzen führte z.T. dazu, dass keine Amplituden ermittelt werden konnten. Mittelwerte wurden nur dann berechnet und dargestellt, wenn pro Gruppe und Pegel mindestens 3 Einzelwerte vorhanden waren. Zur statistischen Analyse der Amplituden vor Trauma (Tag -2) und nach Trauma (Tag 28) innerhalb eines Genotyps wurde der paarweise Wilcoxon-Rangtest für zeitlich verbundene Stichproben verwendet; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Bei 32 kHz war die Abnahme nicht signifikant, was vermutlich auf die selbst ohne Trauma kleinen Amplituden aufgrund der hohen Hörschwelle sowie die geringe Anzahl Daten pro Gruppe, insbesondere nach Trauma, zurückzuführen ist.

Vergleicht man die Entwicklung der ABR-Welle I-Amplituden innerhalb eines Genotyps über vier Wochen anhand statistisch signifikanter Reduktionen, ist die Anzahl der Signifikanzen ohne Trauma geringer als mit Trauma. Dieser Effekt ist bei der Frequenz des besten Hörens (11,3 kHz) am ausgeprägtesten und nimmt zu höheren Frequenzen hin ab. Bei 22,6 kHz zeigen weder die unvertäubten WT- noch die KO-Tiere signifikante Veränderungen über die Zeit im Gegensatz zu den Tieren, die ein Schalltrauma erfahren haben. Vor allem die Kohorte der Slack^{-/-}-Tiere wies bei 16 und 22,6 kHz eine signifikante Reduktion der Amplituden bereits bei geringen Schallpegeln nach dem Trauma auf.

Zusammengefasst zeigen die ABR-Wachstumsfunktionen der unvertäubten Kontrolltiere, dass es insbesondere bei den WT bei 11,3 kHz eine geringe, aber signifikante Reduktion der Amplituden der Welle I gibt, was eine frühe Verschlechterung des Hörvermögens im Alter von nur 12 Wochen zeigt, wie sie für den Hintergrund der C57Bl6/N-Mäuse bereits gezeigt wurde (Kane et al., 2012). Dieser Effekt war bei den Slack^{-/-}-Tieren weniger ausgeprägt. Die Daten belegen weiterhin, dass das Schalltrauma von 100 dB SPL eine Reduktion der Amplituden der Welle I zur Folge hatte. Die Amplitudenreduktion nach Trauma war bei den Frequenzen 16 und 22,6 kHz bei der KO-Gruppe stärker ausgeprägt.

3.2.4.3.2 Latenzen

Während die Amplituden der Welle I ein Maß für die Stärke der gleichzeitigen Erregung von SGN sind, gibt eine Latenz Auskunft vor allem über die Geschwindigkeit der Verarbeitung von neuronalen Signalen.

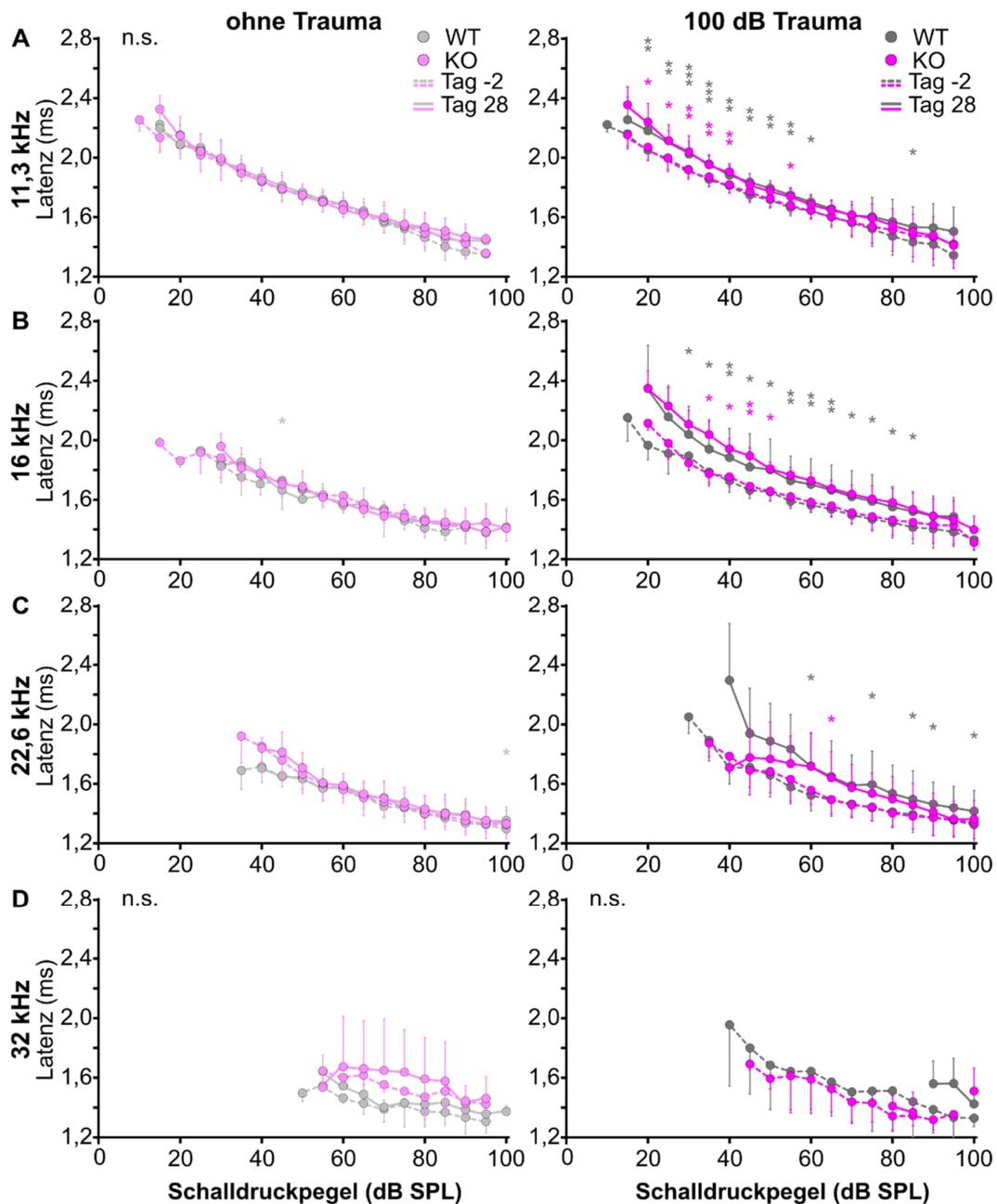


Abbildung 32: Einfluss eines Schalltraumas von 100 dB SPL auf die pegelabhängigen Latenzen der ABR-Welle I bei *Slack*^{+/+}- und *Slack*^{-/-}-Mäusen für die Frequenzen 11,3 kHz, 16 kHz, 22,6 kHz und 32 kHz.

A-D, gemittelte Latenzfunktionen der *Slack*^{+/+}-Mäuse (hellgrau und grau) und der *Slack*^{-/-}-Mäuse (hellpink und pink) ohne Trauma (linke Spalte) und mit 100 dB Trauma (rechte Spalte) an Tag -2 (gestrichelte Linie) und Tag 28 (durchgezogene Linie) für 11,3 kHz (**A**), 16 kHz (**B**), 22,6 kHz (**C**) und 32 kHz (**D**). Zur statistischen Analyse der Latenzen vor Trauma (Tag -2) und nach Trauma (Tag 28) innerhalb eines Genotyps wurde der paarweise Wilcoxon-Rangtest für zeitlich verbundene Stichproben verwendet; Mittelwerte sind nur mit $n \geq 3$ aufgeführt; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Die Latenzen der ABR-Welle I beinhalten sowohl die Geschwindigkeit der neuronalen Signalverarbeitung als auch die Synchronizität der Aktivität der Neurone. Typischerweise sinken für eine gegebene Frequenz die Latenzen mit zunehmendem Schalldruckpegel. Andererseits steigen für einen gegebenen Pegel die Latenzen mit abnehmender Frequenz, weil die Wanderwelle mehr Zeit benötigt, um tieferfrequente Bereiche anzuregen. Für ausgewählte Frequenzen (Abb. 32 A-D: 11,3 - 32 kHz) wurden pegelabhängige Latenzfunktionen erstellt, wobei für jeden Pegel und jede Gruppe mindestens 3 Werte vorhanden sein mussten (s.o.). Bei den Versuchsgruppen ohne Trauma (Abb. 32, linke Spalte) unterschieden sich die Latenzen zwischen Tag -2 und Tag 28 bei beiden Genotypen nicht. Das zeigt einen funktionellen Verlust von SGN-Typ-I-Fasern. Da an Tag 28 die Latenzen jeweils schon bei niedrigen Pegeln höher waren als an Tag -2, müssen auch schwellenbestimmende Typ-Ia-Fasern funktionslos geworden sein, die eigentlich als robust gelten (Kujawa & Liberman, 2009). Möglicherweise wurden ihre zugehörigen Ribbons durch das Trauma zerstört, s.u.. Vergleicht man die Entwicklung innerhalb des Genotyps vor und vier Wochen nach Trauma anhand statistisch signifikanter Veränderungen, nahmen wie bei den Amplituden die Anzahl der signifikanten Unterschiede pro Pegel mit steigender Frequenz ab. Bei 11,3 kHz erzeugte das Trauma (Abb. 32A, rechts) deutliche Unterschiede bei der Slack^{+/-}-Gruppe (hellgrau), vor allem in Bereichen mit niedrigen Schalldrücken. Die Trauma-bedingte Latenzerhöhung bei den WT-Mäusen wurde auch bei 16 und 22,6 kHz beobachtet, jedoch war sie hier eher zu höheren Pegeln verschoben. Bei den Slack^{-/-}-Tieren war die Latenzerhöhung als Folge des Traumas weniger prägnant ausgeprägt.

Es sollte noch festgehalten werden, dass sich die Latenzfunktionen der unvertäubten Tiere am Tag -2 sowohl aus der Kontrollgruppe (Abb. 32, links) als auch aus der Vertäubungsgruppe (Abb. 32 rechts) – zwischen WT und KO praktisch nicht unterschieden. Gleichermaßen bewirkte das Schalltrauma von 100 dB SPL gleichartige Latenzerhöhungen für die Frequenzen 11,3, 16 und 22,6 kHz für beide Genotypen, mit Ausnahme der Pegel ≤ 50 dB SPL bei 22,6 kHz, wo die Latenzen der KO-Tiere niedriger lagen.

3.2.5 Auswirkungen eines moderaten Schalltraumas

3.2.5.1 Veränderung der Hörschwellen nach Klick-Stimulus

Je acht *Slack*^{+/+}- und *Slack*^{-/-}-Mäusen (P55 ± 0,3) wurden einem Schalltrauma von 106 dB SPL (Breitbandrauschen von 8 - 16 kHz) für 2 h exponiert. Die Erhöhung um 6 dB entspricht einer Verdopplung des Schalldrucks gegenüber dem Trauma von 100 dB SPL. Wie bei den Versuchen mit dem 100 dB SPL Trauma wurden bei jedem Versuchstier zwei Tage vor und direkt nach dem Schalltrauma pro Ohr eine Klick-stimulierte ABR-Messung und anschließend eine f-ABR-Messung durchgeführt.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse der gemittelten Klick-HS (Abb. 33A) und die gemittelten ABR-Wellenformen (Abb. 17B) vor (Tag -2), direkt (Tag 0) und vier Wochen nach (Tag 28) dem Trauma dargestellt.

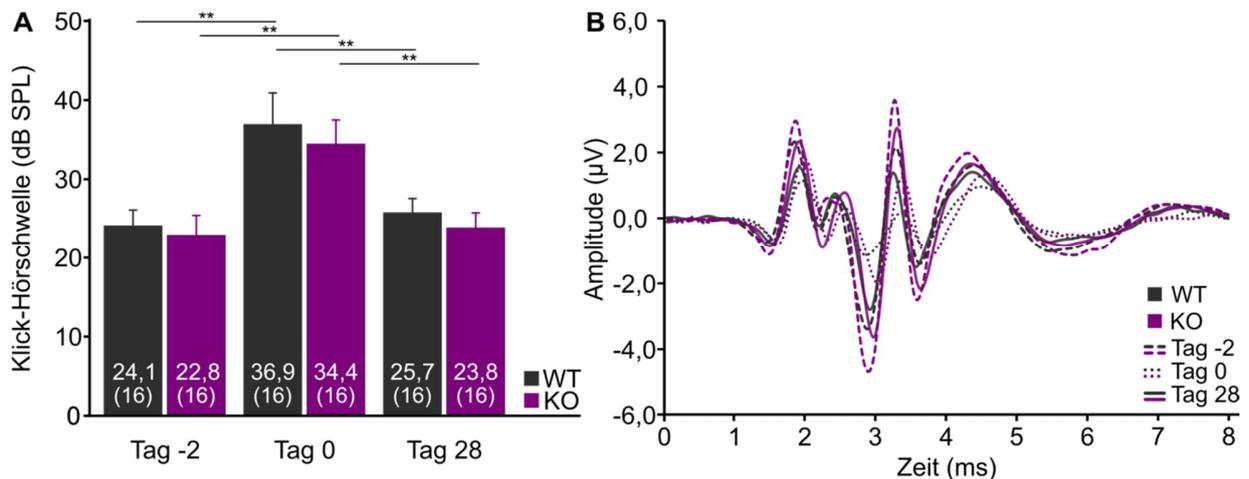


Abbildung 33: Kaum Erhöhung der Klick-HS nach einem 106 dB SPL Trauma, jedoch Reduktion der gemittelten Amplituden und Erhöhung der Latenzen der ABR-Wellen.

A, B, Klick- ABR Hörschwellen (**A**) und gemittelte Klick-ABR-Wellen (**B**) 30 dB über der Hörschwelle von *Slack*^{+/+}-Mäusen (dunkelgrau) und *Slack*^{-/-}-Mäusen (dunkelpink) vor dem 106 dB-SPL Trauma (Tag -2), direkt nach dem Trauma (Tag 0) und nach vier Wochen Regeneration (Tag 28). **A,** Das Trauma erhöhte die Klick-Schwellen an Tag 0 für beide Genotypen. Vier Wochen nach dem Schalltrauma nahmen die Schwellen für beide Genotypen wieder ab und waren in Bezug auf Tag -2 jeweils nicht signifikant verschieden. Zwischen den Genotypen an einem Versuchstag gab es keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Zwischen aufeinanderfolgenden Versuchstagen innerhalb eines Genotyps bestehen signifikante Unterschiede (Wilcoxon-Rang-Test mit Bonferroni-Korrektur). **B,** Gemittelte Klick-ABR-Wellenformen 30 dB über der individuellen Hörschwelle der einzelnen Versuchstierohren vor dem Trauma (Tag -2, gestrichelt), direkt nach (Tag 0, gepunktet) und 28 Tage nach dem Trauma (durchgezogene Linie).

Das Schalltrauma von 106 dB SPL führte zur Erhöhung der Klick-Hörschwellen (Abb. 33A) an Tag 0 verglichen mit den Schwellen vor dem Trauma beim WT um 12,8 dB und bei den KO-Tieren um 11,6 dB. Diese Trauma-induzierten Erhöhungen waren sowohl bei *Slack*^{+/+}- (dunkelgrau) und

Slack^{-/-}-Mäusen (dunkelpink) nur geringfügig höher als bei dem Schalltrauma von 100 dB SPL. Entsprechend erholten sich die HS in den vier Wochen nach dem Trauma und waren an Tag 28 in Bezug auf Tag -2 nicht signifikant verändert. Zwischen den Genotypen gab es keine signifikanten Unterschiede an einem der Versuchstage. Die gemittelten ABR-Wellenformen (Abb. 33B) zeigten aber, dass durch das 106 dB SPL Schalltrauma eine deutliche Reduktion der Amplituden erfolgte, wobei die Amplituden der WT-Versuchsgruppe hierbei stärker verändert waren als die Amplituden der KO-Versuchsgruppe. Die Latenzen schienen weniger stark verändert, mit Ausnahme der Welle II (Bereich des *Nucleus cochlearis*), wo eine deutliche Zunahme der Latenz bei der Slack^{-/-}-Versuchsgruppe an Tag 28 vorlag.

3.2.5.2 Veränderung der frequenzspezifischen Hörschwellen

Nach der Klick-ABR-Messung erfolgte entsprechend zum 100 dB SPL Schalltrauma eine frequenzspezifische Analyse der HS (Abb. 34). An Tag -2 (Kreise) lagen die HS beider Genotypen sehr eng beieinander. Direkt nach dem Schalltrauma (Tag 0, Dreiecke) waren die HS bei beiden Genotypen zwischen 2 und 5,6 kHz nur wenig erhöht (um max. 10 dB); bei Frequenzen $\geq 5,6$ kHz zeigte sich jedoch eine deutliche und gleichartige Schwellenerhöhung, die in der Gruppe der WT-Tiere bei 11,3 kHz etwas stärker ausgeprägt war als in der KO-Gruppe.

Die TTS aller Frequenzen erholte sich zum Tag 28 nach dem Schalltrauma (Tag 28, Quadrate), jedoch blieb im mittleren bis höheren Frequenzbereich eine PTS zurück. Die Schäden dieses Traumas reichen in der WT-Gruppe im Vergleich mit dem 100 dB SPL Trauma (vgl. Abb. 28) bis 8 kHz, also weiter in den mittelfrequenten Bereich hinein, während in der KO-Gruppe ein PTS-Schaden erst bei 22,6 kHz auftrat. Statistisch wurden die Unterschiede zwischen den Genotypen sowie zwischen den Tagen pro Frequenz untersucht. Signifikante Unterschiede traten vor allem innerhalb der Genotypen und zwischen den einzelnen Versuchstagen auf. Nur für Tag 28 blieben bei 8 kHz und 11,3 kHz signifikant unterschiedliche HS zwischen WT und KO zurück, bei dem die HS der WT-Tiere über den HS der KO-Tiere lag.

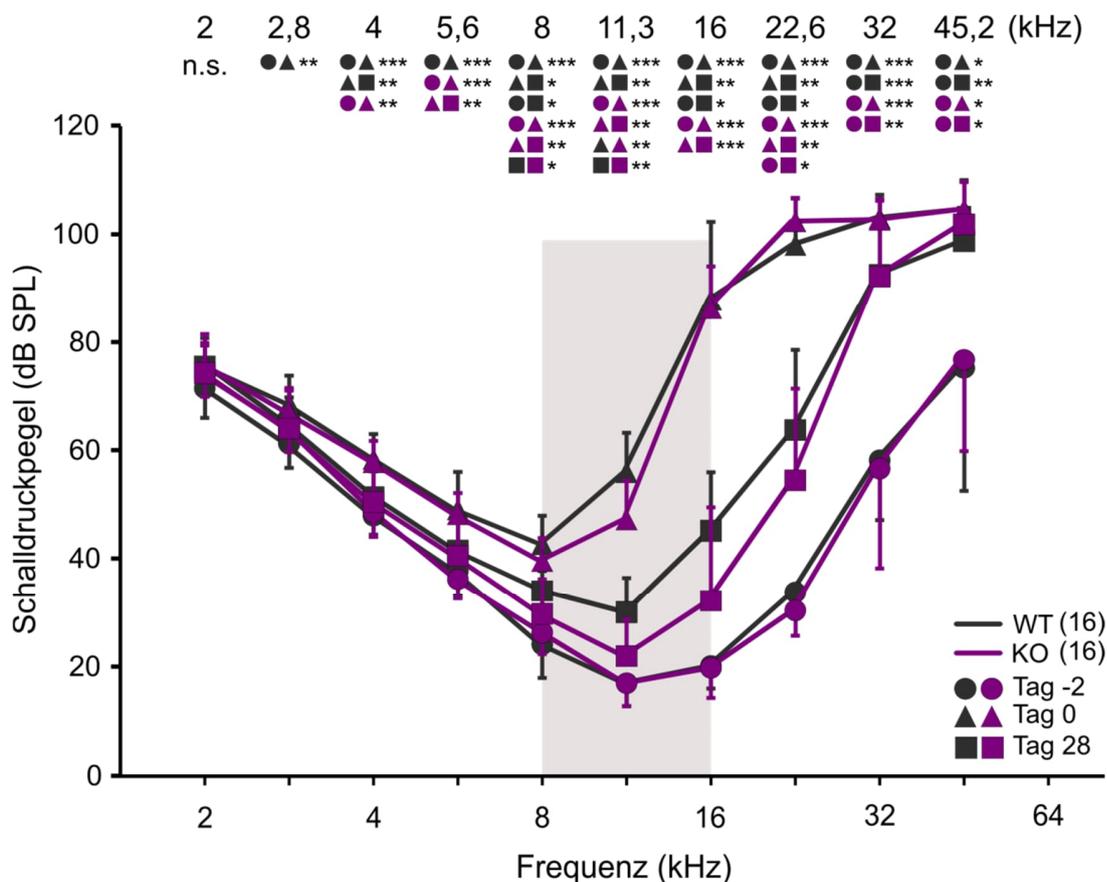


Abbildung 34: Temporäre und permanente frequenzabhängige Hörschwellerhöhungen von *Slack*^{+/-}- und *Slack*^{-/-}-Mäusen nach einem Schalltrauma von 106 dB SPL.

Gemittelte f-ABR-Schwellen der *Slack*^{+/-}-Mäuse (WT, dunkelgrau, n = 16 Ohren) und *Slack*^{-/-}-Mäuse (KO, dunkelpink, n = 16 Ohren) vor (Tag -2, Kreise), nach (Tag 0, Dreiecke) und vier Wochen nach Trauma (Tag 28, Quadrate). Der graue Bereich deutet das Frequenzband des Traumas (8 – 16 kHz) an, das für 2 h appliziert wurde. Pro Frequenz und pro Zeitpunkt wurden paarweise Mann-Whitney-U-Tests zwischen WT und KO durchgeführt. Diese wurden durch frequenzspezifische, Genotyp-interne Gruppenvergleiche (Friedmann-Test mit Bonferroni-Korrektur) ergänzt. * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01; *** *P* < 0.001.

Abbildung 35 zeigt die Folgen eines Schalltraumas von 106 dB SPL als Schwellenverschiebung für die Zeitpunkte direkt nach dem Trauma (Tag 0, gestrichelte Linie) und 4 Wochen nach Trauma (Tag 28, durchgezogene Linie). Das Schalltrauma von 106 dB SPL führte bei der WT- Gruppe zur größten absoluten Schwellenverschiebung bei 16 kHz (68,4 ± 16,9 dB). Bei der KO-Gruppe war die größte Verschiebung der gemittelten HS bei 22,6 kHz (72,8 ± 6,1 dB). Nach vier Wochen blieb eine PTS für Frequenzen ≥ 11,3 kHz bei beiden Versuchsgruppen zurück. Die deutlichste Verschlechterung der absoluten HS an Tag 28 lag bei der *Slack*^{-/-}-Gruppe (22,6 kHz: 36,6 ± 16,6 dB), aber auch beim WT war der Schaden im hochfrequenten Bereich nur wenig geringer (32 kHz: 34,2 ± 12,6 dB).

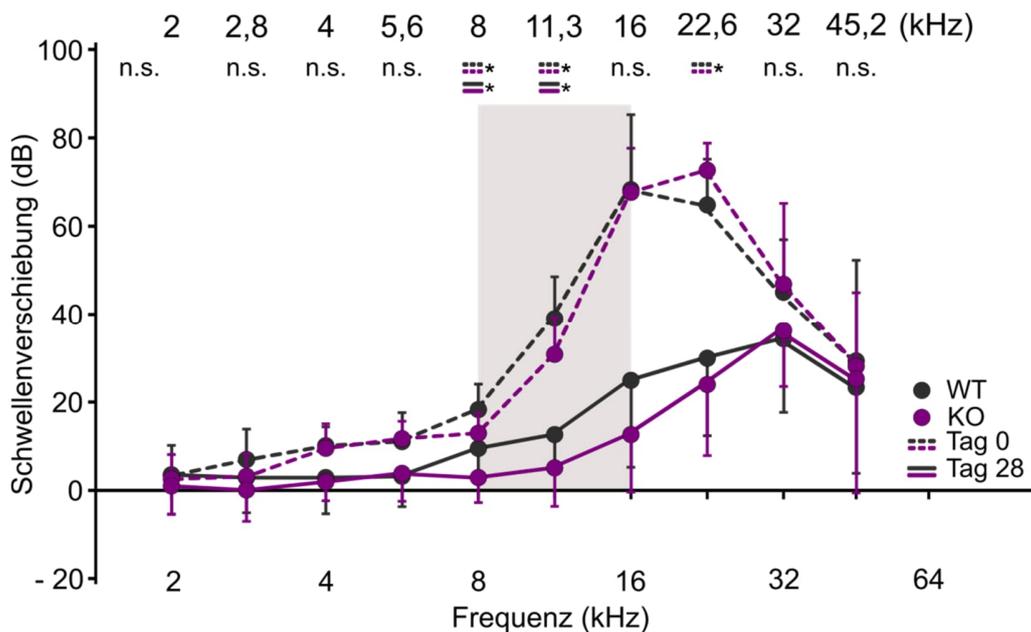


Abbildung 35: Hörschwellenverschiebung direkt und vier Wochen nach einem 106 dB SPL Trauma. Mittlere Hörschwellendifferenz zur initialen Hörmessung an Tag -2 direkt nach dem 106 dB Trauma (Tag 0, gestrichelte Linien, TTS) und 4 Wochen später (Tag 28, durchgezogene Linien, PTS) der *Slack^{+/-}*- (dunkelgrau) und der *Slack^{-/-}*-Versuchsgruppe (dunkelpink). Der graue Balken deutet das Frequenzband der Vertäubung an. Zur statistischen Analyse wurden für beide Messzeitpunkte und jede Hörfrequenz paarweise Mann-Whitney-U-Tests zwischen WT und KO durchgeführt (* $P < 0.05$).

Signifikante Unterschiede zwischen der Stärke der Veränderung bei den verschiedenen Genotypen zeigten sich vor allem für die mittleren Frequenzen (8 kHz und 11,3 kHz) sowohl für Tag 0 als auch Tag 28. In beiden Fällen liegen die mittleren HS der WT-Tiere über denen der KO-Tiere, was bedeutet, dass die WT-Mäuse bezogen auf die Ausgangshörschwellen durch das Trauma mehr Schaden nahmen. Eine Ausnahme bildete die Frequenz von 22,6 kHz. Hier deutete die mittlere HS auf den größeren Schaden bei der *Slack^{-/-}*-Gruppe für Tag 0. Am Tag 28 lag die mittlere HS jedoch sogar unter der der WT-Tiere, allerdings ohne Signifikanz, was wahrscheinlich an den hohen Standardabweichungen lag.

Als nächstes wurde die Regeneration der HS beider Genotypen vier Wochen nach Trauma analysiert. Die Regenerationsfähigkeit war bei beiden Genotypen sehr ähnlich, wobei die HS der *Slack^{-/-}*-Gruppe gegenüber der HS der *Slack^{+/-}*-Gruppe bei 22,6 kHz signifikant besser regenerierte (WT: 34,7 dB; KO: 48,4 dB; Abb. 36).

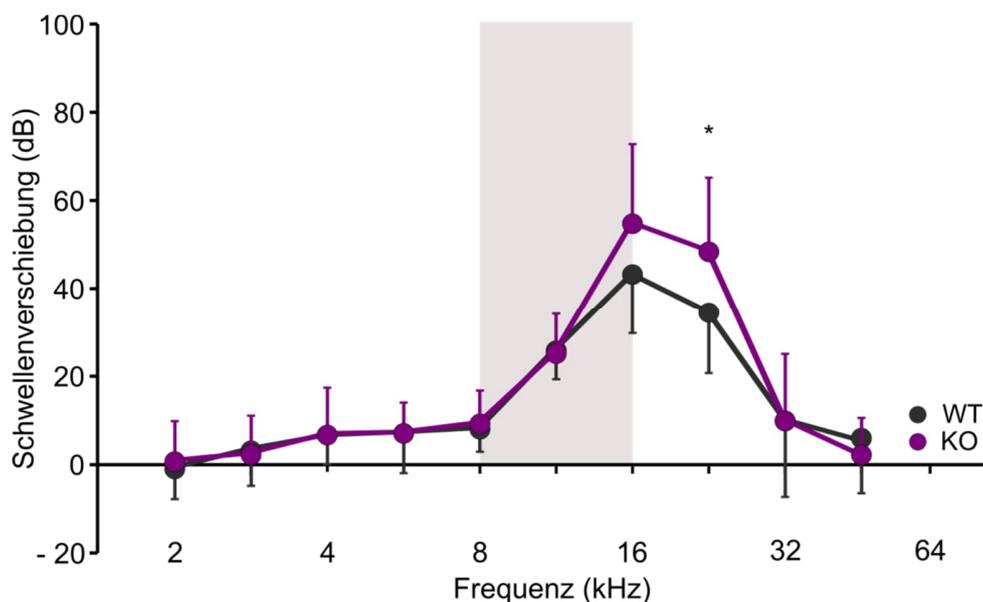


Abbildung 36: Regenerationsvermögen der f-ABR-Hörschwellen vier Wochen nach einem Schalltrauma von 106 dB SPL.

Frequenzabhängige Regeneration als mittlere Differenz der Hörschwellen direkt nach dem 106 dB SPL Trauma (Tag 0) und am Tag 28 für die *Slack*^{+/+}- (dunkelgrau) und die *Slack*^{-/-}-Versuchsgruppe (dunkelpink). Der graue Balken deutet das Frequenzband der Vertäubung an. Zur statistischen Analyse wurden paarweise Mann-Whitney-U-Tests zwischen WT und KO durchgeführt (* $P < 0.05$).

3.2.5.3 Analyse der ABR-Welle I nach dem 106 dB SPL Schalltrauma

3.2.5.3.1 Amplituden

Für die ausgewählten Frequenzen von 11,3, 16, 22,6 und 32 kHz wurden Amplituden (Abb. 37) und Latenzen der ABR-Welle I (Abb. 38) nach dem Trauma von 106 dB SPL bei beiden Genotypen ausgewertet und mit Amplituden und Latenzen nach dem 100 dB SPL Trauma verglichen. Während sich die WT-Gruppe des 106 dB SPL Versuchs bei den HS ohne Auffälligkeiten in das Gesamtbild an Tag -2 einpasste, lagen die Werte der WT-Gruppe bei den Parametern der ABR-Welle I schon zu Beginn der Messung (also vor dem Trauma) niedriger (Abb. 37, linke Spalte) als die der WT-Tiere des 100 dB SPL Versuchs (Abb. 37, rechte Spalte). Die Ursache dieser Abweichung ist unklar. Auf Basis dieser Erkenntnis erging die Entscheidung, keine statistischen Vergleiche zwischen der *Slack*^{+/+}- und *Slack*^{-/-}- Gruppe zu ziehen, sondern zwischen den zwei Versuchstagen innerhalb eines Genotyps zu ziehen.

Die Amplituden der Welle I nach dem höheren Schalltrauma verhielten sich wie für das erste Trauma beschrieben (vgl. Abb. 32); mit steigender Frequenz und steigendem Schalldruckpegel nahmen sie zu und zeigten die charakteristischen „Wachstumsfunktionen“. Es sei daran erinnert, dass die Amplituden der Kontrollen beider Genotypen ohne Schalltrauma bei den ausgewählten Frequenzen keine Reduktion der Amplitudenstärke nach 4 Wochen zeigten (Abb. 32).

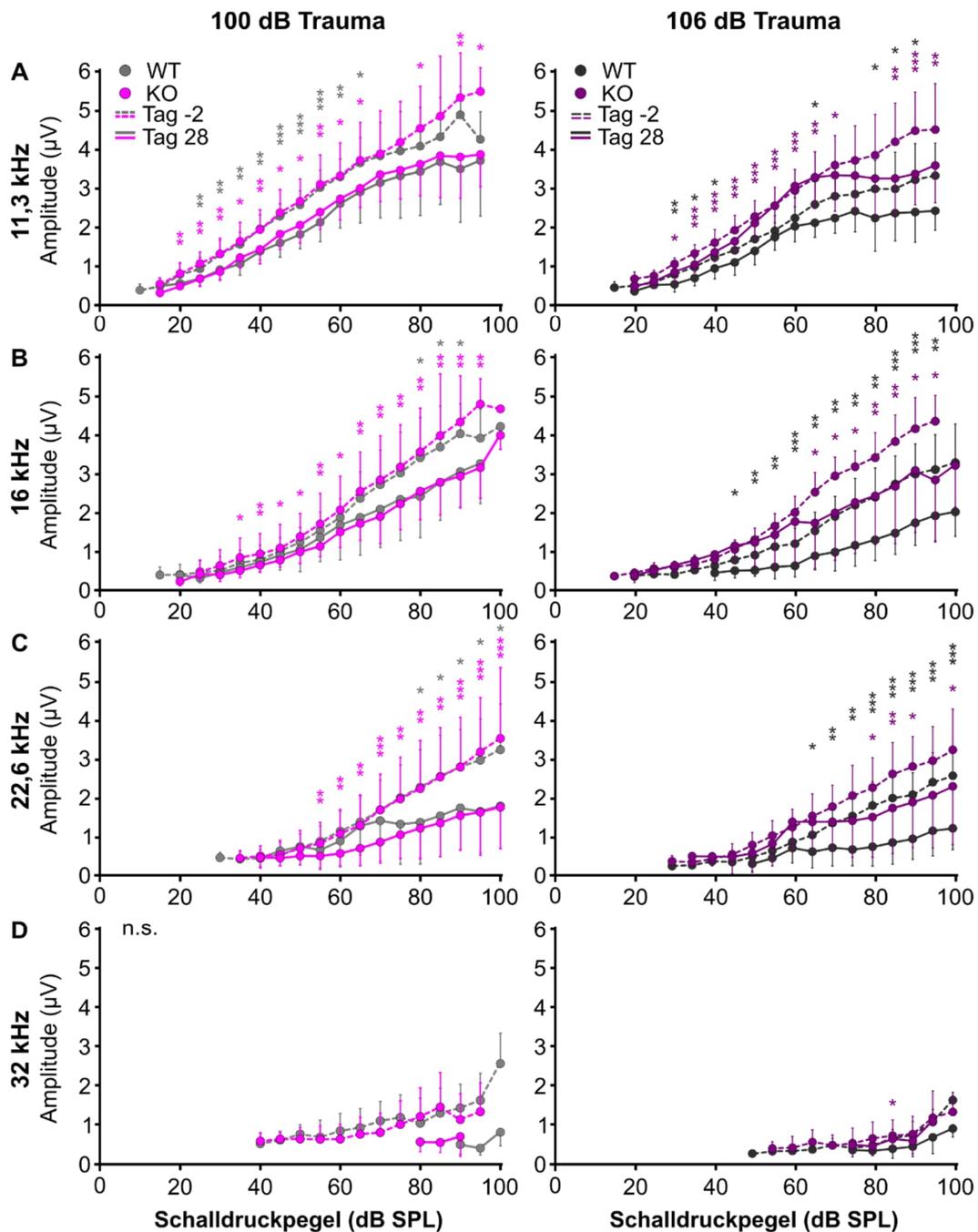


Abbildung 37: Wachstumsfunktionen der Amplituden der ABR-Welle I für ausgewählte Frequenzen bei $Slack^{+/+}$ - und $Slack^{-/-}$ -Mäusen mit einem Schalltrauma von 100 dB bzw. 106 dB SPL.

A-D, Die Wachstumsfunktionen wurden für die Versuchsgruppen der $Slack^{+/+}$ -Mäuse (grau und dunkelgrau) und der $Slack^{-/-}$ -Mäuse (pink und dunkelpink) mit 100 dB SPL Schalltrauma (linkes Spalte) oder mit 106 dB SPL Trauma (rechte Spalte) an Tag -2 (gestrichelte Linie) und Tag 28 (durchgezogene Linie) für 11,3 kHz (A), 16 kHz (B), 22,6 kHz (C) und 32 kHz (D) ermittelt. Der zunehmende Hörschaden nach Trauma und bei hohen Frequenzen führte z.T. dazu, dass keine Amplituden ermittelt werden konnten. Mittelwerte wurden nur dann berechnet und dargestellt, wenn pro Gruppe mindestens 3 Einzelwerte vorhanden waren. Zur statistischen Analyse der Amplituden vor Trauma (Tag -2) und nach Trauma (Tag 28) innerhalb eines

Genotyps wurde der paarweise Wilcoxon-Rangtest für zeitlich verbundene Stichproben verwendet; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Während die absolute Reduktion der Welle I-Amplituden bei allen Versuchsgruppen durch beide Traumata zwischen den Versuchstagen ähnlich war, war die Häufigkeit der signifikanten Unterschiede zwischen beiden Traumata verändert. Nach dem 100 dB SPL Trauma waren die statistisch signifikanten Reduktionen deutlicher auf Seiten der KO-Gruppe und nahm mit steigender Frequenz zu, während bei der WT-Gruppe die Anzahl der signifikanten Unterschiede abnahm (Abb. 37, linke Spalte). Vergleicht man dazu die Veränderungen der Versuchsgruppen des 106 dB SPL Schalltraumas fällt auf, dass mehr signifikante Abnahmen der Amplituden bei den Slack^{+/+}-Versuchstieren erfolgten als bei den Slack^{-/-}-Versuchstieren (Abb. 37, rechte Spalte). Dies zeigt, dass die Slack^{-/-}-Tiere weniger ausgeprägt auf das 106 dB SPL Trauma reagierten, als die Slack^{+/+}-Tiere, was schon bei den HS zu erkennen war (vgl. Abb. 34).

3.2.5.3.2 Latenzen

Die Latenzen der ABR-Welle I für das 106 dB SPL Trauma sind in Abb. 38 (rechte Spalte) dargestellt. Sie sind denen des 100 dB SPL Traumas (Abb. 38, linke Spalte) gegenübergestellt. Für die Latenzen der 106 dB SPL Trauma-Versuchsgruppen zeigt sich ein uneinheitlicheres Bild als für alle anderen Versuchsgruppen. Zum Beispiel lagen die Latenzen der ABR-Welle I beider Genotypen bei der Frequenz 11,3 kHz am Tag 28 bei hohen Schalldrücken unter denen des Tages -2, was bedeutet, dass nach dem Trauma eine minimal schnellere oder synchronere Signalverarbeitung in diesem Faserbereich stattfand. Dieser paradoxe Effekt wurde jedoch nur bei 11,3 kHz beobachtet, denn bei höheren Frequenzen waren die Latenzwerte am Tag 28 erwartungsgemäß gegenüber denen vom Tag -2 erhöht. Für die Frequenz 16 kHz (Abb. 38, rechts) zeigten sich auffällig erhöhte Latenzen bei mittleren Schalldrücken. Zusammengefasst bestätigt sich aber, dass es auch hier weniger Trauma-induzierte signifikante Veränderungen bei der KO-Gruppe gab als bei den WT-Tieren.

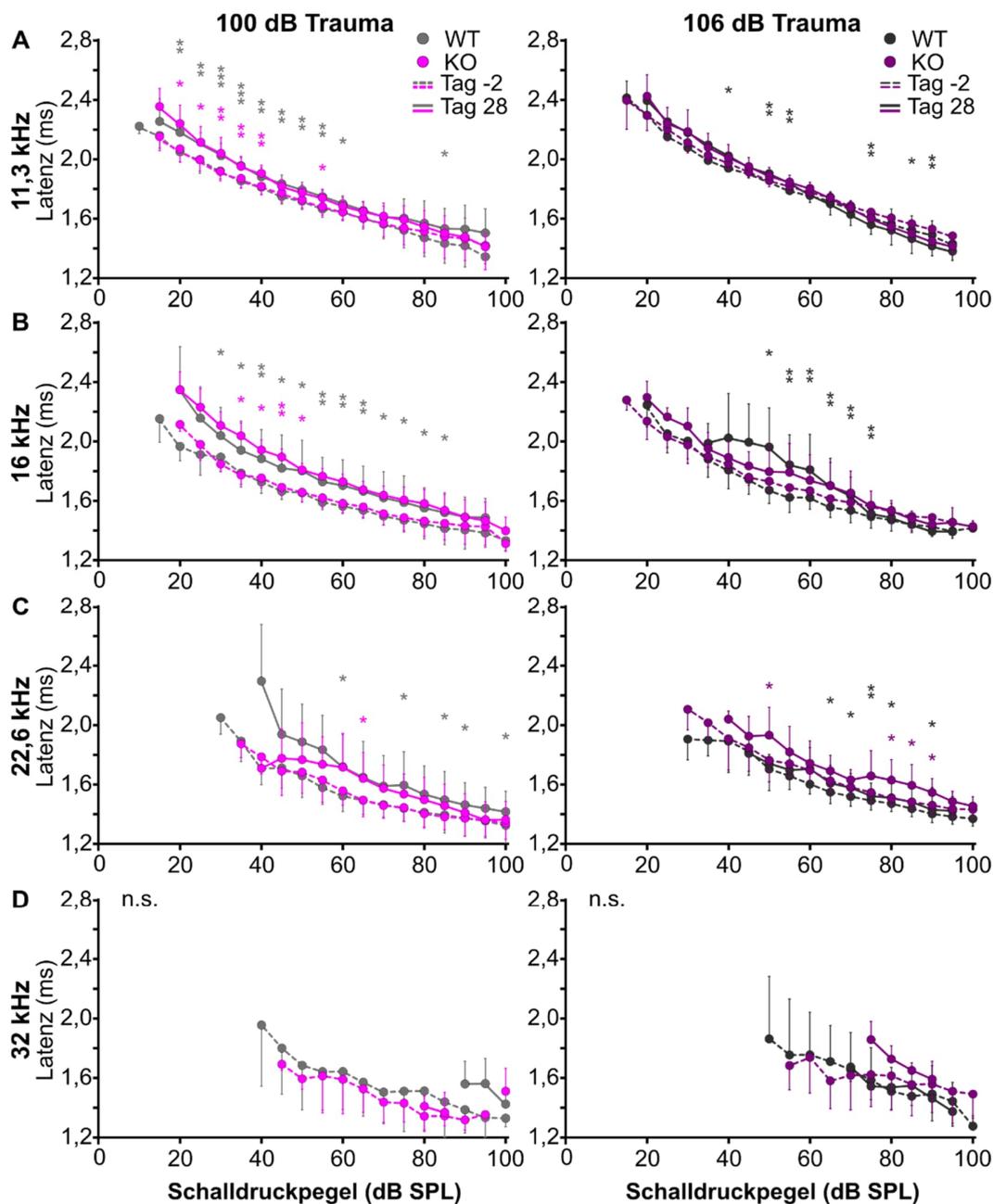


Abbildung 38: Einfluss eines Schalltraumas von 106 dB SPL auf die pegelabhängigen Latenzen der ABR-Welle I bei *Slack*^{+/+}- und *Slack*^{-/-}-Mäusen für die Frequenzen 11,3 kHz, 16 kHz, 22,6 kHz und 32 kHz.

A-D, gemittelte Latenzfunktionen der *Slack*^{+/+}-Mäuse (grau und dunkelgrau) und der *Slack*^{-/-}-Mäuse (pink und dunkelpink) mit 100 dB SPL Trauma (linke Spalte) und mit 106 dB SPL Trauma (rechte Spalte) an Tag -2 (gestrichelte Linie) und Tag 28 (durchgezogene Linie) für 11,3 kHz (**A**), 16 kHz (**B**), 22,6 kHz (**C**) und 32 kHz (**D**). Zur statistischen Analyse der Latenzen vor Trauma (Tag -2) und nach Trauma (Tag 28) innerhalb eines Genotyps wurde der paarweise Wilcoxon-Rangtest für zeitlich verbundene Stichproben verwendet; Mittelwerte sind nur mit $n \geq 3$ aufgeführt; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.2.6 Effekte der Traumata auf die Hörschwellen im direkten Vergleich

Um die Folgen der beiden Schalltraumata besser vergleichen und beurteilen zu können, wurden zuvor die Wachstumsfunktionen der Amplituden und die Latenzfunktionen der ABR-Welle I gegenübergestellt (Abb. 37, 38). In Abb. 39 werden nun noch einmal die frequenzabhängigen HS aller Versuchsgruppen am Tag -2 vergleichend dargestellt, wobei die Daten der Abb. 29B enthalten sind. Obwohl das Tonschwellenaudiogramm der initialen Hörmessung im tieffrequenten Bereich etwas variabler ist als im hochfrequenten, zeigten alle Versuchsgruppen eine vergleichbare Hörleistung. Da der erwartete Hörschaden im hochfrequenten Bereich erwartet wurde, war vor allem die Homogenität der HS des jeweiligen Genotyps in diesem Cochleabereich von Interesse.

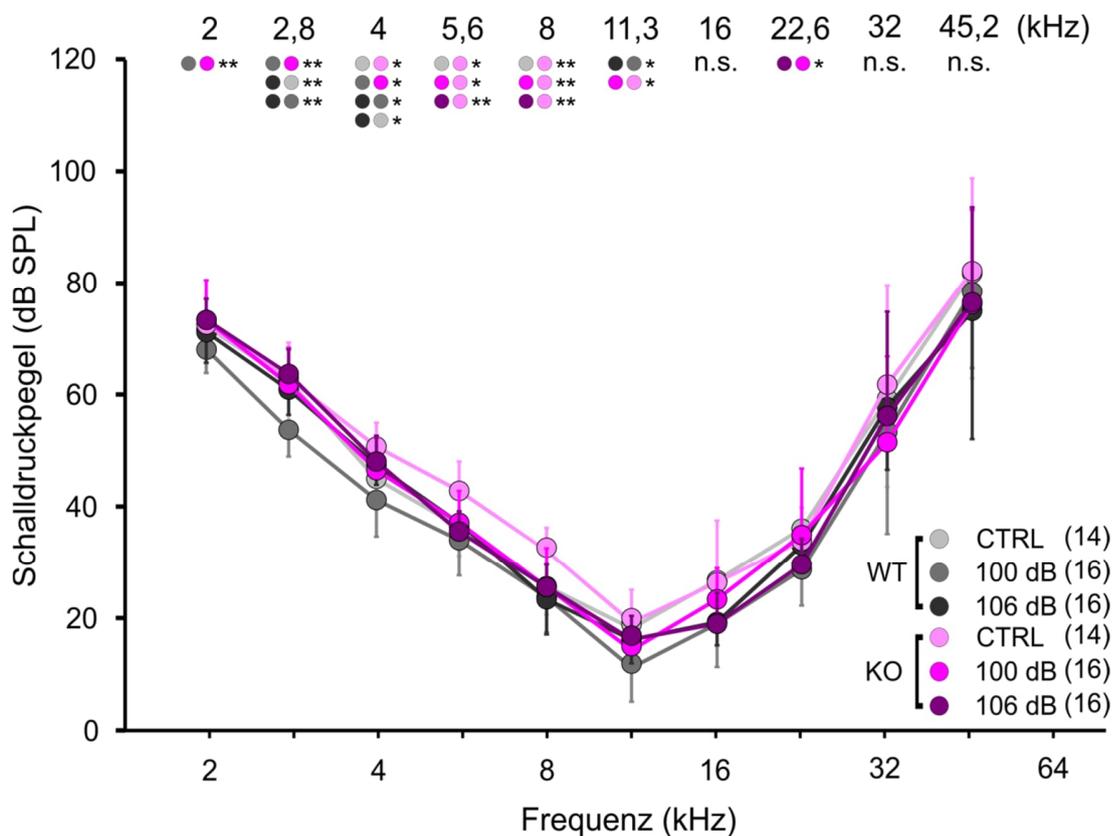


Abbildung 39: Initiale Audiogramme aller Versuchsgruppen im Vergleich.

Gemittelte f-ABR-HS aller Versuchsgruppen (*Slack*^{+/-}-Mäuse: hellgrau, grau und dunkelgrau; *Slack*^{-/-}-Mäuse: hellpink, pink und dunkelpink; N = 14-16 Ohren) zu Beginn der Hörmessungen am Tag -2. Für jede Frequenz wurden die Gruppen gleichen Genotyps mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließender Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche auf statistische Signifikanz hin getestet. Ergänzt wurde diese Analyse durch den paarweise Mann-Whitney-U-Test zwischen den Genotypen, die zusammen eine Versuchsanordnung (Kontrolle = CTRL, 100 dB SPL oder 106 dB SPL Schalltrauma) durchliefen; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Die Auswirkungen der Traumata auf die absoluten f-ABR-HS direkt nach der zweistündigen Beschallung (Abb. 40) zeigten alle eine PTS im Frequenzbereich größer 16 kHz; für die 106 dB starken Schalltraumata sogar bereits ab 11,3 kHz. Jede gemittelte Hörschwelle erfuhr an Tag 0 eine Erhöhung (ausgenommen die der KO-Gruppe nach dem 100 dB SPL Trauma bei 2 kHz). Im Bereich tiefer Frequenzen (≤ 4 kHz) lagen die Verschiebungen bezogen auf Tag -2 bei der Slack^{-/-}- Versuchsgruppe niedriger als bei der Slack^{+/+}- Versuchsgruppe (KO= 0 - 9 dB; WT = 4 - 12 dB). Im mittel- und hochfrequenten Bereich dominierte der Einfluss des Traumas den der Genotypen. Hier hatten die Versuchsgruppen mit dem höheren Trauma auch stärkere HS-Verschiebungen. Besonders deutlich war dieser Effekt bei der Frequenz 11,3 kHz zu beobachten, bei der das 100 dB SPL Trauma einen mittleren Anstieg um 21,9 dB verursachte, während das 106 dB SPL Trauma die mittlere HS um 35 dB ansteigen ließ.

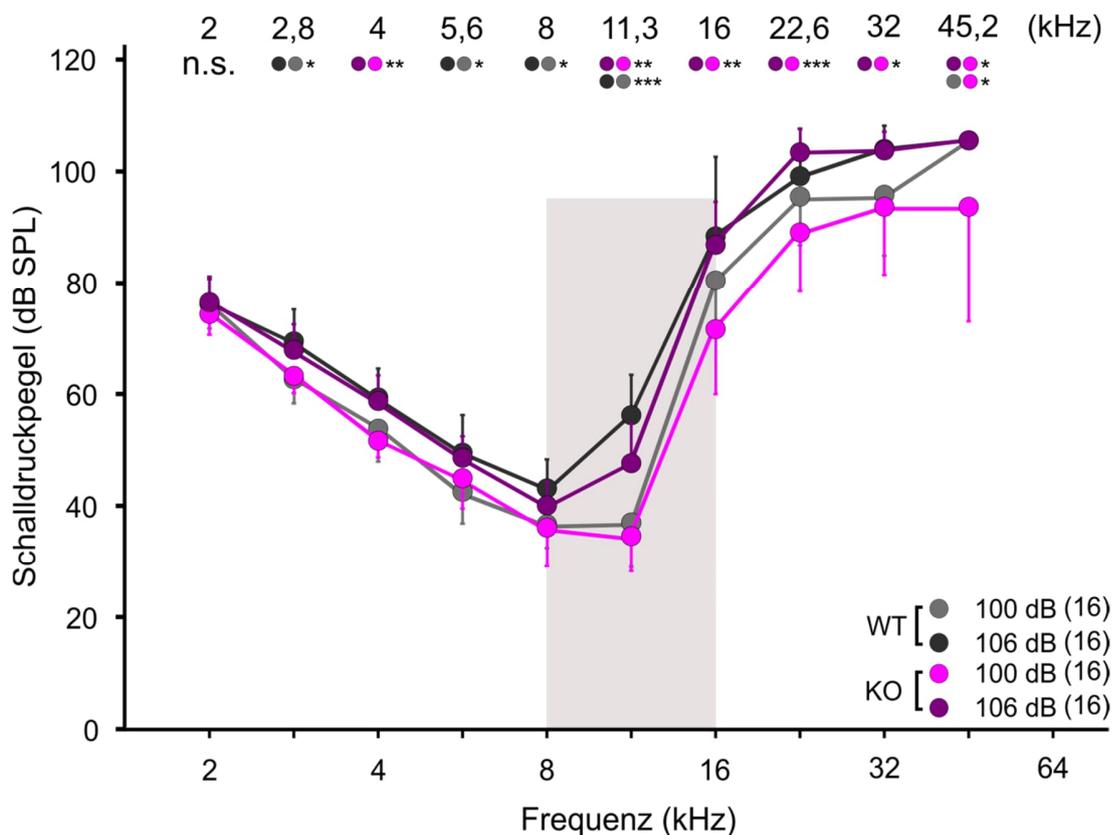


Abbildung 40: Audiogramme von Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-Mäusen direkt nach der Vertäubung mit 100 oder 106 dB SPL.

Audiogramme der Slack^{+/+}-Mäuse (grau und dunkelgrau) und der Slack^{-/-}-Mäuse (pink und dunkelpink) mit einem Schalltrauma von 100 dB SPL (grau und pink) und 106 dB SPL (dunkelgrau und dunkelpink) zeigen gemittelte Hörschwellen (N = 16 Ohren pro Versuchsgruppe). Frequenzweise wurden die Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test untersucht und die Testergebnisse nach Bonferroni korrigiert. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Bei statistischen Untersuchungen zeigte sich, dass die statistisch relevanten Unterschiede bei den WT eher im niederfrequenten Bereich lagen (Ausnahme 4 kHz), und die der KO bei hohen Frequenzen. Es gab kaum signifikante Unterschiede bei den paarigen Vergleichen zwischen den Genotypen (Ausnahme 45,2 kHz: 100 dB SPL).

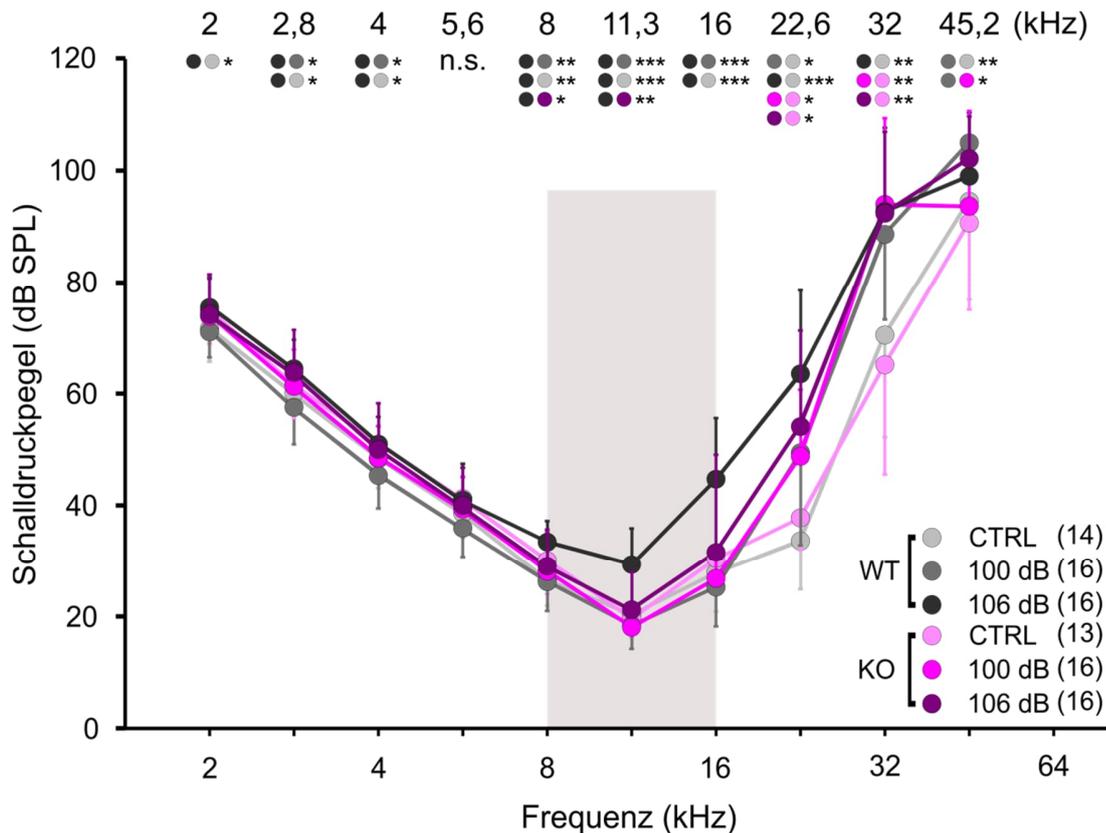


Abbildung 41: Audiogramme von $Slack^{+/+}$ - und $Slack^{-/-}$ -Mäusen vier Wochen nach einem Trauma von 100 oder 106 dB SPL.

Audiogramme aller Versuchsgruppen ($Slack^{+/+}$ -Mäuse: hellgrau, grau und dunkelgrau; $Slack^{-/-}$ -Mäuse: hellpink, pink und dunkelpink; N = 14-16 Ohren) am Tag 28. Frequenzweise wurden die Gruppen gleichen Genotyps mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließender Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche auf statistische Signifikanz hin getestet. Ergänzt wurde diese Analyse durch den paarweise Mann-Whitney-U-Test zwischen den Genotypen, die zusammen eine Versuchsanordnung (Kontrolle = CTRL, 100 dB SPL oder 106 dB SPL Schalltrauma) durchliefen; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Vier Wochen nach den unterschiedlichen Traumata (Abb. 41) waren die gemittelten HS der Tiere, die ein Schalltrauma erhalten hatten ($Slack^{+/+}$ -Mäuse: grau und dunkelgrau; $Slack^{-/-}$ -Mäuse: pink und dunkelpink) im hochfrequenten Bereich im Vergleich mit den HS der Tiere ohne Trauma beider Genotypen ($Slack^{+/+}$ -Mäuse: hellgrau; $Slack^{-/-}$ -Mäuse: hellpink) noch immer erhöht. Das bedeutet, dass bei beiden Trauma-Intensitäten eine PTS für diese Frequenzen nach vier Wochen Regenerationszeit blieb. Für die Frequenz von 32 kHz, bei dem die HS der Kontrolltiere (WT und KO) im Mittel bei 68 dB SPL lagen, waren die HS der vertäubten Versuchsgruppen nur

unwesentlich unterschiedlich (100 dB SPL Trauma: 91,4 dB SPL; 106 dB SPL Trauma: 92,7 dB SPL) und lagen um ca. 24 dB deutlich oberhalb der Kontrollgruppen.

Während die HS von den Versuchstieren 4 Wochen nach 100 dB SPL Trauma und den unvertäubten Kontrollen bei beiden Genotypen weitgehend vergleichbar waren (Ausnahme 100 dB SPL: 45,2 kHz), löste das 106 dB SPL Trauma deutliche im Bereich des besten Hörens (8-11,3 kHz) bei dem höheren Trauma signifikante Unterschiede zwischen KO und WT aus (Abb. 41). Bemerkenswerterweise regenerierten die Hörschwellen der Slack^{-/-}-Versuchsgruppe im mittleren Frequenzbereich besser als die der Slack^{+/+}-Mäuse. Zwischen beiden Genotypen lag zum Beispiel bei 16 kHz ein Unterschied von 13,1 dB. Während die Wildtypen bei die 16 kHz eine mittlere PTS von 25,3 dB zeigten, waren es bei der Slack^{-/-}-Versuchsgruppe nur 12,5 dB Unterschied zu Tag -2 (ohne stat. Signifikanz).

Dieser Befund könnte bedeuten, dass das Regenerationsvermögen der Slack^{+/+}-Mäuse nach dem 106 dB SPL Trauma relativ schlecht oder jenes der Slack^{-/-}-Mäuse besonders gut war. Rückblickend hatten die WT-Versuchsgruppe bereits bei den Amplituden und Latenzen zum Teil schlechtere Werte als die KO-Versuchsgruppe (Abb. 37,38), sodass Variante eins einleuchtender erscheint. WT-Versuchstiere aus zwei weiteren Projekten der Arbeitsgruppe zeigten jedoch vier Wochen nach einem 106 dB SPL Trauma (Abb. nicht gezeigt) eine ähnliche Regenerationsfähigkeit wie die o.g. WT-Tiere. Deshalb muss geschlossen werden, dass die Slack^{-/-}-Mäuse nach dem 106 dB SPL Schalltrauma eine besonders gute Regenerationsfähigkeit zeigten.

Zusammengefasst unterschieden sich die Klick-Hörschwellen und DPOAE-Amplituden von Slack^{+/+} und Slack^{-/-}- Wurfgeschwistern nicht. Bei niedrigen Frequenzen besaßen Slack^{-/-}-Tiere etwas höhere HS als der Wildtyp. Nach einem 100 dB SPL Schalltrauma war die TTS bei den Slack^{+/+}-Mäusen für viele Frequenzen signifikant größer als bei den Slack^{-/-}-Mäusen; die WT-Gruppe zeigte jedoch eine bessere Regenerationsfähigkeit als die Slack^{-/-}-Gruppe. Die Amplitudenreduktion der Welle I der KO-Tiere war nach Trauma bei midbasalen Frequenzen stärker ausgeprägt, aber die Latenzen als Folge des Traumas weniger häufig erhöht. Nach einem Trauma von 106 dB SPL zeigten die Hörschwellen der KO-Mäuse weniger Schaden und regenerierten besser als die der WT-Tiere. Bei den Latenzen und Amplituden der ABR-Welle I zeigte sich ebenfalls, dass sie Slack^{-/-}-Gruppe weniger signifikante Verschlechterungen nach Trauma aufwiesen.

3.3 Analyse der Prä- und Postsynapsen von inneren Haarzellen

In diesem Teil werden die Auswertungen der immunhistochemischen Untersuchungen an Prä- und Postsynapsen zwischen IHZ und primären auditorischen Neuronen nach Schalltrauma dargestellt. Eine cochleäre Synaptopathie liegt dann vor, wenn es einen Schaden an der Reizübertragung zwischen beiden Zelltypen durch defekte Ribbons und/oder Postsynapsen gibt, der sich nicht zwingend in veränderten Hörschwellen widerspiegelt. Das beruht darauf, dass unterschiedliche Fasertypen der Spiralganglienneurone verschiedene physiologische Eigenschaften besitzen. Diese gehen mit unterschiedlicher Vulnerabilität gegenüber akustischer Überstimulation einher.

3.3.1 Etablierung eines Protokolls zur Analyse der Synapsen

In der Arbeitsgruppe wurden durch Kerstin Blum und mich ein Immunhistochemie- und Auswertprotokoll zur Quantifizierung der Synapsen etabliert. Für die Analyse der Synapsen im Corti-Präparat (Abb. 42) wurden das präsynaptische IHZ-Ribbonprotein CtBP2 und das SGN-Protein Homer1 des postsynaptischen Proteinkomplexes mittels einer Antikörper-Immunfluoreszenz-Färbung (IF) markiert (Abb. 42C). Diese AK-Kombination wurde gewählt, da diese Antikörper eine stabile und spezifische Cluster-Färbung der Synapsen ohne hohes Hintergrundrauschen gestatteten. Anschließend wurden am LSM möglichst viele Bereiche von im allgemein 8 IHZ (Abb. 42B) von der apikalen zur basalen Cochlea aufgenommen (Abb. 42A) wie in Material und Methoden Kapitel (8.1) genauer beschrieben.

Abbildung 43 zeigt Detailaufnahmen der IF von Prä- und Postsynapse von Slack^{+/+}- und Slack^{-/-}-CP im midbasalen Bereich im Alter von 12 Wochen, und zwar ohne Schalltrauma (Abb. 43A: KO; 43B: WT) sowie vier Wochen nach einem Trauma von 100 dB SPL (Abb. 43C: KO; 43D: WT) bzw. 106 dB SPL (Abb. 43E: KO; 43F: WT).

Für die Analyse war die Anzahl der Cluster normiert auf die Anzahl der IHZ in einem Ausschnitt von Interesse. Die Anzahl der IHZ in einem Ausschnitt konnten anhand einer schwachen IF der großen Nuklei der IHZ durch die Färbung des CtBP2-Proteins bestimmt werden. Es ist nicht nur ein Marker für Ribbons, sondern in einer kürzeren Isoform als Transkriptionsfaktor im Zellkern der IHZ aktiv vorhanden (Abb. 42B).

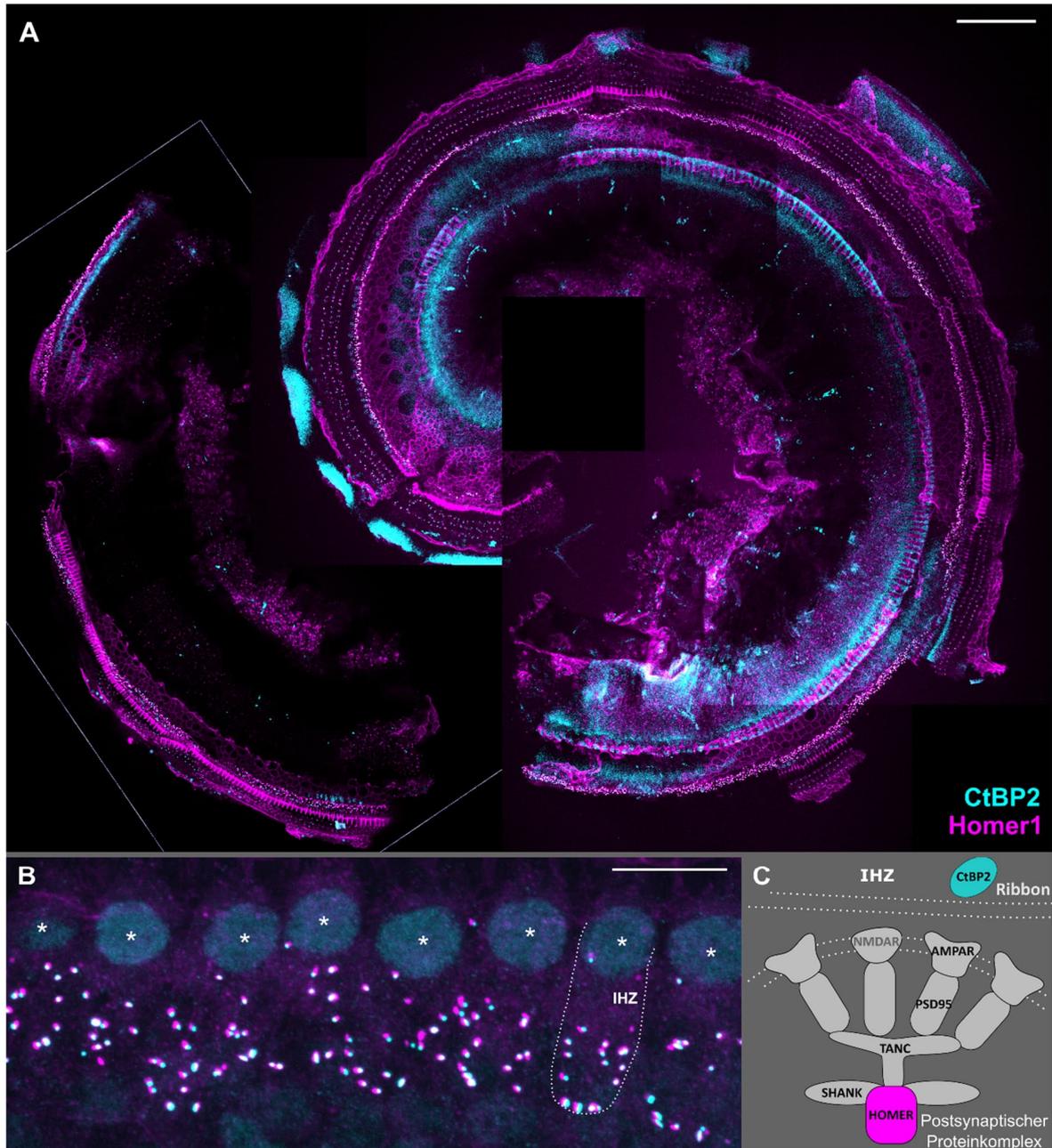


Abbildung 42: Immunfluoreszenzaufnahmen von Prä- und Postsynapsen im Corti-Präparat.

A, Übersicht über ein digital zusammengefügte MIP eines Corti-Präparats mit einer IF-Markierung für Präsynapsen (anti-CtBP2, türkis) und Postsynapsen (anti-Homer1, pink). Die MIP zeigt die apiko-mediale Windung bis zu einem Bruch im midbasalen Bereich; nebenliegend noch ein Stück der basalen Windung. In der Detailaufnahme (**B**) wird ein definierter Analysebereich (siehe Material und Methoden) über 8 innere Haarzellen (IHZ) gezeigt. Zur Analyse wurden vom CP-Stapelaufnahmen von apikal nach basal aufgenommen, die in z-Richtung den gesamten synaptischen Bereich erfassten. Der anti-CtBP2-AK (türkis) ist ein Marker für die Ribbons und erkennt zusätzlich ein kürzeres Transkript, das als Transkriptionsfaktor wirkt, weswegen die Zellkerne leicht gefärbt sind (Sterne). Die postsynaptischen Proteinkomplexe wurde durch Immunmarkierung des Proteins Homer1 (pink), ein Scaffold-Protein für den AMPA-Rezeptor-

Komplex, gefärbt. **C**, Schema der relativen Lage von Homer1 und der Proteine des postsynaptischen Komplexes in Bezug auf die CtBP2-positiven Ribbons in den IHZ. Maßstab **A**: 100 μm ; **B**: 10 μm .

In der Literatur wurde nach einem 100 dB SPL Schalltrauma ein Verlust von Ribbons und von Typ I -Fasern beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde automatisiert die Anzahl und Größe aller Präsynapsen sowie der Postsynapsen erhoben (s. Material und Methoden). Zusätzlich erfolgte manuell eine Zählung der ungepaarten Ribbons (Abb. 43, CtBP2-Cluster, leere Pfeilköpfe) und ungepaarten Postsynapsen (Abb. 43, Homer1-Clustern, gefüllte Pfeilköpfe). Hier wurden auch die Paarungen aus Prä- und Postsynapse berücksichtigt, die nach dem Trauma zwar noch vorhanden, aber durch geringe räumliche Trennung nicht mehr als gepaarte Cluster präsent waren (Abb. 43B und D, Pfeile). Diese waren bei beiden Genotypen vereinzelt vorhanden und gingen als „gepaart“ in die Analyse ein.

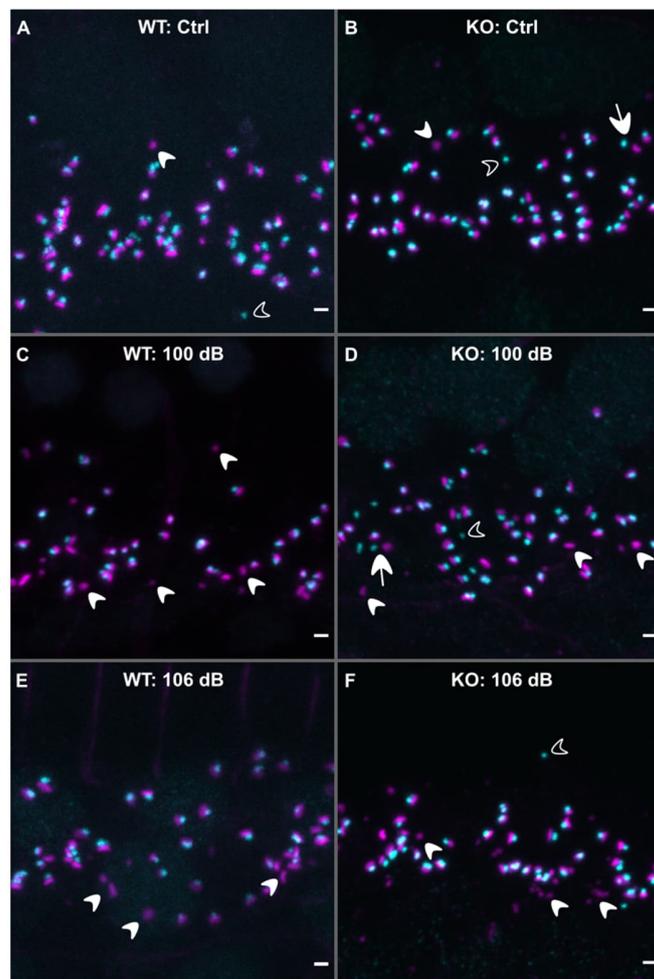


Abbildung 43: Immunhistochemische Färbung von Prä- und Postsynapsen im midbasalen Bereich des Corti-Präparats von $Slack^{+/+}$ - und $Slack^{-/-}$ -Mäusen.

A-F, Ausschnitt von Prä- (anti-CtBP2, cyan) und Postsynapse (anti-Homer1, magenta) von ca. 3 IHZ der midbasalen Windung von $Slack^{+/+}$ - (linke Spalte) und $Slack^{-/-}$ -Mäusen (rechte Spalte). Die Tiere hatten

entweder kein Trauma (**A, B**), ein Schalltrauma von 100 dB SPL (**C, D**) oder ein Schalltrauma von 106 dB SPL erhalten (**E, F**). Ungepaarte Präsynapsen sind mit leeren Pfeilköpfen, ungepaarte Postsynapsen mit gefüllten Pfeilköpfen markiert. Davon unterschieden wurden vermeintlich gepaarte Prä- und Postsynapsen mit einem größeren Abstand zueinander (Pfeile). Maßstab: 1 μm .

3.3.2 Analyse der Synapsen anhand von Ribbons und Homer1-Clustern

Direkt nach der letzten Hörmessung am Tag 28 wurden die Tiere getötet, ihre Cochleae entnommen und die CP für die Synapsen-Analyse präpariert und gefärbt (s. Abb. 42). Die Zuordnung der IHZ erfolgte für alle Analysen (Abb. 44- 46) anhand der Frequenzkarte, in der die Maus-Cochlea (Abb. 14) in einen apikalen ($f < 6,8 \text{ kHz}$), medialen ($6,8 \text{ kHz} \leq f < 17 \text{ kHz}$), midbasalen ($17 \leq f < 32 \text{ kHz}$) und einen basalen ($f \geq 32 \text{ kHz}$) Bereich unterteilt wird.

Die ausgewerteten Parameter (Anzahl, Größe und ungepaarte Cluster) beider Genotypen sind als Boxplots der Präsynapsen (Ribbons, jeweils links) und der Postsynapsen (Homer1-Cluster, jeweils rechts) für die Kontrolle (Ctrl) und beide Traumata (100 dB SPL und 106 dB SPL) im Vergleich dargestellt.

Beim Fertigstellen dieser Dissertation lagen noch keine Daten für die basalen CP-Stücke der Slack^{-/-}-Kontrolltiere (ohne Trauma) vor, sodass hier nur Vergleiche zwischen beiden Slack^{-/-}-Versuchsgruppen möglich waren. Statistische Analysen wurden sowohl als paarweise Vergleiche der Genotypen innerhalb einer Versuchsanordnung als auch zwischen den Gruppen unterschiedlicher Versuche innerhalb eines Genotyps durchgeführt (Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur). Generell war das Präparieren der Cochleae drei Monate alter Tiere mit Herausforderungen verbunden, da die knöchernen Strukturen der Cochlea sehr dick und damit schwer zu entfernen waren. Das Präparieren der basalen Windung ist zudem schwieriger als im apikalen Bereich. Aufgrund der Verbesserung der Fertigkeiten beim Präparieren über den Zeitraum der Versuche (ca. ein Jahr) war es bei dem zweiten Trauma möglich, höhere Anzahlen von IHZ-Bereichen zu analysieren als bei dem 100 dB SPL Trauma. In die Analyse der WT-Kontrollen flossen Rohdaten ein, die von mehreren Experimentatoren erhoben wurden und aus Tierschutzrelevanten Gründen in mehreren Doktorarbeiten verwendet wurden (K. Blum, P. Schätzle und eigene Daten), sodass gerade im midbasalen Bereich die Datenmengen für die Kontrolltiere zwischen KO und WT unterschiedlich waren. Alle Rohdaten dieser Arbeit wurden von mir ausgewertet und dargestellt.

Die Anzahl der Synapsen ist eine physiologisch relevante Kenngröße, um eine funktionierende und effiziente Reizweiterleitung zu gewährleisten. Der Verlust einzelner synaptischer Komponenten (Präsynapse oder Postsynapse oder beide) bedeutet den Verlust eines Informationskanals, der möglicherweise durch eine Größenanpassung der noch vorhandenen

prä- oder postsynaptischen Strukturen kompensierbar ist. Pathologische Phänotypen können sowohl in einer veränderten Anzahl der Präsynapsen oder Postsynapsen, die sich in ungepaarten Gegenständen zeigt, begründet liegen.

3.3.2.1.1 Anzahl der Ribbons und der Homer1-Cluster

Beim Wildtyp waren im Median ohne Trauma über alle Windungen 16-18 Ribbons pro IHZ vorhanden (Medianwerte, apikal: 15,7; medial: 17,4; midbasal: 17,9; basal: 15,9; Abb. 44 links), mit den höchsten Werten im medialen (Abb. 44B) und midbasalen (Abb. 44C) Bereich. Durch das Trauma von 100 dB SPL fiel die Anzahl im Median auf 14,8 (medial), 10,6 (midbasal) und 7,8 (basal) Ribbons/IHZ ab; der apikale Bereich war nicht betroffen. Durch das 106 dB SPL Trauma waren die Ribbons ähnlich wie beim 100 dB SP Trauma reduziert (medial: 15,5; midbasal: 13,3; basal: 10,5) wobei hier zusätzlich auch die apikale Windung mit 12,9 Ribbons/IHZ betroffen war. Außerdem war die Streuung der Werte größer als nach dem 100 dB SPL Trauma.

Bei den Slack^{-/-}-Kontroll-Tieren (ohne Trauma) gab es im apikalen Bereich mit 13,6 Ribbons/IHZ 2,1 weniger Ribbons/IHZ, im medialen und midbasalen Bereich jedoch gleich viele Ribbons im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe. Nach dem 100 dB SPL und dem 106 dB SPL Trauma lagen die Mediane der Anzahl der Ribbons der Slack^{-/-}-Tiere (Abb. 44, links, Pinktöne) bei Ctrl- apikal: 13,6; medial: 17,5; midbasal: 16,4; 100 dB SPL Trauma- apikal: 15,2; medial: 13,9; midbasal: 8,8; 106 dB SPL Trauma- apikal: 13,9; medial: 15,1; midbasal: 11,9 Ribbons/IHZ). Für die Slack^{-/-}-Mäuse waren die signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und vertäubten Tieren beider Traumata auf den hochfrequenten (midbasalen und evtl. auch basalen) Bereich beschränkt. Besonders auffällig war, dass die Slack^{-/-}-Tiere in der basalen Region nach dem 106 dB SPL Trauma nur 4 Ribbons/IHZ aufwiesen, wohingegen beim WT der Median bei 10 Ribbons/IHZ lag. Leider fehlen aus Gründen der sehr schwierigen Präparation der basalen Windung die Slack^{-/-}- Kontrollen in diesem Bereich, daher ist unklar, ob der Unterschied durch das Trauma oder durch das Fehlen des Slack- Kanals verursacht wurde.

Bei der Analyse der Anzahl der Homer1-Cluster als Maß für die Postsynapse (Abb. 44 rechts) fiel bei den Slack^{-/-}-Mäusen ein unbekannter und unerwarteter Phänotyp auf: Slack^{-/-}-Kontrolltiere, d.h. Tiere ohne Trauma, zeigten eine um 2 – 3 reduzierte Anzahl der Homer1-Cluster/IHZ für die apikale, mediale und midbasale Windung gegenüber den Slack^{+/+}-Mäusen (Werte für die basale Windung nicht vorhanden, s.o.). Das Fehlen des Slack-Kanals verursachte also eine spezifische Reduktion von 2 - 3 Typ I-Afferenzen pro IHZ, wobei sich mit dem einen Beobachtungszeitpunkt von 12 Wochen nicht sagen lässt, ob die fehlenden Fasern nicht ausgebildet wurden oder ob sie vorzeitig degenerierten.

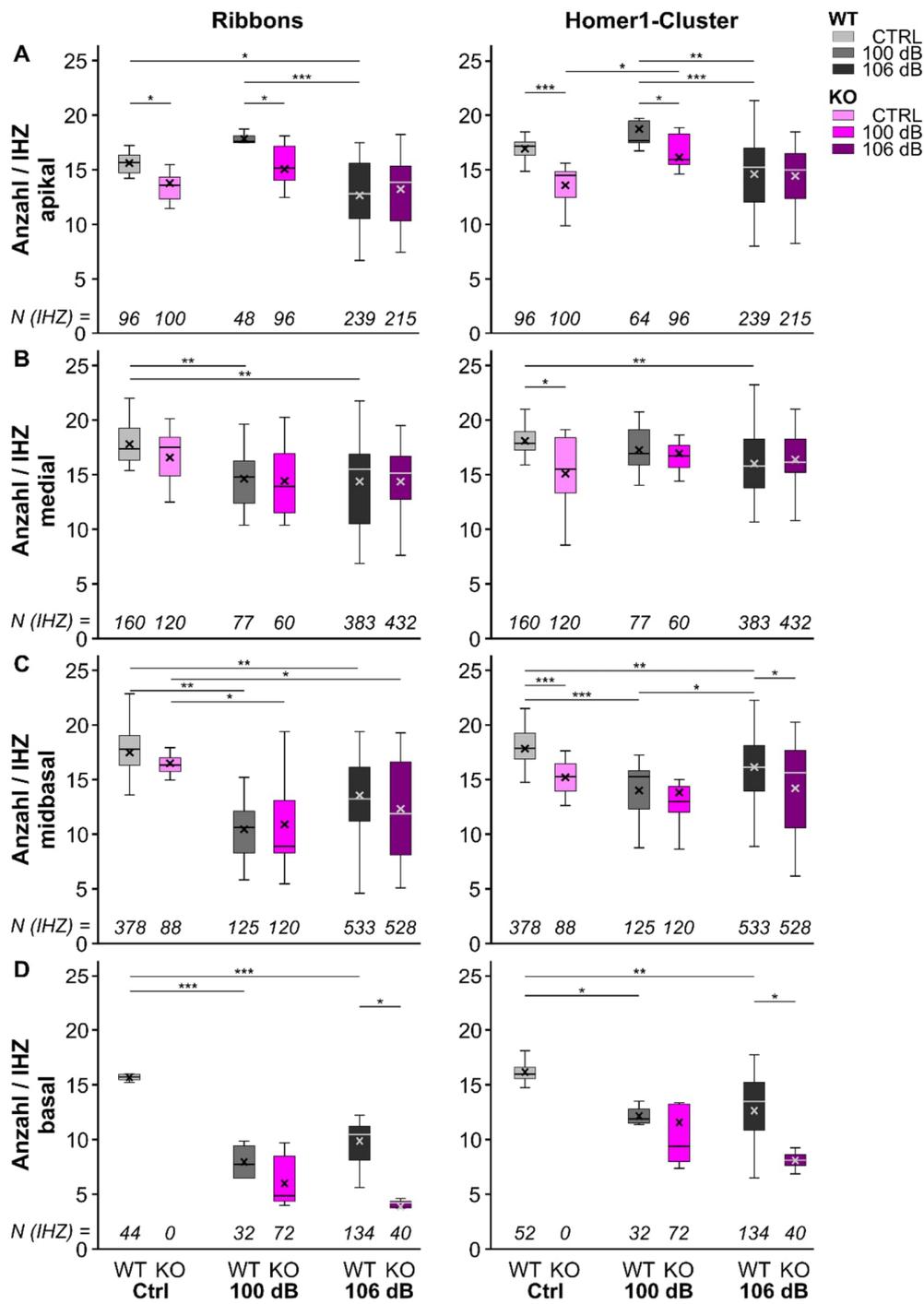


Abbildung 44: Anzahl der Ribbons und Homer1-Cluster pro innere Haarzelle in Abhängigkeit von der cochleären Position und vom applizierten Trauma.

A-D, Die Boxplots zeigen die 25. und 75. Percentile (unteres und oberes Ende der Box), der Median ist mit einer horizontalen Linie markiert, Whisker zeigen Minimum und Maximum) plus Mittelwert (Kreuz) für den apikalen Bereich (A), den medialen Bereich (B), den midbasalen Bereich (C) und den basalen Bereich (D). Paarweise Vergleiche zwischen den Genotypen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test, Mehrfachvergleiche innerhalb eines Genotyps über ANOVA oder den Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die

N-Zahlen über den x-Achsen entsprechen der Anzahl der analysierten IHZ. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Nach Trauma war in den Slack^{+/+}-Gruppen die Reduktion der Homer1-Cluster weniger stark ausgeprägt als die Reduktion der Ribbons, da erst ab der midbasalen Windung ein signifikanter Unterschied für das 100 dB SPL Trauma und ab der medialen Windung durch das 106 dB SPL Trauma auftrat. Bei den Slack^{-/-}-Tieren bewirkte beide Traumata im Vergleich zur Slack^{-/-}-Kontrolle keine signifikanten Abnahmen der ohnehin schon in der Anzahl reduzierten Homer1-Cluster im apikalen, medialen und im midbasalen Bereich. Im Vergleich zum WT waren die Homer1-Cluster der Slack^{-/-}-Tiere nach dem 106 dB SPL Trauma im midbasalen und basalen Bereich reduziert, wobei die Abnahme im basalen Bereich auf im Median 7 Homer1-Cluster/IHZ besonders ausgeprägt war (WT: 12 Homer1-Cluster/IHZ).

3.3.2.2 Ungepaarte Ribbons und Homer1-Cluster

Die generelle Reduktion der Anzahl von Ribbons nach einem Schalltrauma und die im Vergleich geringere Reduktion von Postsynapsen legt den Schluss nahe, dass es nach einem Schalltrauma mehr ungepaarte Postsynapsen als ungepaarte Ribbons gibt. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse, die diese Hypothese stützen. Bei den Kontrolltieren gab es in allen Windungen und bei beiden Genotypen im Median maximal ein ungepaartes Ribbon. Diese Tatsache änderte sich auch nicht durch die zugeführten Traumata. Die Anzahl ungepaarter Postsynapsen war bei den Tieren beider Genotypen ohne Trauma am kleinsten und stieg nach beiden Traumata in allen Windungen deutlich an. Die detaillierte Betrachtung zeigt, dass es zum einen bei den Kontrolltieren (ohne Trauma) in allen Windungen wenige (unter 2) ungepaarte Ribbons gab, zum anderen bei den Slack^{-/-}-Kontrolltieren die Zahl der ungepaarten Ribbons signifikant um ca. 0,5 Ribbon/IHZ höher als beim WT lag (Abb. 45 links). Beim Slack^{-/-}-Genotyp war die Zahl der ungepaarten Postsynapsen ohne Trauma nur im apikalen Bereich leicht gegenüber dem WT erhöht. Beide Effekte gingen durch die Traumata verloren, die Zahl sowohl der ungepaarten Ribbons als auch der ungepaarten Postsynapsen lag für jedes Trauma bei den Slack^{-/-}-Mäusen jetzt nicht mehr höher als beim WT. Die einzige Ausnahme bildeten die Postsynapsen nach einem 106 dB SPL Trauma in der basalen Windung, wo der WT im Median 2,9 ungepaarte Postsynapsen/IHZ aufwies gegenüber 5,8 bei den Slack^{-/-}-Tieren.

Bemerkenswert ist noch, dass nach einem 100 dB SPL Trauma bei der WT-Gruppe die Anzahl der ungepaarten Postsynapsen höher war als in der Slack^{-/-}-Gruppe ($p < 0.01$ im midbasalen Bereich, in den anderen cochleären Bereichen gab es gleich gerichtete Tendenzen). Man könnte den Eindruck gewinnen, dass der Slack^{-/-}-Genotyp nach dem 100 dB SPL Trauma einen protektiven Effekt auf die Paarung vorhandener Postsynapsen hatte. Dieser Effekt lag jedoch im

Median bei nur ca. einer ungepaarten Postsynapse/IHZ weniger als beim WT und damit unter der Differenz der Anzahl der Postsynapsen zwischen unvertäubter WT-Gruppe und unvertäubter Slack^{-/-}-Gruppe und ist daher nicht relevant.

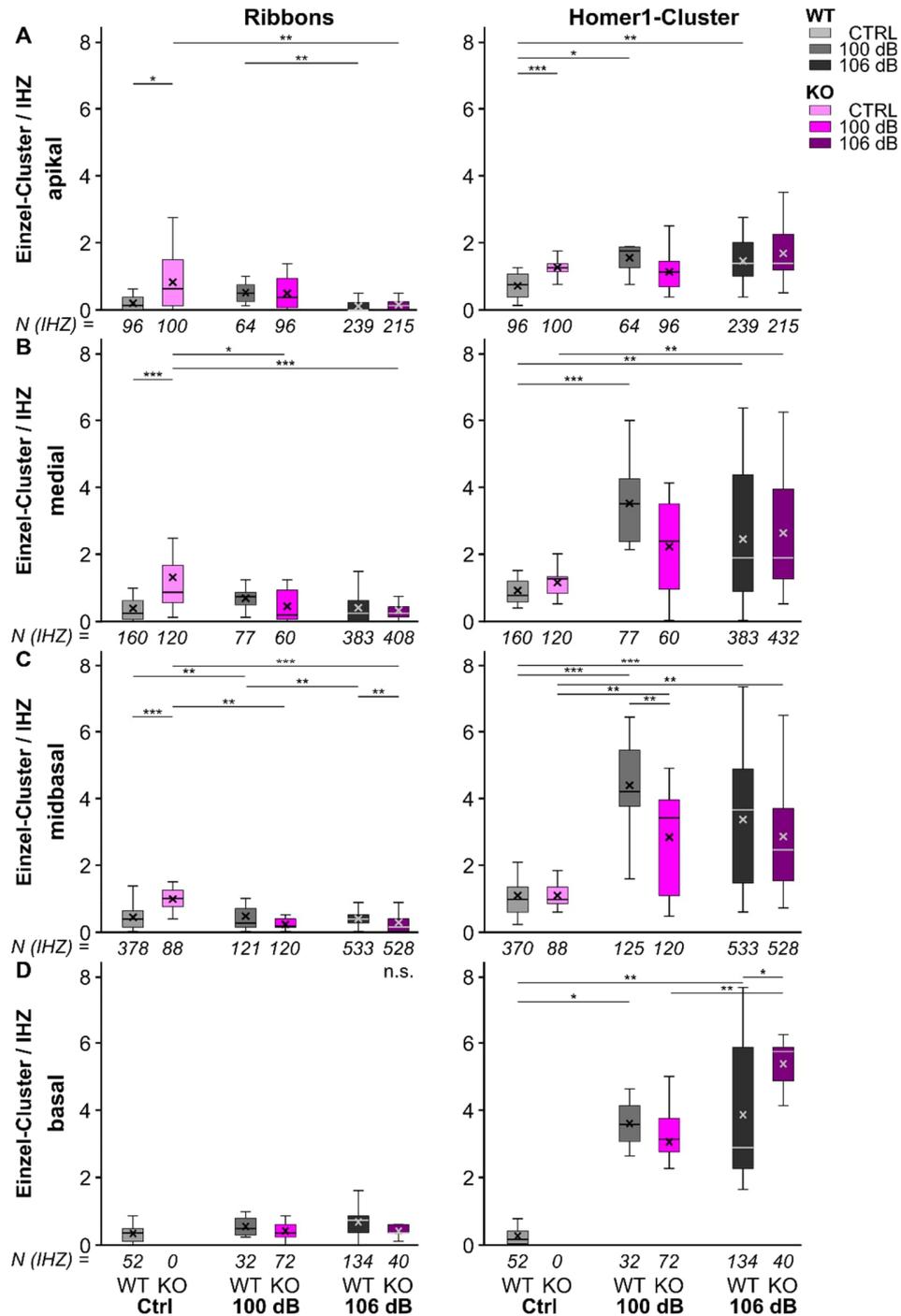


Abbildung 45: Anzahl der ungepaarten Ribbons und ungepaarten Homer1-Cluster in Abhängigkeit von der cochleären Position und vom applizierten Trauma.

A-D, Boxplots für den apikalen Bereich (A), den medialen Bereich (B), den midbasalen Bereich (C) und den

basalen Bereich (D). Paarweise Vergleiche zwischen den Genotypen wurden mit dem T-Test oder dem Mann-Whitney U-Test, Mehrfachvergleiche innerhalb eines Genotyps über ANOVA oder den Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die N-Zahlen über den x-Achsen entsprechen der Anzahl der analysierten IHZ. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.3.2.3 Größe einzelner Ribbons und Homer1-Cluster

Ein Schalltrauma kann Auswirkungen auf die Größe (die Fläche oder das Volumen) von Ribbons oder Postsynapsen haben, deshalb ist die Analyse dieser Größen sinnvoll. Hier wurde als Größenparameter die Fläche der Immunfärbung in der MIP ausgewertet (Abb. 46).

Die Ribbons der unvertäubten Slack^{-/-}-Tiere waren in der apikalen und medialen Windung, wo je IHZ 2-3 Postsynapsen fehlten, signifikant größer als die des WT, was ein Zeichen synaptischer Plastizität sein könnte. Die Postsynapsen der apikalen und midbasalen Windung waren hingegen signifikant kleiner als der WT-Homer1-Cluster. Effekte der Traumata waren hier schwer zu fassen, da die Veränderungen nicht konsistent zwischen den Windungen und Genotypen waren. Beim WT nahm die Fläche der Ribbons beim 100 dB SPL Trauma in der medialen und midbasalen Windung zu, basal war die gleiche Tendenz zu erkennen, was unsere vorherigen Ergebnisse bestätigt. Diese präsynaptische Plastizität nach Trauma war bei den Ribbons der Slack^{-/-}-Tiere nicht zu beobachten, die Flächen der Ribbons blieben unverändert oder nahmen sogar ab. Einzige Ausnahme bildeten die wenigen überlebenden Ribbons der basalen Windung nach 106 dB SPL Trauma, deren mittlere Fläche im Vergleich zu der Fläche nach dem 100 dB SPL Trauma zunahm. Dieser Befund unterstreicht die Sonderstellung der Synapsen der basalen Windung bei den Slack^{-/-}-Tieren. In Bezug auf die Postsynapsen ist bemerkenswert, dass deren Flächen bei den Slack^{-/-}-Kontroll-Tieren (apikal und midbasal) kleiner waren als bei den WT-Kontroll-Tieren, obwohl die Anzahl der Postsynapsen der Slack^{-/-}-Tiere geringer war als bei den WT-Tieren. Hier gab es offenbar keine kompensatorische postsynaptische Plastizität, wie sie an der Präsynapse aufgrund einer Trauma-induzierten verminderten Anzahl von Ribbons als Vergrößerung der Ribbons von uns beobachtet wurde. Die wenigen nach dem 106 dB SPL Trauma im basalen Bereich überlebenden Postsynapsen der Slack^{-/-}-Tiere wiesen eine kleinere Fläche als die der zugehörigen WT-Gruppe auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch beide Traumata die Anzahl der Ribbons/IHZ bei beiden Genotypen im hochfrequenten Bereich abnahm. Die Auswirkungen der entsprechenden Traumata zeigen, dass nicht nur bei den WT-Tieren, sondern auch bei Slack^{-/-}-Tieren die Ribbons vier Wochen nach dem entsprechenden Trauma die anfälligeren Strukturen waren als die Postsynapsen. Die basale Windung der Slack^{-/-}-Tiere zeigte sich besonders anfällig gegenüber dem 106 dB SPL Trauma, wo im Median pro IHZ nur 4,3 (WT: 10,5) Ribbons und 8,1 (WT: 13,5) Postsynapsen überlebten.

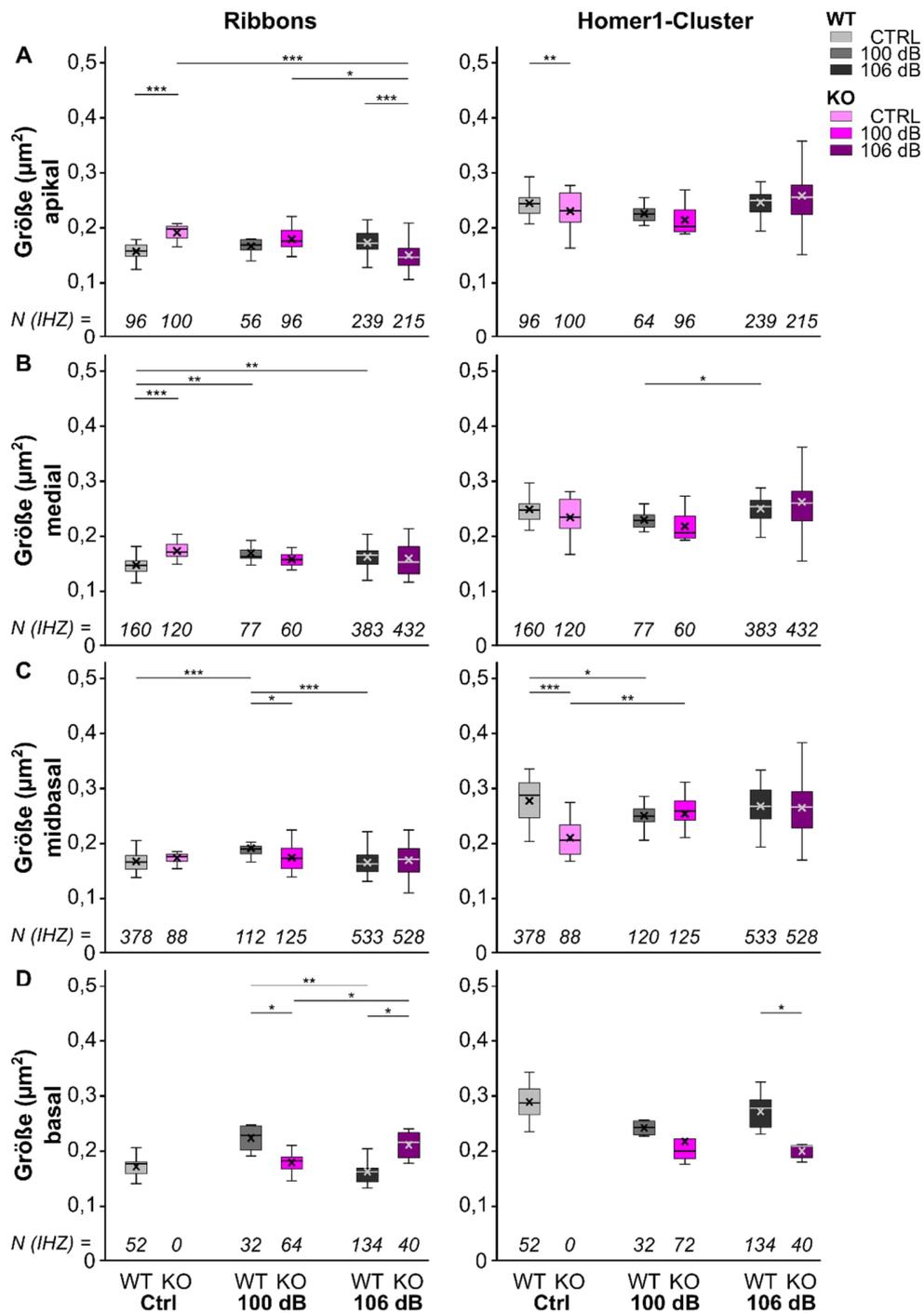


Abbildung 46: Fläche der Ribbons und Homer1-Cluster in Abhängigkeit von der cochleären Position und vom applizierten Trauma.

A-D, Boxplots für die Fläche von Ribbons bzw. Homer1-Clustern in der jeweiligen MIP für den apikalen Bereich (**A**), den medialen Bereich (**B**), den midbasalen Bereich (**C**) und den basalen Bereich (**D**). Paarweise Vergleiche zwischen den Genotypen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test, Mehrfachvergleiche innerhalb eines Genotyps über ANOVA oder den Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die N-Zahlen über den x-Achsen entsprechen der Anzahl der analysierten IHZ. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.4 Lokalisation des Claudin12-Proteins in der Cochlea

Im abschließenden Ergebnisteil dieser Arbeit werden Ergebnisse zur Rolle von Claudin12 in der Cochlea dargestellt. Ein Teil dieser Arbeit fand im Rahmen eines Forschungsaufenthalts des IRTG 1830 im Labor von Prof. Todd Alexander in Edmonton, Kanada, statt, das die Cldn12-Knockout-Maus physiologisch untersucht. Nach dem Forschungsaufenthalt wurden zwei Zuchtpaare der FVB/N- Mäuse in das Tierhaus des CIPMM verbracht. Nach erfolgreicher Nachzucht wurden weitere Analysen zur subzellulären Lokalisation von Cldn12 und erste hörphysiologische Messungen durchgeführt.

3.4.1 Charakterisierung der Claudin12-Expression in Corti-Präparaten

3.4.1.1 Etablierung der LacZ-Expression

Ziel der Experimente mit den Claudin12 (Cldn12) - defizienten Mäusen (Cldn12^{-/-}) war der zelluläre Nachweis des Proteins in der Cochlea.

Als Methode wurde das LacZ-Reportersystem der Cldn12^{-/-}-Maus genutzt. Bei diesen Tieren wurde in das Cldn12-Gen das bakterielle LacZ-Gen, das für β -Galactosidase kodiert, inseriert, wodurch das Cldn12-Gen inaktiviert wird. Unter Kontrolle des Cldn12-Promoters wird nur noch β -Galactosidase transkribiert. Es handelt sich um ein Knockout-Mausmodell mit LacZ-Reporterfunktion.

Inkubiert man Gewebe mit mindestens einem Cldn12-Transgen, in dem normalerweise Cldn12 exprimiert werden würde, in einer X-Gal-haltigen Färbelösung, so setzt die nun produzierte β -Galactosidase das eigentlich farblose Substrat X-Gal zu einem indigoblauen Farbstoff im Gewebe um. Nach dem Protokoll der AG von Frau Prof. Knipper, Universität Tübingen, welches von mir vor Ort modifiziert und etabliert wurde, musste zunächst die passende Inkubationszeit für die Corti-Präparate erarbeitet werden (Abb. 47).

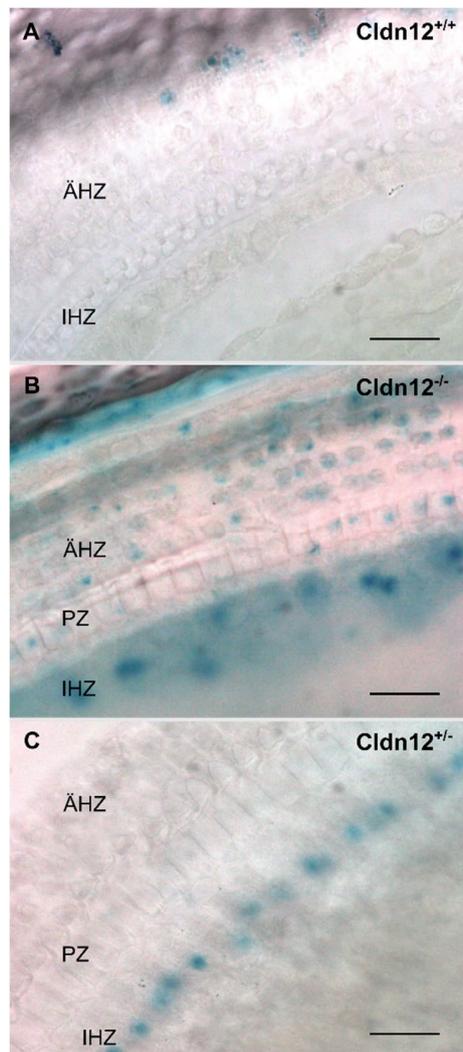


Abbildung 47: Spezifische LacZ-Färbung im Corti-Präparat drei Wochen alter Cldn12^{+/-}-Mäuse.

A, Ausschnitt eines Corti-Präparats (CP) einer Cldn12^{+/+}-Maus, das drei Stunden in einer X-Gal-Färbelösung inkubiert wurde, zeigt keine spezifische indigoblaue Färbung. Das Gewebe des Cldn12^{-/-}-CP (**B**) wies nach drei Stunden Inkubation einen deutlichen Farbumschlag auf. **C**, Heterozygotes Cldn12^{+/-}-CP nach einer Stunde Inkubation in der X-Gal-Färbelösung. Die blaue Färbung beschränkte sich auf den Bereich der IHZ. ÄHZ, äußere HZ; PZ: Pillarzellen; IHZ: innere HZ. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Durchlichtmikroskop Olympus BX51 mit einem 60x/1,42/infinity/ 0,17/FN26.5 Öl-Objektiv und einer Digitalkamera. Maßstab: 10 µm.

Im Experiment erwies sich das Corti-Präparat einer heterozygoten Maus (Cldn^{+/-}), das für eine Stunde in der Färbelösung reagierte, am aussagekräftigsten, da es kaum unspezifische Färbungen im Gewebe zeigte (Abb. 47C). Eine Blaufärbung zeigte sich im Bereich der IHZ. Da mit dem Durchlichtmikroskop keine konfokalen Aufnahmen möglich waren, blieb unklar, ob es sich bei den gefärbten Bereichen um den basalen Pol der Haarzellen oder um den apikalen Bereich der umgebenden Stützzellen handelt. Dazu wurde das Experiment um eine IF erweitert.

3.4.1.2 Nachweis der LacZ-Expression und Immunfluoreszenz

Zur Abklärung der zellulären Expression wurde an das Protokoll der LacZ-Färbung eine klassische IF angeschlossen (Abb. 48). Für diesen Versuch wurden CP von heterozygoten Mäusen ($Cldn^{+/-}$), homozygoten Wildtypmäusen ($Cldn^{+/+}$) und homozygot transgenen Mäuse ($Cldn^{-/-}$) parallel durch den Versuch geführt. Die Bildaufnahme wurde mit einem konfokalen LSM durchgeführt, weshalb der Photomultiplier-basierte Durchlichtdetektor die blaue Färbung nur als schwarze Aggregate darstellen konnte. In der Übersicht ist zu sehen, dass das CP der $Cldn^{+/+}$ (Abb. 48A) keine unspezifische Färbung auswies, wohingegen das CP der $Cldn^{+/-}$ -Maus (Abb. 48B) das charakteristische Muster im Bereich der IHZ zeigte. In den Detailaufnahmen von $Cldn^{+/-}$ - und $Cldn^{-/-}$ -CP aus dem Bereich der IHZ (Abb. 48C/D) waren die spezifischen Cluster der Färbereaktion im Bereich der IHZ und zusätzlich in den Pillarzellen zu finden (Pfeilkopf).

Als Volumenmarker für die IHZ wurde ein anti-Calbindin-28k-Antikörper verwendet und mit DAPI zum Färben der Zellkerne und Phalloidin-405 zum Färben der Stereozilien kombiniert (Abb. 48E-E''). Die Cluster der Färbereaktion blieben bei der IF ausgespart und sind als dunkle „Löcher“ im Fluoreszenzkanal zu erkennen.

Zwischen den konfokalen Aufnahmen der Fluoreszenzsignale und der nicht-konfokalen Dokumentation des gleichen Bereichs im Durchlicht, bei dem Fluoreszenzlicht aus anderen Gewebeebenen durchscheinen kann, kann eine Diskrepanz in der vermeintlichen Größe der Cluster entstehen (leerer Pfeilkopf). In dieser Detailaufnahme sind die mit gefüllten Pfeilköpfen markierten, schwarzen Cluster (Abb. 48E) deckungsgleich mit den Löchern in der Immunfluoreszenz der IHZ (Abb. 48E').

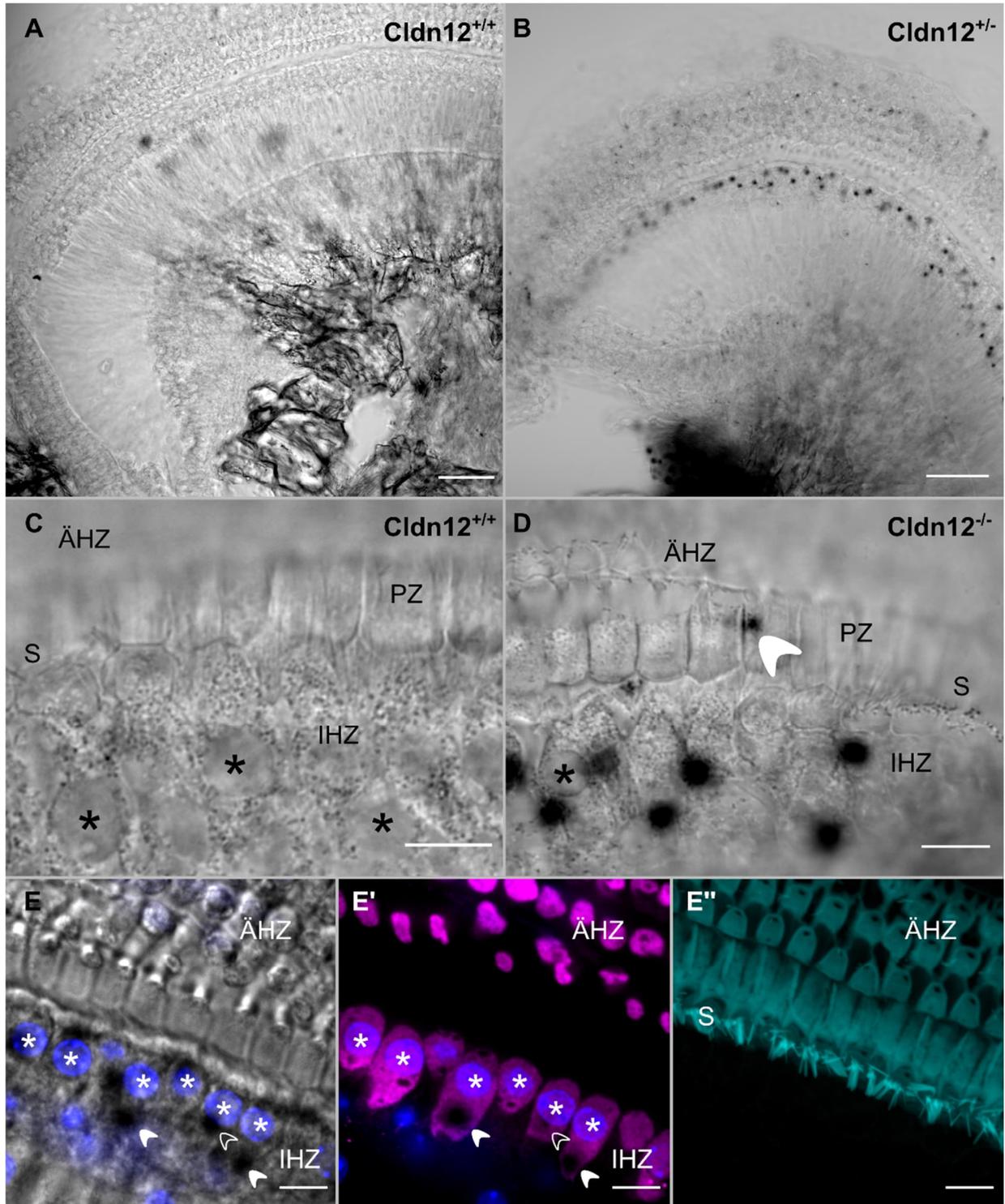


Abbildung 48: Spezifische LacZ-Färbung in inneren Haarzellen und Pillarzellen drei Wochen alter *Cldn12*^{-/-}-Mäuse.

A, B, MIP einer Übersichtsaufnahme der apikalen Windung eines CP einer Wildtyp- (**A**) und einer heterozygoten (**B**) *Cldn12*-Maus mit dem Durchlichtdetektor eines LSM. **C, D,** MIP einer Detailaufnahme aus dem Bereich der IHZ zeigen im *Cldn12*^{+/+}-Gewebe (**C**) keine spezifische Färbung, das *Cldn12*^{-/-}-CP zeigt eine deutliche Färbung (schwarze Punkte) im Bereich der IHZ und eine weniger intensive im Bereich

der Pillarzellen (Pfeilkopf) an. **E**, Kombinierte LacZ-Färbung mit einer IF bestätigt β -Galactosidase-Expression in IHZ (gefüllte Pfeilköpfe, leerer Pfeilkopf: Diskrepanz zwischen nicht konfokaler DL-Aufnahme (**E**) und konfokaler LSM-Aufnahme (**E'**). **E**, DL mit DAPI (blau); **E'**, anti-Calbindin-28K (magenta) mit DAPI (blau); **E''**, MIP von Phalloidin-405 (cyan). ÄHZ, äußere HZ; PZ: Pillarzellen; IHZ: innere HZ; S: Stereozilien; Sterne: Nuklei der IHZ. Maßstab: **A, B**: 50 μ m, **C-E**: 10 μ m.

3.4.1.3 Immunfluoreszenz-Färbung der Synapsen an inneren Haarzellen

Um zu testen, ob das Fehlen von Cldn12 Auswirkungen auf die Synapsen der IHZ hat, wurden IF-Färbungen der Synapsenproteine mit anti-CtBP2-AK für die Ribbons und anti-Homer1-AK für die Postsynapsen durchgeführt. Letztere wurden durch Färbungen des postsynaptischen Dichte-Proteins PSD95 ergänzt. Die IF-Färbung wurde an drei Wochen alten Cldn12^{+/+}- und Cldn12^{-/-} durchgeführt. Abbildung 49 (Cldn12^{+/+}) und 50 (Cldn12^{-/-}) zeigen die MIPs von Detailaufnahmen des basalen Bereichs von etwa drei IHZ sowie ein Schema der Proteinanordnung. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die MIPs der Einzelkanäle der Floreszenzen (B-D) zusammen mit den Kombinationen der Proteine (E-G) dargestellt.

Für den WT mit dem genetischen Hintergrund FVB/N (Abb. 49) stellt sich die Situation der Synapsen wie von C57Bl6/N-Wildtyp-Tieren dar: ein Cluster des präsynaptischen Ribbon-Proteins CtBP2 trat in sehr enger räumlicher Nähe mit Clustern der beiden Proteine des postsynaptischen Proteinkomplexes auf. Etwas anders stellte sich die Lage in den Cldn12^{-/-}-CP dar. Dort traten einige ungepaarte Postsynapsen (Pfeilköpfe) auf. Wie schon durch die detaillierte Analyse 12 Wochen alter Slack^{+/+}-Mäuse klar wurde, sind bis zu einer ungepaarten Synapse pro IHZ normal, diese Zahl war hier aber etwa verdoppelt. In einem nächsten Schritt müssen diese Experimente wiederholt werden. Sollte sich der Befund bestätigen, bleibt die Frage zu klären, ob sich die ungepaarten Synapsen in Detailparametern der Hörfunktion (Wachstumsfunktion der Amplitude der ABR-Welle I, Latenzen der Welle I) widerspiegeln.

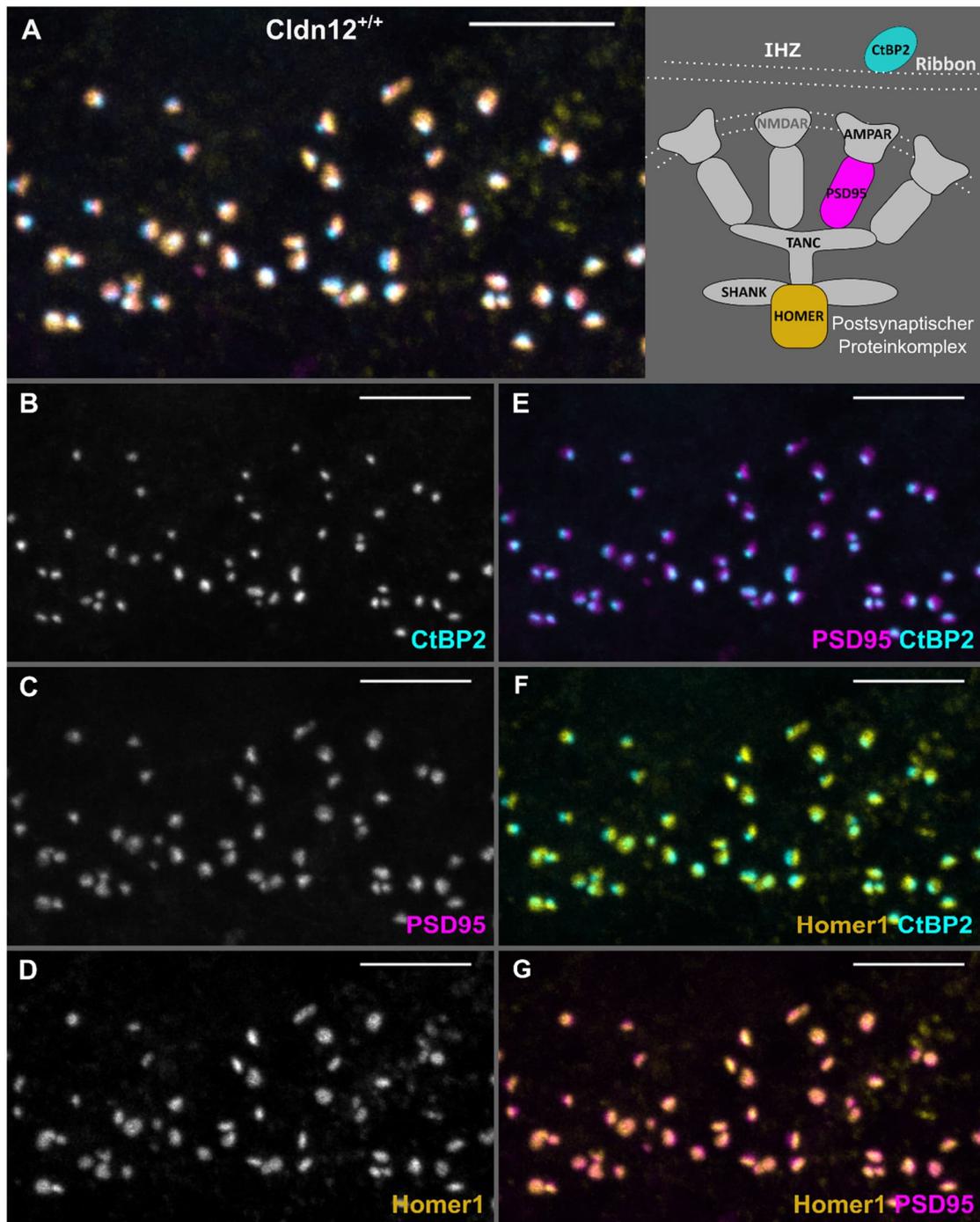


Abbildung 49: Immunhistologische Dreifachfärbung der Prä- und Postsynapsen einer drei Wochen alten *Cldn12*^{+/+}-Maus.

A-G, MIPs von Detailaufnahmen aus dem basalen Bereich von drei IHZ. **A**, Überlagerung der Immunfluoreszenz-Signale gegen die Target-Proteine CtBP2 (cyan), PSD95 (magenta) und Homer1 (gelb) und schematische Darstellung der relativen Anordnung dieser Proteine zueinander. **B-D**, Einzel-Fluoreszenzkanäle für CtBP2 (**B**), PSD95 (**C**) und Homer1 (**D**). Die paarweisen Kombinationen (**E-F**) bestätigen die relative Position der prä- (CtBP2) und postsynaptischen Proteine (PSD95, Homer1). Maßstab: 5 µm.

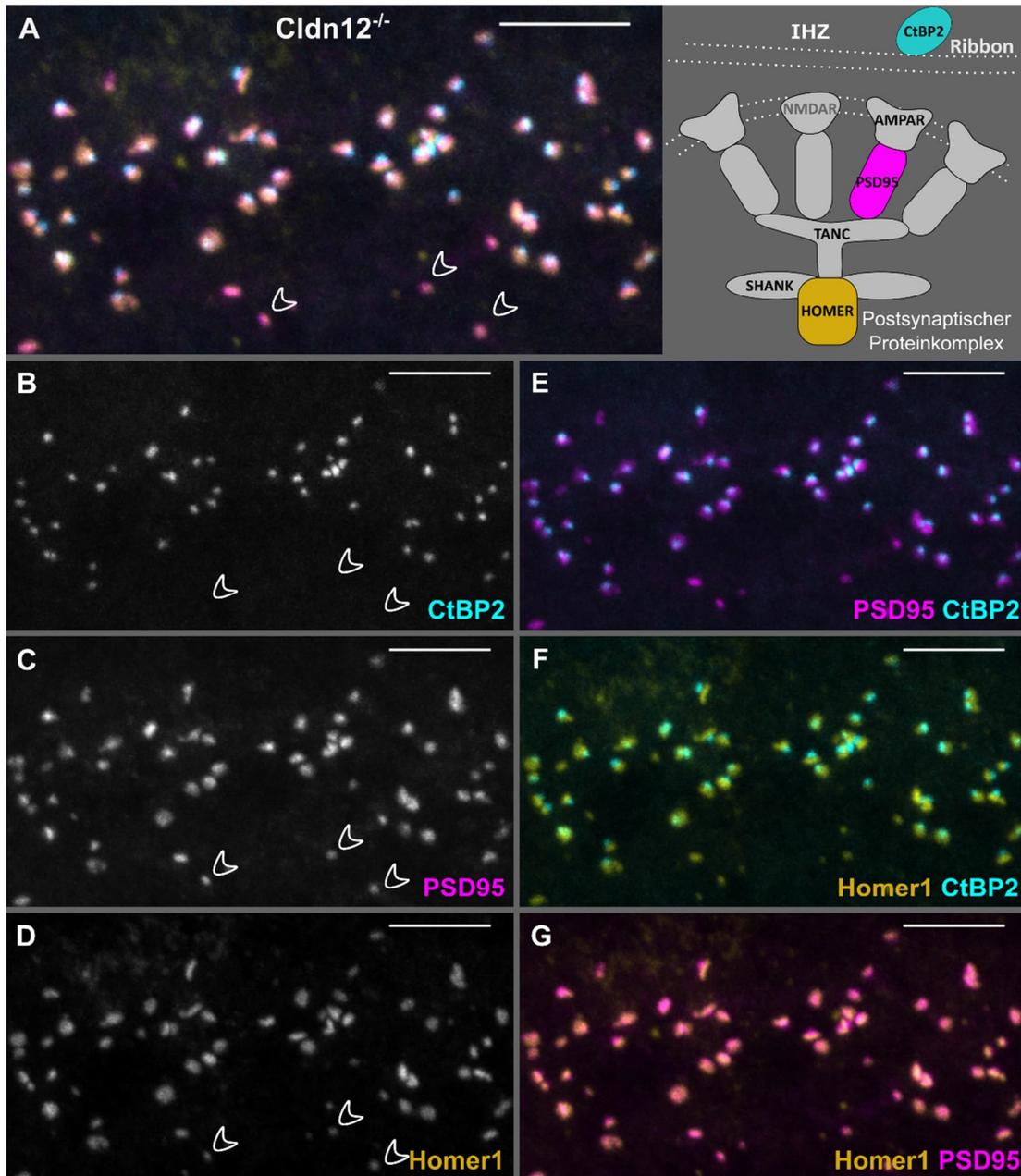


Abbildung 50: Immunhistologische Dreifachfärbung der Prä- und Postsynapsen einer drei Wochen alten *Cldn12^{-/-}*-Maus.

A-G, MIPs von Detailaufnahmen aus dem basalen Bereich von drei IHZ. **A**, Überlagerung der Immunfluoreszenz-Signale gegen die Target-Proteine CtBP2 (zyan), PSD95 (magenta) und Homer1 (gelb) und schematische Darstellung der relativen Anordnung der Proteine zueinander. **B-D**, Einzelkanäle für CtBP2 (**B**), PSD95 (**C**) und Homer1 (**D**). Die paarweisen Kombinationen (**E-F**) bestätigen die relative Position der prä- (CtBP2) und postsynaptischen Proteine (PSD95, Homer1). **A-D**, Pfeilköpfe deuten auf ungepaarte Postsynapsen im *Cldn12^{-/-}*-CP. Maßstab: 5 μ m.

3.4.2 Histologische Analyse von äußeren Haarzellen

Während der von mir betreuten Bachelor-Arbeit von Viola Niemann fiel auf, dass im CP von *Cldn12*-Mäusen äußere HZ fehlten. Dieser Befund wurde daraufhin als möglicher *Cldn12*-induzierter Phänotyp untersucht.

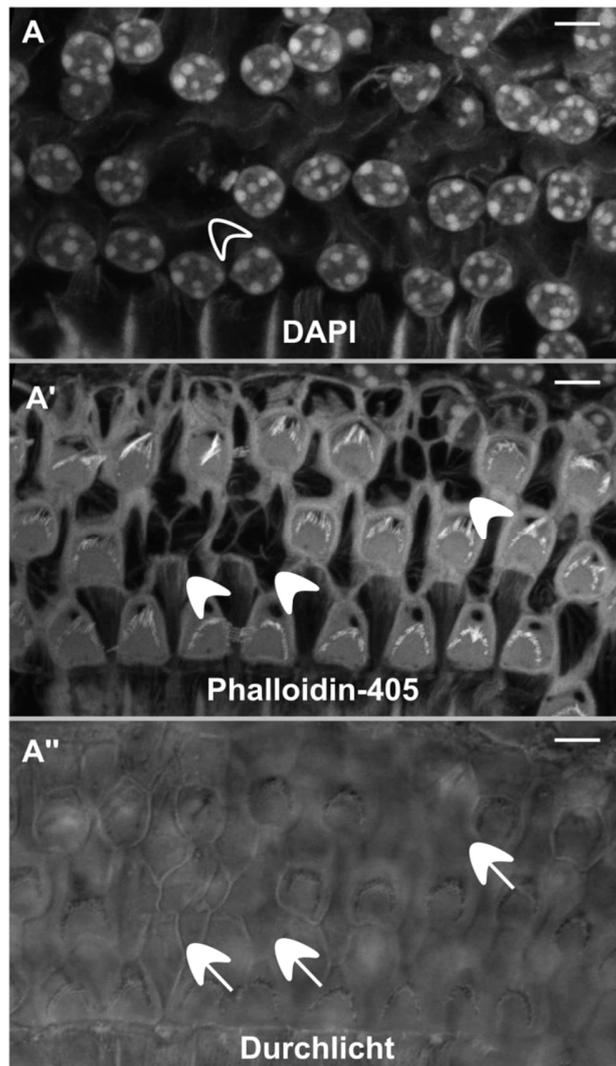


Abbildung 51: Intaktes Epithelgewebe trotz einzelner fehlender äußerer Haarzellen bei *Cldn12*^{-/-}-Mäusen.

A-A'', Eine Detailaufnahme von etwa 25 ÄHZ einer drei Wochen alten *Cldn12*-defizienten Maus zeigt Lücken in den Reihen der ÄHZ in einer MIP für DAPI (**A**, leerer Pfeilkopf), Phalloidin-405 (**A'**, gefüllte Pfeilköpfe) und im DL (**A''**, Pfeile). **A''** zeigt ein geschlossenes Epithelgewebe für die CP der *Cldn12*^{-/-}-Mäuse. Maßstab: 5 µm.

In der Abbildung 51 ist ein Ausschnitt eines CP mit Fokus auf die Zellkernfärbung (DAPI-Fluoreszenz, **A**), Kutikularplatten und Stereozilien (mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin-405, **A'**) bzw. im Durchlichtbild (**A''**) abgebildet. Man erkennt anhand des fehlenden Zellkerns eine

fehlende ÄHZ (Abb. 51A; leerer Pfeilkopf). Zudem wirkt die äußerste (obere) Reihe der ÄHZ weniger strukturiert als die mittlere und innere Reihe. Vergleicht man den gleichen Ausschnitt mittels der Kutikularplatten (Abb. 51A'), wird die leere Position von drei fehlenden ÄHZ sichtbar (gefüllte Pfeilspitzen). Aus diesen Fehlstellen in den Kutikularplatten ergab sich die Frage, ob das normalerweise dichte Epithelgewebe tatsächlich offen ist, was gravierende Folgen für das EP und das Schicksal der Haarzellen hätte. In der Durchlichtdarstellung (Abb. 51 A'') wird sichtbar, dass das Epithelgewebe ähnlich einem Narbengewebe verschlossen ist. Die Hörleistung der Tiere wurde anschließend durch ABR-Messungen (Abb. 54, 55) untersucht.

Um die Lücken bei den ÄHZ statistisch zu erfassen, wurden Phalloidin-405 markierte CP von drei und acht Wochen alten *Cldn12^{+/+}*- und *Cldn12^{-/-}*-Mäusen in unterschiedlichen Windungen (apikale/mediale Windung zu apikal, midbasale/basale Windung zu basal zusammengefasst) aufgenommen (Abb. 52). Die drei Reihen der ÄHZ liegen wie üblich im basalen Bereich deutlich enger zusammen als in der apikalen Windung. Man erkennt, dass sowohl bei *Cldn12^{+/+}*- als auch bei *Cldn12^{-/-}*-Mäusen in allen drei Reihen ÄHZ vereinzelt oder auch doppelt fehlen. Die statistische Auswertung zeigt (Abb. 53) Unterschiede zwischen Genotypen, Altersstufen und cochleären Windungen.

In der Altersstufe von 3 Wochen fand sich im apikalen Bereich bei den *Cldn12^{-/-}*-CP eine merkliche Degeneration von im Median 5 % der ÄHZ, die bis zum Alter von 8 Wochen stabil blieb. Ein solches Phänomen gab es im basalen Bereich der *Cldn12^{-/-}*-CP nicht, und auch nicht bei den apikalen oder basalen *Cldn12^{+/+}*-CP. Es ist zu beachten, dass die Datenbasis für basale CP im Gegensatz zur apikalen Windung junger Tiere geringer ist. In der Altersstufe von 8 Wochen zeigten *Cldn12^{+/+}*-Mäuse im apikalen Bereich den gleichen Degenerationsgrad von ÄHZ wie die *Cldn12^{-/-}*-Mäuse. Im basalen Bereich hingegen wiesen die CPs der *Cldn12^{-/-}*-Mäuse signifikant höhere Degeneration (%) als die *Cldn12^{+/+}*-Mäuse. Während der Anteil an fehlenden ÄHZ in apikaler und basaler Windung von älteren *Cldn12^{-/-}*-Mäuse vergleichbar blieb, nahm die Anzahl der Lücken im Wildtyp Richtung basale Windung hin ab.

Zusammengefasst deutet sich ein Bild an, bei dem *Cldn12^{-/-}*-Tiere von der ÄHZ-Degeneration früher betroffen sind als *Cldn12^{+/+}*-Tiere und die apikale Windung früher als die basale. Die hier beobachtete Degeneration von ÄHZ wirft die Frage auf, wie es bei späteren Altersstufen des FVB/N-Hintergrunds und speziell bei den *Cldn12^{-/-}*-Tieren aussieht. Die zur Beantwortung dieser Fragen nötigen Experimente konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

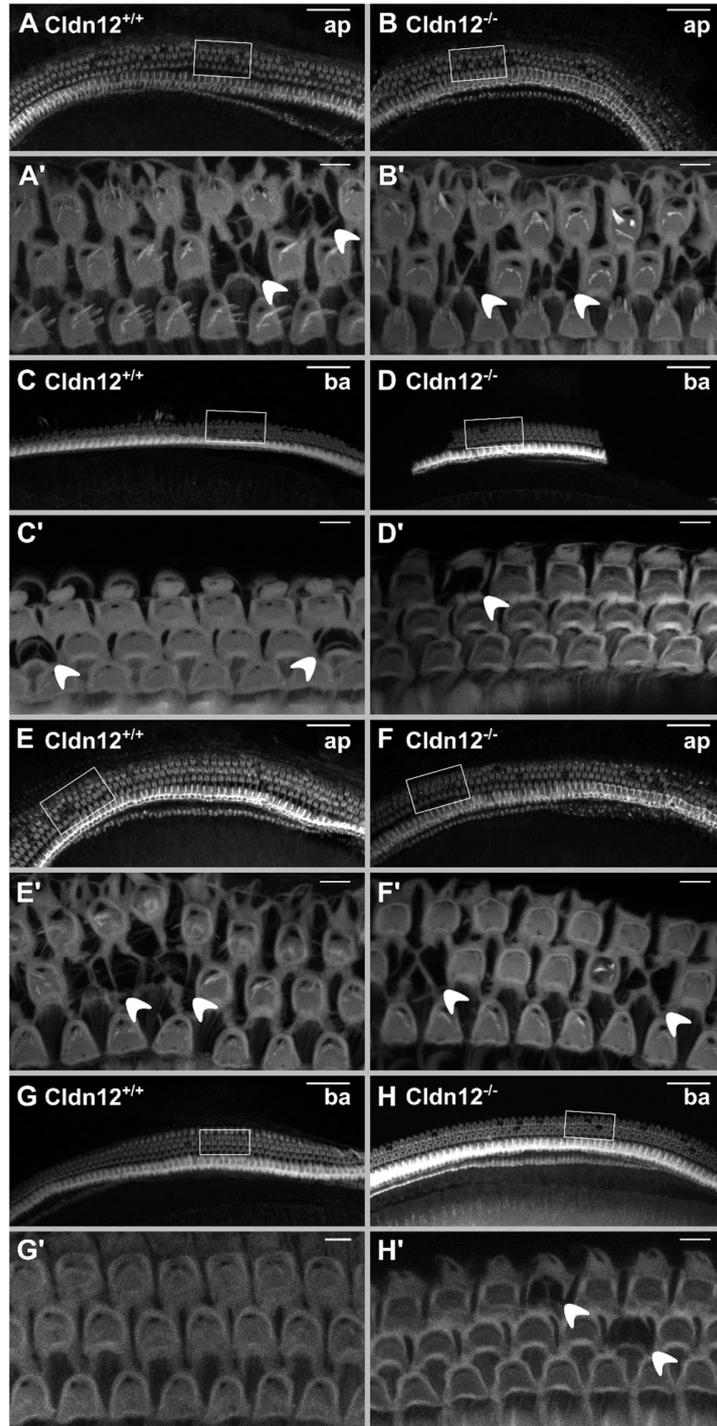


Abbildung 52: Degeneration äußerer Haarzellen in apikalen und basalen Windungen des Corti-Präparats von $Cldn12^{+/+}$ - und $Cldn12^{-/-}$ -Mäusen.

A-H, Konfokale Aufnahmen (MIPs) von Phalloidin-405 gefärbten CP von drei (A-D) und acht (E-H) Wochen alten $Cldn12^{+/+}$ -Mäusen (A, C, E, G) und $Cldn12^{-/-}$ -Mäusen (B, D, F, H), in der Übersicht der apikalen (A, B, E, F; ap) und basalen (C, D, G, H, ba) Windung. A'-H', Detailaufnahmen der Kutikularplatten der ÄHZ eines fest definierten Analysebereich (entspricht den Kästchen in den zugehörigen Übersichtsbildern) von ca. 24 ÄHZ. Pfeilköpfe zeigen Lücken aufgrund fehlender ÄHZ. Maßstab A-H: 50 μm , A'-H': 5 μm .

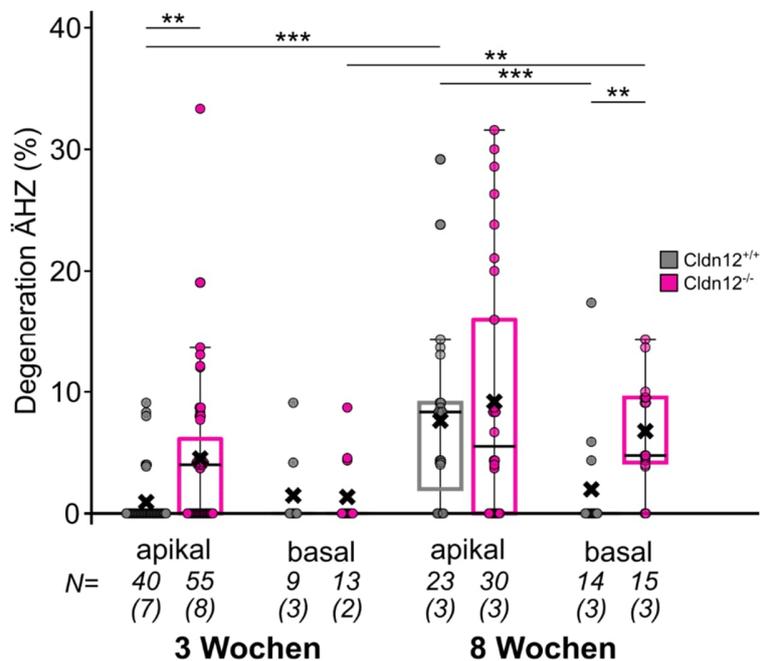


Abbildung 53: Analyse der Degeneration äußerer Haarzellen bei Cldn12^{+/+}- und Cldn12^{-/-}-Mäusen. Box-Plots der prozentualen Degeneration der ÄHZ, die in insgesamt 199 Abschnitten von je 8-10 Bereichen für ca. 7-8 ÄHZ in 3 Reihen analysiert wurde. Es sind Daten von Wildtypen (grau) und Claudin-12-defizienten Tieren (pink) im Alter von drei und acht Wochen mit den Einzelwerten, dem Median (Querstrich) und dem Mittelwert (x) dargestellt. Die Boxen zeigen 25% und 75% Perzentile an; Whisker den Wertebereich vom Minimum bis zum Maximum. Darüberhinausgehende Datenpunkte sind Ausreißer gemäß Ausreißertest (siehe Material und Methoden). Signifikanz-Niveau nach Kruskal-Wallis-Test: ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. N = Anzahl der Abschnitte, darunter die Anzahl der Tiere in Klammern.

3.4.3 Hörmessdaten von Cldn12^{+/+}- Mäusen und Cldn12^{-/-}- Mäusen

Vereinzelte Lücken bei den ÄHZ sowie das Vorhandensein ungepaarter Postsynapsen bei Claudin12-defizienten Cldn12^{-/-} Mäusen legten die Vermutung nahe, dass deren Hörleistung beeinträchtigt sein könnte. Deswegen wurden 8 Wochen alte Cldn12^{+/+}- und Cldn12^{-/-}- Mäuse Click-ABR- (Abb. 54) und f-ABR-Messungen (Abb. 55) unterzogen. Das Alter wurde entsprechend gewählt, um einen direkten Vergleich zu den Daten der initialen Hörmessungen von Slack-Wildtypen herstellen zu können. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die genetischen Hintergründe von Cldn12-Mäusen (FVB/N) und Slack-Mäusen (C57BL/6N) unterschiedlich sind.

3.4.3.1 Ergebnisse der ABR-Wellen nach einem Klick-Stimulus

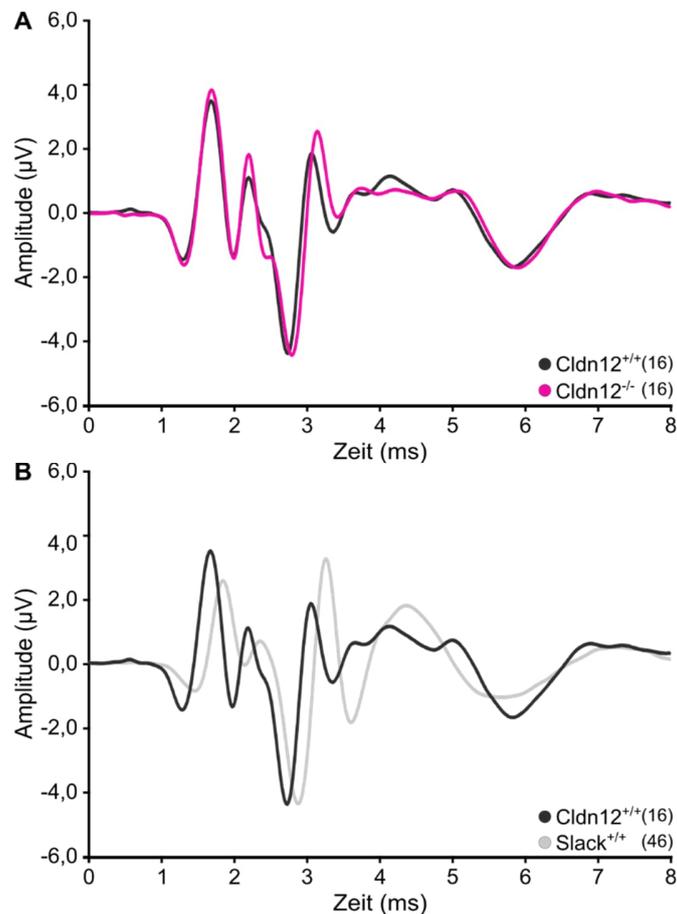


Abbildung 54: Gemittelte Klick-ABR Wellenform zeigen vergleichbare Amplituden und Latenzen für Welle I bei beiden Genotypen.

A, B, Gemittelte Click-ABR Wellenformen 30 dB über der individuellen Hörschwelle von acht Wochen alten **(A)** Cldn12^{+/+}- (grau) und Cldn12^{-/-}- Mäusen (pink) und **(B)** Slack^{+/+}- (hellgrau) und Cldn12^{+/+}-Mäusen (dunkelgrau). **B,** Vergleichende Darstellung der gemittelten Wellenform 30 dB über der Hörschwelle zwischen Wildtyp-Mäusen der C57B/6N und der FVB/N Linie.

Abbildung 54 zeigt die gemittelten Potentiale 30 dB über der Hörschwelle nach einer Click-Stimulation von Cldn12^{+/+}- und Cldn12^{-/-}- Mäusen (A) sowie Cldn12^{+/+}- und Slack^{+/+}- Mäusen (B). Während die Verläufe der Click-Wellenformen von Cldn12^{+/+}- und Cldn12^{-/-}-Mäusen sehr ähnlich waren, zeigten sich zwischen den Wildtypen der Cldn12-Mäuse (FVB-Linie) und der Slack-Mäuse (C57BL/6N-Linie) deutliche Unterschiede. Überraschenderweise wiesen die FVB/N-Mäuse deutlich kürzere Latenzen (negativer Peak bei 1,28 ms) und damit eine schnellere Signalverarbeitung auf als die C57BL/6N-Mäuse (negativer Peak bei 1,46 ms). Für die Welle I betrug der negative Peak für die gemittelten Amplituden bei den Cldn12^{+/+} - 1,4 µV und bei den Slack^{+/+}- Mäusen -0,8 µV. Dies macht Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien deutlich.

3.4.3.2 Frequenzabhängige ABR-Hörschwellen

Anschließend wurden f-ABR-HS bei *Cldn12^{+/-}*- und *Cldn12^{-/-}*-Mäusen bestimmt. Das Audiogramm in Abb. 55 zeigt die gemittelten f-ABR-HS der beiden *Cldn12*-Genotypen und zum Vergleich die f-ABR-HS aller in die Versuche gegangenen *Slack^{+/+}*-Mäuse (N = 46 Ohren).

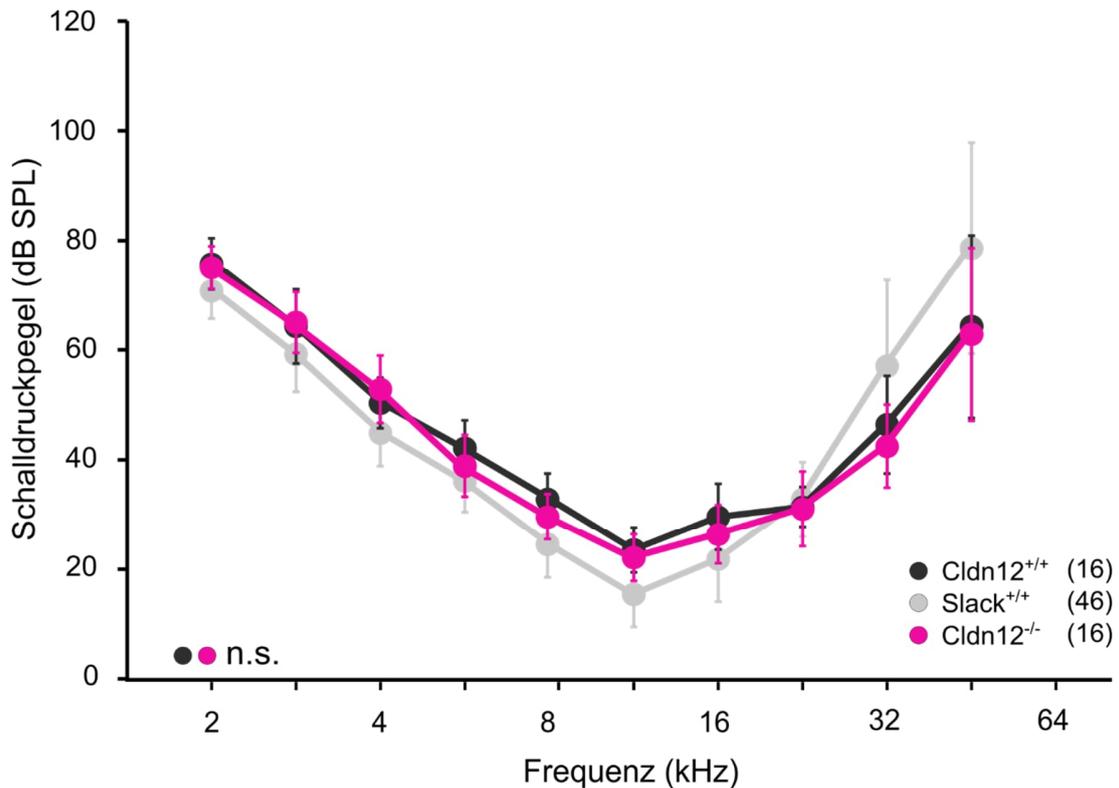


Abbildung 55: Vergleich der gemittelten frequenz-spezifischen ABR-Hörschwellen.

Audiogramm von acht Wochen alten *Cldn12^{+/-}*- (grau), *Cldn12^{-/-}*- (pink) und *Slack^{+/+}*-Mäusen (hellgrau). Der paarweise Mann-Whitney-U-Test) zwischen den *Cldn12^{+/-}*- und *Cldn12^{-/-}*-Mäusen ergab keine signifikanten Unterschiede (jeweils N = 16 Ohren).

Zwischen den *Cldn12^{+/-}*- und *Cldn12^{-/-}*- Tieren lagen die Unterschiede bei maximal 4 dB SPL (32 kHz) und waren für keine Frequenz signifikant unterschiedlich. Die Hörschwellen für den mittelfrequenten Bereich (bestes Hören: 8-16 kHz) der *Slack^{+/+}*- Mäuse lagen im Mittel etwa 8 dB niedriger als die der *Cldn12^{+/+}*-Wildtypen. Hier zeigten Sie *Slack*-Mäuse besseres Hören, wohingegen die im hochfrequenten Bereich die HS der Claudin-Mäuse bis zu 14 dB tiefer lagen. Hier kam wieder die altersabhängige HS-Zunahme des *Slack*-Hintergrundes C57BL/6N zum Tragen.

Zusammengefasst zeigen die *Cldn12^{-/-}*-Mäuse im Alter von 8 Wochen die gleichen frequenzabhängigen Hörschwellen wie die Wildtypen der gleichen Mauslinie, obwohl bei ihnen zusätzlich im basalen Bereich ca. 5 % der ÄHZ fehlen. Das Fehlen des *Cldn12*-Proteins bzw. das

Inserieren eines LacZ-Proteins zeigte in den Hörmessungen keinen Phänotyp, trotz Expression von Cldn12 im Bereich der IHZ. Die Untersuchung älterer Tiere oder eine Exposition gegenüber Schalltrauma könnte künftig zur Aufklärung der Funktion von Cldn12 beitragen.

4 Diskussion

4.1 Claudin12 in der Cochlea

Die Hörschwellen von 8 Wochen alten Cldn12-defizienten Mäusen waren von denen des Cldn12-Wildtyp nicht verschieden (Abb. 55); ein Cldn12-basierter auditorischer Phänotyp ist daher bis jetzt nicht definierbar. Das Fehlen der ÄHZ sogar bei Cldn12^{+/-}-Mäusen scheint dem FVB/N-Hintergrund geschuldet zu sein, da dieses Phänomen in anderen Publikationen über Haarzellen dieser Linie ebenfalls berichtet wurde (Kommareddi et al., 2015; Zhang et al., 2023). Die verminderte Verstärkeraktivität der ÄHZ ist offenbar zu klein, um sich in veränderten Hörschwellen widerzuspiegeln. Lücken in den Reihen der ÄHZ wurden bereits durch umgebende Stützzellen geschlossen, sodass die Kutikularplatten intakt blieben und ein stabiles EP aufgebaut werden konnte (Abb. 51; Raphael, 2002).

Die Forschergruppe um Todd Alexander konnte zeigen, dass in ihren Studien ein Effekt bei der Cldn12-Deletion erst mit einem gleichzeitigen Cldn2-Knockout deutlich wurde (Beggs et al., 2021). Es könnte also sein, dass beide Claudine physiologisch verbunden, das Fehlen des jeweils anderen Claudins ausgleichen könnte (Mineta et al., 2011).

Jedoch könnten Cldn12^{-/-}-Mäuse durch die Herausforderung eines Schalltraumas durchaus einen Phänotyp zeigen. Hohe mechanische und biochemische Belastung des Systems könnten zur Undichtigkeit von *tight junctions* im Bereich der Haarzellen führen, wodurch diese durch K⁺-Ströme von der Endolymphe in die Perilymphe dauerdepolarisiert würden und absterben könnten. Zudem könnte es in der hier nicht näher untersuchten *Stria vascularis* zu akustischen Funktionseinbußen kommen, etwa durch einen Effekt auf das EP (Wilcox et al., 2001). Da in dieser Arbeit Gefrierschnitte der intakten Cochlea etabliert wurden, wäre eine erweiterte Untersuchung der LacZ-Expression in den Schnitten eine gute Methode, um die Lokalisation und damit die Funktion von Claudin12 besser zu charakterisieren. Um den aktuellen Forschungsschwerpunkt der cochleären Synaptopathie dieser Arbeitsgruppe mit Cldn12-defizienten Mäusen durchzuführen, sollten die Tiere jedoch über mindestens 5 Generationen in den Hintergrund der C57Bl6/N-Linie eingekreuzt verpaart sein, um eine Vergleichbarkeit mit den vorhandenen Daten zu gewährleisten. Die Studie von (Reijntjes et al., 2020) zeigt zum Beispiel Linien-abhängige Unterschiede zwischen den verwendeten Mauslinien CBA/CaJ, FVB/NJ und C57BL/6J bei dem relativen Vergleich der prä- und postsynaptischen Proteinexpression.

4.2 Lokalisation von Slack-Protein in der Cochlea weiterhin unbekannt

Die Expression von Slack-mRNA (*kcnt1*) wurde in den SGN-Typen Ia, Ib und Ic von Mäusen mittels *single cell sequencing* gezeigt (Shrestha et al., 2018). Eine Zelltyp-spezifische Bestätigung einer Expression von *kcnt1* in der Cochlea und die Lokalisation des Slack-Proteins konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgen. Zum einen konnte kein Antikörper gefunden werden, der das Epitop sowohl im Western-Blot als auch im Gewebe zuverlässig erkannte. Ein wichtiger Unterschied zwischen bei der Bewertung der Ergebnisse beider Methoden ist die Anhäufung des Target-Proteins durch die Membran-Präparation und schließlich die Akkumulation als Bande auf der Membran des Western-Blots. Diese Anreicherung zeigte eine spezifische (Slack-KO-kontrollierte) Bande mit dem anti-Slack-Antikörper Slo2.2 (Abb. 17). Allerdings geht die natürliche Konformation des Proteins durch die Solubilisierung mit SDS bei der Methode des Western-Blots verloren, das Protein liegt linearisiert vor. Bei der Immunfluoreszenzmethode im Gewebe hingegen kann die Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins das Epitop unzugänglich machen, oder das Epitop kann durch assoziierte Proteine und Co-Faktoren maskiert werden. Zudem sind viele Ionenkanäle in den Zellen nur in geringen Expressionszahlen vorhanden.

Des Weiteren konnte die RNA-Scope®-Methode zum zellulären Nachweis der *kcnt1*-mRNA-Expression noch nicht ausreichend optimiert werden (Abb. 23). Es müsste in künftigen Versuchen getestet werden, ob die Anzahl der positiven *kcnt1*-Punkte erhöht werden kann, oder ob die Funktion der Slack-Kanäle in ausgereiften Spiralganglienneuronen tatsächlich mit einer sehr geringen Anzahl mRNA-Moleküle einher geht. Die Synthese solcher hochkomplexen Proteine ist in der Regel mit hohen biologischen Kosten verbunden. Folglich dürfte die Turnover-Rate dieser Proteine, also die Synthese und der Austausch während der Lebenszeit einer differenzierten Zelle, gering sein. Entsprechend wäre auch nur eine geringe Anzahl an Kopien der mRNA eines Ionenkanals in einer Zelle wahrscheinlich.

Im Folgenden wäre die Frage interessant, ob sich die Expressionstärken von *Slack* in bestimmten Subklassen der SGN unterscheiden, und damit ein Hinweis auf eine Fasertyp-spezifische Rolle des Proteins bestünde. Durch Erweiterung und Anpassung der *Slack*-Hybridisierungssonden mit Subtyp-spezifischen Sonden könnten hier weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Als Target-mRNA würden sich zum Beispiel Calbindin-28 kDa (*calb1*) als Marker für Typ Ib -SGN oder für LY6/PLAUR Domain Containing 1 (*lypd1*) für Typ Ic-SGN (Milon et al., 2021; Shrestha et al., 2018; Sun et al., 2018) anbieten.

Eine weitere Methode, um mehr Wissen über die Rolle von Slack in der Cochlea zu schaffen, wäre die Etablierung eines Reporter-Mausmodells für den Slack-Kanal. Das CRISPR/Cas9-vermittelte *knock-in* in Säugetiergenome ist mittlerweile eine Standardmethode in der

Molekularbiologie (Banan, 2020). Man könnte zum Beispiel über das Cre-LoxP-System ein konstitutiv transgenes Mausmodell erzeugen, also eines, bei dem jede Kopie des Gens modifiziert ist, da das Reportergen in die Keimzelle des später modifizierten Tier eingefügt wurde. Hier gibt es verschiedene Methoden das Reporter-System zu etablieren und zu nutzen. Das Gen kann man direkt manipulieren, etwa durch einen *tag* oder mittels Substitution des *kcnt1*-Gens durch ein Fluoreszenzprotein. Bei der ersten Herangehensweise wird ein recht kleiner Teil des Hämagglutinins (HA) an die N- oder C-terminale Domäne der Gensequenz angehängt (Scharinger et al., 2015). Das Target-Protein könnte durch den *tag* ein *loss of function* erfahren, falls es wichtige Bindungspartner oder die korrekte Quartärstruktur einbüßt, gleichzeitig wäre es aber über spezifische HA-Antikörper zu detektieren. In der Regel sind HA-tags zu klein, um den natürlichen Protein-Transport in den Zellen zu unterbinden, sodass das getaggte Protein korrekt den Zielort in der Zelle erreichen kann. Ähnlich wäre Substitution des *kcnt1* durch ein Fluoreszenz-Gen unter dem Promotor des *kcnt1*. Hier könnte man zwar eine recht sichere zelluläre Expression erwarten, müsste aber in Kauf nehmen, dass ein natürlicher Protein-Transport nicht mehr gegeben ist, da Bindungsmotive nicht mehr bestünden. Damit wäre eine Analyse der subzellulären Lokalisation von Slack nicht möglich.

Der Gedanke einer *kcnt1*-Reporter-Maus lässt sich auch zu einem Reporter-System funktioneller Eigenschaften weiterdenken.

Während es einfacher ist, ein konstitutiv transgenes System zu erzeugen, kann man auch aufwendiger ein konditional transgenes Tiermodell erzeugen. Die Modifikation kann entweder in einem bestimmten Gewebe oder zu einer bestimmten Zeit künstlich induziert werden (Eckrich et al., 2019; McLellan et al., 2017). Dafür wird wiederum konstitutiv ein Liganden-aktivierbares Cre-LoxP-System (Metzger & Feil, 1999) verwendet. Durch die Aktivierung beispielsweise in einer frühen embryonalen Phase sind prä- und postnatalen Entwicklungsprozesse der Hörbahn beeinflussbar und untersuchbar, während man den Verlust der Genfunktion in einem entwickelten System auch durch eine späte Induktion nach P12 untersuchen kann. Dazu hat sich zum Beispiel eine Doxycycline-induzierte Cre-Expression bewährt (McLellan et al., 2017). Dies könnte helfen zu klären, ob der Verlust der 2-3 Fasern je IHZ bei den Slack^{-/-}-Mäusen ohne Trauma ein sich entwickelnder Phänotyp ist, etwa nach Erregungs-induzierter Toxizität wegen fehlender Regulation durch den Slack-Kanal.

4.3 Methodische Vergleichbarkeit von Hörmessungen und Vertäubungen

4.3.1 Audiometrieanlagen

In dieser Arbeit wurden Daten von zwei formal identischen Audiometrieanlagen (Audiology Lab, Otoconsult, Markus Müller, Frankfurt/M) erhoben. Dabei gab es leicht bessere HS für die Klick-ABR bei 15 Wochen alten Tiere in der Messanlage der Universitäts-HNO-Klinik Homburg gegenüber den 8 Wochen alten Mäusen, die im Hörmesslabor der Versuchstierhaltung des CIPMM erhoben wurden (Abb. 24).

Die HNO-Klinik nutzt eine „Camera Silenta“, einen schalltoten Raum, als Messumgebung für die Tiere. Im Hörmesslabor der Versuchstierhaltung des CIPMM, in dem die meisten Tiere die ABR-Messungen und Vertäubungen erhielten, gab es eine relativ kleine schallisolierte Versuchskammer. Dieser Unterschied könnte die minimal besseren Hörschwellen der in der Klinik gemessenen Tiere erklären, da eine (noch) stillere Umgebung zu einer besseren intrinsischen Signal-zu-Rausch-Diskriminierung führt. Zusätzlich sind zwei weitere Faktoren zu bewerten. Zum einen wurden die HS in der HNO-Klinik von einem anderen Wissenschaftler ausgewertet (1) und zum anderen erhielten die Tiere in der HNO-Klinik eine andere Narkose-Zusammensetzung (2) als die Mehrheit der Tiere in dieser Studie.

(1) Einfluss der auswertenden Person auf die Ergebnisse der HS:

Zur Bestimmung der HS gibt es feste Grundregeln, die eine valide ABR-Welle, also eine akustisch stimulierte neuronale Potentialantwort, definieren. Aber gerade im Übergangsbereich, in dem die Potentiale aus dem Rauschen herauskommen (an der Hörschwelle) gibt es einen leichten Spielraum für subjektive Interpretation, die bei einer Anregungsschrittweite von 5 dB bereits zu einer ebensolchen Diskrepanz führen kann (Vidler & Parkert, 2004). Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an den beiden Hörmessanlagen liegen genau innerhalb dieser 5 dB, sodass von einer vergleichbaren Interpretation zwischen den Wissenschaftler*innen ausgegangen werden konnte. Intern wurde die Auswertung zwar nicht für KO und WT verblindet vorgenommen, aber es erfolgte immer eine Kontrolle mittels Teilauswertung durch andere Wissenschaftler*innen, die keine Kenntnisse der Genotypen hatten. Deren Auswertung wich im Mittel nur minimal von der eigenen Auswertung ab; einzelne verrauschte Ableitungen konnten eine individuelle Diskrepanz von max. 10 dB ausweisen, die meisten verglichenen HS-Ergebnisse lagen exakt beim gleichen Wert.

Trotzdem blieb es nicht aus, dass der Experimentator und Auswerter im Laufe der Arbeit Routine bei der eigenen Einschätzung der HS entwickelten. Dies führte bei einer Wiederholung von frühen

Auswertungen zu einer Korrektur einiger HS, aber auch zum Verwerfen weniger HS. Diese Datenreduktion erfolgte vor allem für die Frequenz 32 kHz, bei der es in den Hörmessungen immer wieder zu Messartefakten kam, die sich in den Audiogrammen widerspiegelten. Deswegen war die Anzahl der Daten, die in die Statistik und die Grafiken einging, bei 32 kHz gegenüber der Anzahl der Daten bei niedrigeren Frequenzen deutlich reduziert.

Eine rein objektive bzw. automatische Auswertung der HS wurde bereits in vielen Laboren weltweit versucht, ist aber bisher nicht überzeugend gelungen (Suthakar & Liberman, 2019a; Wang et al., 2021). Probleme liegen im schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei kleinen Pegeln und an den Rändern des Frequenzbereiches sowie in der jeweiligen Elektrodenposition. Weitere Probleme sind die individuellen Abweichungen von einer standardisierten ABR-Welle, insbesondere bei unterschiedlichem genetischen Mauslinienhintergrund, genetischen Veränderungen oder nach Schäden.

(2) Einfluss der Narkose auf die erhobenen Messwerte:

Die Narkose hat einen wichtigen direkten und indirekten Einfluss auf die Ergebnisse einer Hörmessung. In diesem Zusammenhang soll nicht unerwähnt bleiben, dass unterschiedliche Narkosemittel zu unterschiedlichen Hörschwellen führen können. Isofluran-Narkosen bei Mäusen führen z.B. zu deutlich schlechteren Hörschwellen und DPOAE-Amplituden als die übliche Ketamin-Xylazin-Narkose für Hörmessungen (Kim et al., 2019; Ruebhausen et al., 2012; Verdoodt et al., 2021). Eine Anästhesie mit Benzodiazepinen und Opioiden erlaubt eine primäre akustische Reizverarbeitung weitgehend (Schwender et al., 1994). In der HNO-Klinik wurde die Narkose der Versuchsmäuse für eine einmalige ABR-Messung, kombiniert mit einer DPOAE-Messung, mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin durchgeführt. Ketamin ist ein Anästhetikum mit nichtkompetitiver Hemmung von NMDA-Rezeptoren, die eine ausreichende Analgesie bei erhaltenem Wachzustand ohne Beeinträchtigung der Vitalfunktionen erlaubt. Es wirkt beim Menschen etwa so stark wie Morphin (Motov et al., 2015). Xylazin hat muskelentspannende, sedierende und analgetische Eigenschaften als ein $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonist im zentralen und peripheren Nervensystem (Greene, 1999). Die Fentanyl-Mixtur, das opioidhaltige Narkoanalgetikum der Versuchsreihe im Hörmesslabor des CIPMM, hat etwa eine 80-fache Wirkintensität verglichen mit Morphin (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2022) und ist damit deutlich stärker als eine Ketamin-Narkose. Zusätzlicher Vorteil und Grund für die Nutzung von Fentanyl war, dass dessen Wirkung im Körper durch den Antagonisten Naloxon aufhebbar ist. Bei den Versuchsreihen mit vielen Wiederholungen der ABR-Messungen im Abstand von wenigen (1 bis 14) Tagen war die antagonisierbare Narkose von der zuständigen

Behörde, dem Landesamt für Verbraucherschutz, Abt. C „Amtstierärztlicher Dienst, Lebensmittelüberwachung“ angeordnet worden, um die Narkosebelastung für die Tiere zu reduzieren. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass trotz zweier unterschiedlicher Narkosen während der ABR-Messungen in der HNO-Klinik und im Hörmesslabor des CIPMM sehr ähnliche HS ermittelt wurden.

4.3.2 Vertäubungsstudien im Vergleich

Publikationen zu den Auswirkungen von Schalltraumata, in denen nur Klick-HS und zugehörige Amplituden und Latenzen der ABR-Wellen bestimmt wurden, können auf Dysfunktionen in den Verschaltungspunkten auditorischer Verarbeitung hindeuten (Mehraei et al., 2016). Eine Analyse der Hörfähigkeit mittels Klick-ABR gibt jedoch nur einen groben Überblick, da durch das breite Frequenzspektrum der Klick-Anregung die Antwort über einen großen Teil der Cochlea gemittelt wird (Suthakar & Liberman, 2019). Die Klick-Anregung verschleiert die Effekte des Traumas sogar so sehr, dass der Beitrag der hohen Frequenzen und damit des direkten Schadens untergeht, wie in Abb. 27 und Abb. 33 zu sehen ist. Daher ist für ein differenziertes Schadensbild die Analyse der f-ABR-Daten zwingend nötig.

Die Vergleichbarkeit der vorliegenden Untersuchung mit Studien, bei denen während einer Vertäubung gänzlich auf eine Narkose verzichtet wurde, wie es bei den meisten wissenschaftlichen Publikationen zum Thema Schalltrauma und Synaptopathie der Fall ist, ist ein weiterer Aspekt, der einer Diskussion bedarf.

Der Schall-induzierte Hörverlust (NIHL, *noise-induced hearing loss*) wird schon länger an Mäusen und anderen Nagetieren untersucht (Le et al., 2017; Spoendlin, 1971; Spoendlin & Brun, 1973). Bei einigen Studien zur Vertäubung ohne Narkose wurde der Verlust von sensorischen Haarzellen dokumentiert (Fernandez et al., 2020; Guo et al., 2021; Hill et al., 2016; Wei-ju et al., 2010), beispielweise durch eine epigenetische Hochregulation der AMP-aktivierten Proteinkinase (Hill et al., 2016). Diese Kinase ist wichtig für den Energiehaushalt einer Zelle, indem sie als Reaktion auf zellulären Stress von einem Energie-konsumierenden Stoffwechselweg zu einem Energie-generierenden Mechanismus wechseln kann. Schäden an der *Stria vascularis* und Aktivierung verschiedener Immunsystemzellen als Teil einer Entzündungsreaktion wurden als Folge einer Stressantwort des Immunsystems auf Schalltraumata untersucht (Frye et al., 2019; Hirose et al., 2005; Manickam et al., 2023; Milon et al., 2021; Warchol, 2019).

Ein Kennzeichen einer guten Tierhaltung ist, die Tiere in einer geräuschreduzierten Umgebung zu halten, um den Stress der Tiere gering zu halten (Anthony et al., 1959; Turner et al., 2007). Bei Versuchen mit Labormäusen und Stressinduktion durch die Geräuschkulisse eines laufenden Staubsaugers (Jensen et al., 2010) zeigten die Mäuse bereits erhöhte Werte von Corticosteron,

dem Maus-Analogen zum Cortisol beim Menschen (Leenaars et al., 2020). Ein durchschnittlicher Staubsauger produziert einen Pegel von etwa 70 dB SPL und ist damit deutlich leiser als das hier verwendete milde Trauma von 100 dB SPL (Gourévitch et al., 2014). Biologisch betrachtet fällt es schwer, Mäusen eine natürliche evolutive Anpassung an Stress durch Schall zu unterstellen, verglichen zum Beispiel mit einer evolutiven Anpassung an olfaktorischen Stress. Die Folgen von Lärm begleitet von einer massiven Stressreaktion auf die Geräusche könnten sich von den Folgen von Lärm ohne größere Stressreaktion bei narkotisierten Tieren unterscheiden.

Die Frage der Unterschiede der Wirkung eines Schalltraumas in Narkose (diese Arbeit) oder am wachen Tier, z.B. (Kujawa & Liberman, 2009) lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht final beantworten. Potentiell protektive Reflexe wie Stapediusreflex (Borg et al., 1983) oder der mediale olivocochleäre Reflex (J. J. Guinan, 2018; J. J. Guinan, 2010; Maison et al., 2013), der die ÄHZ hemmt, funktionieren auch unter Narkose. Der Stapediusreflex ermüdet jedoch innerhalb kürzester Zeit und sollte keine Rolle spielen. Bei wachen Tieren, die während der Schallexposition ein *freezing*-Verhalten zeigen, ist zu vermuten, dass das bewusste Erleben des Schalltraumas bei ihnen zu Stress führt, der über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Stressachse (Herman et al., 2003) zu systemischen und lokalen Wirkungen auf die Schadensereignisse führen kann (Marchetta et al., 2022).

In einer aktuellen Untersuchung (Jongkamonwivat et al., 2020) wurden anästhesierte und wache Mäuse des Linienhintergrunds FVB dem gleichen Schallpegel ausgesetzt mit dem Ergebnis, dass es bei den narkotisierten Tieren zwar eine höhere TTS gab, die PTS jedoch nach 7 bis 14 Tagen zwischen beiden Gruppen gleich war.

Es wäre wünschenswert, die in dieser Arbeit untersuchte Mauslinie C57Bl6/N in einem systematischen Versuch mit Vertäubung am wachen Tier bzw. am narkotisierten Tier mit größeren Gruppengrößen zu untersuchen, um die Effekte der Stressreaktion besser einschätzen zu können.

4.4 Das Hörvermögen der WT-Mäuse und die Synaptopathie-Studie von Kujawa und Liberman

Kujawa und Liberman entdeckten das Phänomen der cochleären Synaptopathie in der Mauslinie der CBA/CaJ (Kujawa & Liberman, 2009). Sie fanden irreversible Verluste von Ribbons und Nervenfasern im höheren Frequenzbereich nach einem Schalltrauma (Abb. 6), das auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. Für die Wildtypen beider Studien - CBA/CaJ vs. C57Bl6/N - kann man daher die Ergebnisse einem Vergleich unterziehen. Dabei muss erwähnt werden, dass die CBA/CaJ-Tiere das Schalltrauma im wachen Zustand erlebten. Im midbasalen Frequenzbereich (22,6 kHz) beobachteten Kujawa und Liberman eine temporäre Schwellenerhöhung von ca. 40

dB 24 Stunden nach der Exposition (Abb. 6). In der vorliegenden Arbeit löste das Trauma eine Verschiebung um 66 dB direkt nach dem Trauma und noch 53 dB an Tag 1 (Daten nicht gezeigt) aus. Zwei Wochen nach dem Trauma waren die HS bei Kujawa und Liberman wieder im Ausgangsbereich (maximale Abweichung 5 dB) und blieben stabil über die nächsten 8 bis 12 Wochen. In dieser Arbeit waren nach 14 Tagen ebenfalls die niedrigsten Werte bei der Schwellenerhöhung nachweisbar, jedoch verschlechterten sich die HS bei 32 und 45 kHz leicht innerhalb der folgenden 2 Wochen, was mit der im hochfrequenten Bereich früh einsetzenden Altersschwerhörigkeit der C57Bl6/N Mauslinie verbunden sein könnte (Kane et al., 2012). Aufgrund der großen Datenmengen, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, war es nicht möglich zusätzliche Messstage, etwa Tag 14, der kompletten Analyse zu unterziehen. Diese Daten werden nun in folgenden Arbeiten ausgewertet.

Die Wachstumsfunktionen der Welle I wurden bei Kujawa und Liberman für 12 und 32 kHz ausgewertet und zeigte, dass über 8 Wochen im tieferen Frequenzbereich kaum Abweichungen zu einer Kontrollgruppe bestanden, während die Amplituden bei 32 kHz direkt nach dem Trauma stark reduziert waren. Im Mittel der hohen Schalldrücke lagen diese Werte 8 Wochen nach dem Schalltrauma bei etwa 50 % der Ausgangsamplitude, was einen Verlust an funktionellen auditorischen Neuronen andeutete. In der vorliegenden Arbeit präsentierte sich die Reduktion der Amplitude der Welle I nach 4 Wochen ähnlich (Abb. 31), was hier seinen Grund überwiegend in der Reduktion der Ribbons hat, die zu nicht-funktionalen Synapsen führt, s.u. Bei Kujawa und Liberman (2009) lag die Anzahl der Ribbons im apikalen und basalen Teil bei ca. 10 Ribbons/IHZ und im medialen und midbasalen Bereich bei ca. 15-17 Ribbons/IHZ, wie bei den Wildtypen der vorliegenden Arbeit über die gesamte Cochlea, und praktisch alle Ribbons befanden sich jeweils in Paarung mit einer Postsynapse. Bereits 24 Stunden nach der Exposition des Schalltraumas detektierten Kujawa und Liberman (2009) bei midbasalen Präsynapsen eine Reduktion der Anzahl auf etwa 7 Ribbons/IHZ (vgl. Abb. 6F) und eine Vergrößerung deren Fläche, die auch 8 Wochen nach Trauma unverändert blieb. In gleicher Weise verminderte sich die Anzahl der Postsynapsen bzw. postsynaptischen Fasern. Zwar gibt es in der vorliegenden Arbeit nur den Beobachtungszeitpunkt von 4 Wochen nach Trauma, doch gingen durch das Trauma im hochfrequenten Bereich in etwa der gleiche Anteil von Ribbons, aber deutlich weniger Postsynapsen als bei den CBA/CaJ-Mäusen unter (Abb. 44).

Wie ist es zu erklären, dass bei einem massiven Verlust der neuronalen Strukturen nach einem Schalltrauma nur eine minimale Erhöhung bzw. eine Regeneration der HS vorliegt? Die Erklärung ist, dass die HS unempfindlich gegenüber dem Verlust einzelner Neurone sind, da sie durch die relativ Trauma-resistenten SGN Typ Ia-Fasern bestimmt werden. Die ABR-Amplituden der Welle

I hingegen werden von der Anzahl aller synchron feuernenden Fasern bestimmt, und sind ein sensitives physiologisches Maß für die cochleäre Synaptopathie (M. C. Liberman, 2017).

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Verlust der Ribbons (Abb. 44) und damit Verlust der funktionalen synaptischen Verbindungen im hochfrequenten Bereich von ca. 50 % wirkte sich wenig auf die HS aus, allerdings lag bei den C57Bl6/N-Tieren ab 22,6 kHz eine PTS vor (Abb. 41). Studien von (Lavinsky et al., 2015; M. C. Liberman, 2017; Mehraei et al., 2016) wiesen nach, dass es sogar bei einem Verlust von 80 % der synaptischen Verbindungen nicht zwingend zu einem Effekt auf den in einem Audiogram sichtbaren HS kommen muss.

4.5 Das Hörvermögen von Slack^{-/-}-Mäusen

Die Hypothese, dass das Fehlen des Natrium-aktivierten K⁺-Kanal Slack in der konstitutiven Slack^{-/-}-Maus erhöhte Hörschwellen nach Trauma bewirkt, bestätigt sich in dieser Studie nicht. Weder waren bei den Slack^{-/-}-Mäusen eine besondere Sensibilität hinsichtlich der direkten Traumaschäden eines milden oder moderaten Traumas zu dokumentieren, noch ein schlechteres Regenerationsvermögen nach vier Wochen. Im Gegenteil, nach dem stärkeren Trauma von 106 dB SPL waren die HS bei 8 kHz und 11 kHz sogar besser als bei der Versuchsgruppe der Wildtyp-Mäuse (Abb. 34).

Möglicherweise ist dafür ein indirekter Effekt zuständig. Slack-Protein ist stark in Neuronen des auditorischen Hirnstamms, vor allem im MNTB (medialer Nucleus des Trapezkörpers) exprimiert und für die zeitliche Verarbeitung von AP und die Repolarisation wichtig (Bhattacharjee et al., 2002; Yang et al., 2006). Diese Neurone sind an zwei Reflexbögen beteiligt – zum einen über mediale olivocochleäre Efferenzen an der efferenten Inhibition der Elektromotilität der ÄHZ und zum anderen über laterale olivocochleäre Efferenzen an der Modulation der Afferenzen Typ I direkt unterhalb der IHZ-Synapse (J. J. J. Guinan, 2006). Der mediale olivocochleäre Reflex spielt eine Rolle bei der Protektion vor Lärmtrauma-Schäden und könnte bei Slack^{-/-}-Mäusen verändert sein (Maison et al., 2013). Weil andererseits die lateralen olivocochleären Efferenzen über verschiedene Transmitter wie Dopamin oder Acetylcholin die Aktivität der Typ I-Afferenzen längerfristig reduzieren können (Wu et al., 2020), könnte dieser Effekt beim Fehlen von Slack im Hirnstamm verändert sein, was in besseren HS der Slack^{-/-}-Mäuse nach dem 106 dB SPL-Trauma resultieren könnte.

4.5.1 Spezifische Neurodegeneration von SGN Typ I- Fasern bei Slack^{-/-}-Mäusen

Diese Arbeit zeigt, dass bei den Slack^{-/-}-Mäusen im Alter von 12 Wochen ohne jedes Trauma 2-3 Postsynapsen und damit Fasern pro IHZ weniger vorhanden sind als bei der Slack^{+/+}-Maus (Abb.

44). In zukünftigen Versuchen müsste geklärt werden, ob diese spezifische Neurodegeneration auch schon im Alter von 8 Wochen oder früher vorhanden ist, so dass ein Schalltrauma bei den Slack^{-/-}-Mäusen auf teilweise bereits geschädigte Synapsen trifft. Dieser Phänotyp einer sehr spezifischen Neurodegeneration als Folge des Fehlens des Slack-K⁺-Kanals könnte der Grund sein, dass die Abnahme der Ribbons bzw. Postsynapsen mit einem Trauma von 100 dB SPL schon gesättigt war und ein höheres Trauma von 106 dB SPL den Schaden in der KO-Gruppe nicht erhöht hat. Eine Ausnahme davon bildete das 106 dB SPL-Trauma im basalen Bereich, das die Anzahl der Ribbons hochsignifikant und tendenziell die Anzahl der Postsynapsen bei den Slack^{-/-}-Mäusen gegenüber dem WT reduzierte. Die mittels Immunfluoreszenz bestimmte Reduktion der Anzahl von Ribbons oder Postsynapsen sollte als Konsequenz später einsetzende und abgeflachte Wachstumsfunktionen der Amplituden der ABR-Welle I nach sich ziehen. Wenn zum Beispiel die Typ Ic -SGN-Fasern, deren Aktivität erst bei lauten Schallpegeln einsetzt, reduziert wären (Furman et al., 2013), wäre das im Bereich des besten Hörens bei niedrigen Schallpegeln nicht relevant, da diese vor allem durch Typ Ia -SGN-Fasern bestimmt werden. Derzeit ist es nicht möglich, die an den IHZ der Slack^{-/-}-Mäuse fehlenden Fasern einer oder mehreren SGN-Subtyp-Gruppe zuzuordnen. Dazu sind deren Beiträge zu veränderten Wachstumsfunktionen oder Latenzen zu gering. Funktionelle Beweise sind sehr schwierig zu erfassen, da neben vielen Einflussfaktoren, die einen Phänotyp verzerren können, auch kompensatorische Mechanismen entwickelt sein können (Möhrle et al., 2016).

Histologisch wurden in dieser Arbeit detailliert die Synapsen der IHZ von etwa 90 Tage alten Mäusen vier Wochen nach einem milden und moderaten Trauma beschrieben und mit Tieren ohne Trauma verglichen. Es gibt noch interessante Fragestellungen zu beantworten, die die natürliche Entwicklung ohne Trauma, aber auch die Situation direkt nach Trauma erfassen sollten. Hier wäre ein Reporter-Mausmodell, das eine intrinsische Fluorophor-Expression für einzelne Subtypen der SGN besitzt, gepaart mit einem Liganden-aktivierbaren Cre-LoxP-System für *kcnt1*, wünschenswert. In diesem Modell könnte man die Synapsen einzelner SGN-Typ I -Subklassen in verschiedenen Altersstufen der Slack^{-/-}-Maus untersuchen. Laut der *open source* Datenbank *gEar* (Orvis et al., 2021), einem Onlineportal, das verschiedene Publikationen und Genexpressionsdaten in der Cochlea bereitstellt, ist die Expression von *kcnt1* um P1 bei Mäusen am höchsten. Mit einer solchen Reporter-Maus hätte man eine ideale Grundlage für histologische Untersuchungen am Tag des Schalltraumas bzw. danach und könnte Synapsen-Schäden direkt einzelnen Subtypen der SGN zuordnen.

4.5.2 Warum haben Slack^{-/-}-Mäuse nach einem 106 dB SPL Trauma bessere HS als WT-Mäuse?

Bei der Slack^{-/-}-Versuchsgruppe des 106 dB SPL-Traumas lagen die HS an Tag 28 bei einigen Frequenzen (8 - 22,6 kHz) unter denen der Slack^{+/+}-Wildtypen (Abb. 41), obwohl für den mittel- bis hochfrequenten Bereich der größere Schaden erwartet wurde. Da der Schaden an Tag 0 bei dieser Kohorte höher war, lag es vermutlich nicht an einer mangelnden Empfindlichkeit der Slack^{-/-}-Mäuse gegenüber dem Trauma, sondern vermutlich an einer besseren Regeneration durch das Fehlen des Proteins Slack.

Einige Studien haben herausgefunden, dass Hoch- oder Herunterregulation von gewissen Genen nach einem Schalltrauma einen Einfluss auf die Regeneration von Schäden nach einem Schalltrauma haben.

Auch regulatorische Anpassungen nach Schalltrauma konnten auf cochleärer Ebene beschrieben werden. Neben Reduktionen von Taubheits-assoziierten Genen in fast allen Zelltypen wurden in der Region der lateralen Wand vor allem K⁺-Transporter herunterreguliert. Interessanterweise waren in den SGN die Typ Ia-Fasern von den drastischsten Expressionsänderungen betroffen. Hier waren vor allem Anti-Apoptose-Gene und Gene der Stressantwort einer Zelle massiv hochreguliert (Milon et al., 2021). Naheliegender ist es insofern, dass dieser Typ Fasern eine hohe Spontanaktivität besitzt, die HS definiert und daher ständig aktiv ist. Dieser Fasertyp scheint am robustesten gegenüber Schäden zu sein bzw. eine große Erholungs- bzw. Reparaturmaschinerie zu besitzen, da die Hörschwellen weitgehend regenerieren. SGN Typ Ia sind für das rudimentäre Hören auch die vermeintlich wichtigsten Neuronen, weswegen eine Kaskade zur Erhaltung dieser in Stresssituationen auch sinnvoll erscheint. Mehrere Publikationen an Meerschweinchen und Mäusen weisen darauf hin, dass vor allem die Typ Ic SGN-Fasern nach einem Schallschaden reduziert sind (Furman et al., 2013; L. D. Liberman et al., 2015). Allerdings ist es nach neuen Erkenntnissen nicht so, dass sich die Typ Ic-Fasern der CBA/CAJ-Maus vulnerabler gegenüber einem Schalltrauma als die Typ Ia/b-Fasern verhalten (Suthakar & Liberman, 2021).

Ein bekannter protektiver Effekt auf akustischen Stress liegt in dem Signalweg des Östrogen Rezeptor-β (ESR2), bei dem fertile weibliche Mäuse einen Vorteil gegenüber ihren männlichen Wurfgeschwistern hatten (Milon et al., 2018; Rouse et al., 2020; Shuster et al., 2021). Die schützende Wirkung scheint besonders bei den Typ Ic-Fasern zu greifen und ist damit für das Verständnis der cochleären Synaptopathie sehr interessant, allerdings in dieser Studie zu vernachlässigen, da es sich um ein ausgewogenes Verhältnis von weiblichen zu männlichen Tieren in den Gruppen der vertäubten Tiere handelt.

4.6 Regenerationsfähigkeit von Ribbon-Synapsen

Beim Meerschweinchen ist eine Regeneration der synaptischen Verbindung zwischen auditorischen Nervenfasern und IZH möglich (Shi et al., 2013, 2016). Bei CBA/CaJ-Mäusen gibt es keine Regeneration der Ribbons (M. C. Liberman, 2017), während bei C57Bl/6J-Mäusen Ribbon-Synapsen im mittleren bis hohen Frequenzbereich nach dem o.g. 100 dB SPL-Trauma innerhalb von 14 Tagen teilweise regenerieren können (Kim et al., 2019). Während bei Meerschweinchen die synaptischen Reparaturmechanismen innerhalb der ersten Tage nach Trauma zu einer Besserung des Hörvermögens der Tiere beitragen und zu einer Reposition der Synapsen an den IZH führen (Hickman et al., 2020), ist dies bei Mäusen wenig untersucht (Chen et al., 2019). Bei C57Bl/6J-Mäusen fand man kürzlich, dass einen Tag nach einem sehr milden Schalltrauma (93 dB SPL, 2 h, 8-16 kHz) viele Ribbons verloren gingen, aber nach 14 Tagen wieder vollständig regeneriert waren. Diese Reparaturprozesse sind abhängig von lokalen Makrophagen und Fractalkin-Signaling (Manickam et al., 2023), der Trauma-Stärke und auch der Spezies bzw. Mauslinie. Mit dem Beobachtungszeitpunkt von 4 Wochen nach Trauma in dieser Arbeit ist die Ribbonanzahl daher als ein Maß für die Bilanz von unzerstörten und regenerierten Ribbons anzusehen. Verschiedene Mauslinien bergen offenbar ein verschiedenes Potential für die Regeneration von Ribbons, was zur unterschiedlichen Empfindlichkeit von Mauslinien gegenüber Schalltrauma beiträgt (Boussaty et al., 2020; Lavinsky et al., 2015, 2021). Dazu wären histologische Untersuchungen kurz nach Schalltrauma hilfreich. Reparaturmechanismen der neuronalen Strukturen nach einem Schalltrauma sind ebenfalls durch endogene Prozesse von Autophagie (Guo et al., 2021) und einer erhöhten Immunantwort (Manickam et al., 2023) erstmals untersucht. Auch viral induzierter Wachstumsfaktor NT3 (Hashimoto et al., 2019) mindert den neuronalen Schaden an SGN – diese Methoden sind jedoch noch in der experimentellen Phase.

4.7 Vulnerabilität des peripheren auditorischen Systems hängt vom genetischen Hintergrund der Mauslinie ab

Beim Vergleich zweier Mauslinien in dieser Studie, C57/Bl6 und FVB/N, zeigte sich in der gemittelten Klick- BR-Welle ein beeindruckender Unterschied bei den Amplituden, vor allem aber den Latenzen (vgl. Abb. 54). Es ist schon länger bekannt, dass unterschiedliche Mauslinien unterschiedliche Hörleistungen bzw. -defizite aufweisen (Zheng et al., 1999). Verfeinerte Studien untersuchten die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Inzuchtlinien wie C57BL/6 oder BALB/c, die mit progressivem altersbedingtem Hörverlust assoziiert sind, mit sekundären Veränderungen in der Biochemie des Hirns und Verhaltensstörungen im Tag-Nacht-Rhythmus. Diese können die Empfindlichkeit für Schallstress beeinflussen (Turner et al., 2005). Thematisch

enger an der Fragestellung nach einem Mauslinien-abhängigen Unterschied bezüglich Synaptopathie war die Untersuchung einer Forschergruppe, die die Corti-Organen von CBA/CaJ, C57BL/6 und FVB/NJ –Mäusen hinsichtlich der Größe von Prä- und Postsynapse analysiert haben (Reijntjes et al., 2020). Sie fanden zwischen den Mauslinien Unterschiede in den synaptischen Kenngrößen, was einen Einfluss auf die Empfänglichkeit für Erregungstoxizität der Postsynapsen haben könnte. IHZ von CBA/CaJ-Mäusen zeigten dabei kleinere Postsynapsen als IHZ von C57BL/6- und FVB/NJ-Mäusen, die vergleichbar groß waren.

Aktuelle Studien haben die Untersuchungen dahingehend erweitert, dass sie nicht mehr nur HS, sondern die Amplituden der Welle I vor und nach einem zweistündigen Schalltrauma von 108 dB SPL von 69 Mauslinien verglichen (Lavinsky et al., 2021b). Sie fanden heraus, dass sich die Linien in eher schadensempfindliche, wie etwa FVB/N-Mäuse, und in eher schadensresistente Linien, wie die C3H-Linie, unterscheiden lassen. C57BlKS/J, die genetisch am engsten mit den C57Bl6/N-Mäusen dieser Studie verwandte Linie, wurde den resistenteren Linien zugeordnet.

4.8 Übertragbarkeit auf den Menschen

Zuletzt stellt sich die Frage, ob das auditorische System der Maus ein geeignetes Forschungsmodell für humane biomedizinische Fragestellungen und Pathologien ist.

Der *hidden hearing loss* wurde in an mit einem TTS-Trauma behandelten CBA/CaJ-Mäusen identifiziert und definiert (Kujawa & Liberman, 2009). Es wurde oben bereits festgestellt, dass sich einzelne Mauslinien diesbezüglich unterscheiden. Trotzdem wird die cochleäre Synaptopathie durch eine temporäre Hörschwellenverschiebung mit entsprechender Regeneration definiert, bei der die Haarzellen selbst intakt bleiben, aber ein Teil der funktionellen Synapsen verloren geht, woraus eine Amplitudenreduktion der ABR-Wellen I im Frequenzbereich oberhalb des Trauma-Frequenzbandes zurückbleibt (Hickox et al., 2017). Subtyp-spezifische Eigenschaften der SGN wurden an unterschiedlichen Spezies untersucht und bestätigt, wie z.B. Katze, Chinchilla, Meerschweinchen, Ratte, Rennmaus (Bourien et al., 2014; Furman et al., 2013; M. C. Liberman, 1982; Relkin & Doucet, 1991). Um sich mit einem Modellorganismus dem Menschen zu nähern, wurden akustische Studien an Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) durchgeführt (Joris et al., 2011), und schließlich an der Fragestellung der cochleären Synaptopathie gearbeitet (Valero et al., 2017). Es wurden ähnliche Konsequenzen eines akustischen Traumas beobachtet wie zuvor bei den Nagetieren. Jedoch waren höhere Schalldruckpegel notwendig, um eine vergleichbare PTS zu erzeugen. Die Tiere wurden unter eine 1 - 1.5% Isofluran-Narkose gesetzt und für 4 Stunden Schallpegeln zwischen 108 dB SPL bis 146 dB SPL ausgesetzt. Das Frequenzband der Exposition lag bei 50 Hz zentriert bei 2 kHz.

Die durch Lärmbelastung ausgelöste cochleäre Synaptopathie würde sich beim Menschen v.a. durch ein vermindertes Sprachverständnis im Störgeräuschhintergrund (Cocktail-Party-Effekt) äußern, einem Phänomen, das auch im Altersprozess regelmäßig auftritt (Kujawa & Liberman, 2015). Allerdings sind Studien am Menschen schwer durchzuführen und sehr langwierig. Es werden hierzu longitudinale nichtinvasive Hörmessdaten verwendet und mit *post mortem* histologischen Analysen an Felsenbeinen kombiniert. Zu Lebzeiten werden Daten zu Lärmbelastung, Lebensweise und Komorbiditäten der prospektiven Cochlea-Spender erhoben. Menschen-basierte Analysen vermissen durch die limitierten Probandenzahlen und Schwierigkeiten bei Längsschnittstudien und Alterseffekt-Studien der langlebigen „Versuchsobjekte“ oft eine gewisse statistische Effektstärke (Le et al., 2017). In jüngster Zeit wurde intensiv versucht, ausschließlich aus nichtinvasiven funktionellen Hörmess-Daten Hinweise für oder gegen das Vorliegen von cochleärer Synaptopathie beim Menschen zu gewinnen. Diese Bemühungen werden durch verschiedene Aspekte erschwert: Audiologisch kann man beim Menschen keine Signale auf f-ABR-Stimulation hin verwenden. Basierend auf Daten aus der Klick-ABR und sog. *envelope following response*-Daten lieferten sowohl Hinweise für als auch gegen die Existenz von cochleärer Synaptopathie beim Menschen (Bharadwaj et al., 2019; Bramhall et al., 2019; Verhulst & Shera, 2015). Das Thema wird kontrovers diskutiert und ist Gegenstand intensiver Forschung.

Allein der Fakt, dass es aufgrund der außerordentlich hohen Prävalenz von NIHL und Altersschwerhörigkeit einen sehr großen Bedarf zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und möglichen Angriffspunkte von Therapeutika gibt, rechtfertigt das weitere Erforschen humaner Hörverluste mit Hilfe von Mausmodellen, selbst wenn in einem weiteren Schritt eine Anpassung von Erkenntnissen von Mäusen auf den Menschen erfolgen muss (Early et al., 2022).

Literaturverzeichnis

1. Anderson, J. M., & Itallie, C. M. V. (2009). Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2), a002584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>
2. Anthony, A., Ackerman, E., & Lloyd, J. A. (1959). Noise Stress in Laboratory Rodents. I. Behavioral and Endocrine Response of Mice, Rats, and Guinea Pigs. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 31(11), 1430–1437. <https://doi.org/10.1121/1.1907645>
3. Aoki, K., Kosakai, K., & Yoshino, M. (2008). Monoaminergic modulation of the Na⁺-activated K⁺ channel in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket (*Gryllus bimaculatus*) brain. *Journal of Neurophysiology*, 100(3), 1211–1222. <https://doi.org/10.1152/jn.90459.2008>
4. Audition and Somatosensation | Anatomy and Physiology I. (o. J.). Abgerufen 27. April 2020, von <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap1/chapter/audition-and-somatosensation/>
5. Banan, M. (2020). Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 308, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.11.010>
6. Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V.-R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronen-gold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddaert, N., Casanova, J.-L., Des-guerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L. K., Colleaux, L., & Nabbout, R. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature Genetics*, 44(11), 1255–1259. <https://doi.org/10.1038/ng.2441>
7. Bausch, A. E., Dieter, R., Nann, Y., Hausmann, M., Meyerdierks, N., Kaczmarek, L. K., Ruth, P., & Lu-kowski, R. (2015). The sodium-activated potassium channel Slack is required for optimal cognitive flexibility in mice. *Learning & Memory*, 22(7), 323–335. <https://doi.org/10.1101/lm.037820.114>
8. Beggs, M. R., Young, K., Pan, W., O'Neill, D. D., Saurette, M., Plain, A., Rievaj, J., Doschak, M. R., Cordat, E., Dimke, H., & Alexander, R. T. (2021). Claudin-2 and claudin-12 form independent, complementary pores required to maintain calcium homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(48), e2111247118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111247118>
9. Ben-Yosef, T., Belyantseva, I. A., Saunders, T. L., Hughes, E. D., Kawamoto, K., Van Itallie, C. M., Beyer, L. A., Halsey, K., Gardner, D. J., Wilcox, E. R., Rasmussen, J., Anderson, J. M., Dolan, D. F., Forge, A., Raphael, Y., Camper, S. A., & Friedman, T. B. (2003). Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Human Molecular Genetics*, 12(16), 2049–2061. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg210>
10. Bharadwaj, H. M., Mai, A. R., Simpson, J. M., Choi, I., Heinz, M. G., & Shinn-Cunningham, B. G. (2019). Non-Invasive Assays of Cochlear Synaptopathy –

- Candidates and Considerations. *Neuroscience*, 407, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.031>
11. Bhattacharjee, A., & Kaczmarek, L. K. (2005). For K⁺ channels, Na⁺ is the new Ca²⁺. *Trends in Neurosciences*, 28(8), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.06.003>
 12. Bhattacharjee, A., Gan, L., & Kaczmarek, L. K. (2002). Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 454(3), 241–254. <https://doi.org/10.1002/cne.10439>
 13. Bhattacharjee, A., von Hehn, C. A. A., Mei, X., & Kaczmarek, L. K. (2005). Localization of the Na⁺-activated K⁺ channel Slick in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 484(1), 80–92. <https://doi.org/10.1002/cne.20462>
 14. Bonardi, C. M., Heyne, H. O., Fiannacca, M., Fitzgerald, M. P., Gardella, E., Gunning, B., Olofsson, K., Lesca, G., Verbeek, N., Stamberger, H., Striano, P., Zara, F., Mancardi, M. M., Nava, C., Syrbe, S., Buono, S., Baulac, S., Coppola, A., Weckhuysen, S., ... Rubboli, G. (2021). KCNT1-related epilepsies and epileptic encephalopathies: Phenotypic and mutational spectrum. *Brain: A Journal of Neurology*, 144(12), 3635–3650. <https://doi.org/10.1093/brain/awab219>
 15. Borg, E., Nilsson, R., & Engström, B. (1983). Effect of the acoustic reflex on inner ear damage induced by industrial noise. *Acta Oto-Laryngologica*, 96(5–6), 361–369. <https://doi.org/10.3109/00016488309132721>
 16. Boshier, S. K. (1979). The nature of the negative endocochlear potentials produced by anoxia and eth-acrynic acid in the rat and guinea-pig. *The Journal of Physiology*, 293, 329–345. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012892>
 17. Bourien, J., Tang, Y., Batrel, C., Huet, A., Lenoir, M., Ladrech, S., Desmadryl, G., Nouvian, R., Puel, J.-L., & Wang, J. (2014). Contribution of auditory nerve fibers to compound action potential of the auditory nerve. *Journal of Neurophysiology*, 112(5), 1025–1039. <https://doi.org/10.1152/jn.00738.2013>
 18. Boussaty, E. C., Gillard, D., Lavinsky, J., Salehi, P., Wang, J., Mendonça, A., Allayee, H., Manor, U., & Friedman, R. A. (2020). The Genetics of Variation of the Wave 1 Amplitude of the Mouse Auditory Brainstem Response. *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 21(4), 323–336. <https://doi.org/10.1007/s10162-020-00762-3>
 19. Bramhall, N., Beach, E. F., Epp, B., Le Prell, C. G., Lopez-Poveda, E. A., Plack, C. J., Schaette, R., Verhulst, S., & Canlon, B. (2019). The search for noise-induced cochlear synaptopathy in humans: Mission impossible? *Hearing Research*, 377, 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.02.016>
 20. Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V.-R., Spilianakis, C. G., Flavell, R. A., Von Hehn, C. A. A., Bhattacharjee, A., & Kaczmarek, L. K. (2008). Amino-terminal isoforms of the Slack K⁺ channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation. *The Journal of Physiology*, 586(21), 5161–5179. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160861>
 21. Castro Dias, M., Coisne, C., Baden, P., Enzmann, G., Garrett, L., Becker, L., Hölter, S. M., Aguilar-Pimentel, A., Adler, T., Busch, D. H., Spielmann, N., Moreth, K., Hans, W., Amarie, O., Graw, J., Rozman, J., Radc, I., Neff, F., Calzada-Wack, J., ...

- German Mouse Clinic Consortium. (2019). Claudin-12 is not required for blood–brain barrier tight junction function. *Fluids and Barriers of the CNS*, 16(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0150-9>
22. Chen, H., Shi, L., Liu, L., Yin, S., Aiken, S., & Wang, J. (2019). Noise-induced Cochlear Synaptopathy and Signal Processing Disorders. *Neuroscience*, 407, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.09.026>
 23. Coate, T. M., & Kelley, M. W. (2013). Making connections in the inner ear: Recent insights into the development of spiral ganglion neurons and their connectivity with sensory hair cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(5), 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.04.003>
 24. Deichelbohrer, M., Wu, M.-F., Seitz, B., Hüttenberger, D., Laschke, M. W., Foth, H.-J., Wonnemann, B., Wagenpfeil, S., Meier, C., Bischoff, M., & Tschernig, T. (2017). Bacterial keratitis: Photodynamic inactivation reduced experimental inflammation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), 4509–4514. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5109>
 25. Early, S., Du, E., Boussaty, E., & Friedman, R. (2022). Genetics of noise-induced hearing loss in the mouse model. *Hearing Research*, 108505. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2022.108505>
 26. Eckrich, S., Hecker, D., Sorg, K., Blum, K., Fischer, K., Münkner, S., Wenzel, G., Schick, B., & Engel, J. (2019). Cochlea-Specific Deletion of Cav1.3 Calcium Channels Arrests Inner Hair Cell Differentiation and Unravels Pitfalls of Conditional Mouse Models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00225>
 27. Egan, T. M., Dagan, D., Kupper, J., & Levitan, I. B. (1992). Na(+)-activated K+ channels are widely distributed in rat CNS and in *Xenopus* oocytes. *Brain Research*, 584(1–2), 319–321. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90913-t](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90913-t)
 28. Ehinger, R., Kuret, A., Matt, L., Frank, N., Wild, K., Kabagema-Bilan, C., Bischof, H., Malli, R., Ruth, P., Bausch, A. E., & Lukowski, R. (2021). Slack K+ channels attenuate NMDA-induced excitotoxic brain damage and neuronal cell death. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(5), e21568. <https://doi.org/10.1096/fj.202002308RR>
 29. Engel, J., Braig, C., Rüttiger, L., Kuhn, S., Zimmermann, U., Blin, N., Sausbier, M., Kalbacher, H., Münkner, S., Rohbock, K., Ruth, P., Winter, H., & Knipper, M. (2006). Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea. *Neuroscience*, 143(3), 837–849. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.060>
 30. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2022), Abgerufen 23. November 2022, von www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/fentanyl_de#publications
 31. Eybalin, M. (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiological Reviews*, 73(2), 309–373. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.2.309>
 32. Fell, B., Eckrich, S., Blum, K., Eckrich, T., Hecker, D., Obermair, G. J., Münkner, S., Flockerzi, V., Schick, B., & Engel, J. (2016). A2δ Controls the Function and Trans-Synaptic Coupling of Cav1.3 Channels in Mouse Inner Hair Cells and Is Essential

- for Normal Hearing. *Journal of Neuroscience*, 36(43), 11024–11036. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3468-14.2016>
33. Fernandez, K. A., Guo, D., Micucci, S., De Gruttola, V., Liberman, M. C., & Kujawa, S. G. (2020). Noise-induced Cochlear Synaptopathy with and Without Sensory Cell Loss. *Neuroscience*, 427, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.11.051>
 34. Fettiplace, R. (2017). Hair cell transduction, tuning and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Comprehensive Physiology*, 7(4), 1197–1227. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>
 35. Frye, M. D., Ryan, A. F., & Kurabi, A. (2019). Inflammation associated with noise-induced hearing loss. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 146(5), 4020–4032. <https://doi.org/10.1121/1.5132545>
 36. Fuchs, P. A., Glowatzki, E., & Moser, T. (2003). The afferent synapse of cochlear hair cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), 452–458. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00098-9](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00098-9)
 37. Furman, A. C., Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2013). Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *Journal of Neurophysiology*, 110(3), 577–586. <https://doi.org/10.1152/jn.00164.2013>
 38. Gao, S., Wu, Y., Lü, C., Guo, Z., Li, C., & Ding, J. (2008). Slack and Slick KNa channels are required for the depolarizing afterpotential of acutely isolated, medium diameter rat dorsal root ganglion neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(8), 899–905. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00842.x>
 39. Gehörlosigkeit—FAQ - DGB e.V. (o. J.). Abgerufen 12. April 2022, von <https://www.gehoerlosen-bund.de/faq/geh%C3%B6rlosigkeit>
 40. Geisler, C. D. (1998). *From Sound to Synapse: Physiology of the Mammalian Ear*. Oxford University Press.
 41. Gourévitch, B., Edeline, J.-M., Occelli, F., & Eggermont, J. J. (2014). Is the din really harmless? Long-term effects of non-traumatic noise on the adult auditory system. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 483.
 42. Greene, S. A. (1999). Pros and cons of using α -2 agonists in small animal anesthesia practice. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 14(1), 10–14. [https://doi.org/10.1016/S1096-2867\(99\)80022-X](https://doi.org/10.1016/S1096-2867(99)80022-X)
 43. Guinan, J. J. J. (2006). Olivocochlear Efferents: Anatomy, Physiology, Function, and the Measurement of Efferent Effects in Humans. *Ear and Hearing*, 27(6), 589. <https://doi.org/10.1097/01.aud.0000240507.83072.e7>
 44. Guinan, J. J. J. (2010). Cochlear efferent innervation and function. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 18(5), 447–453. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32833e05d6>
 45. Guinan, J. J. (2018). Olivocochlear efferents: Their action, effects, measurement and uses, and the impact of the new conception of cochlear mechanical responses. *Hearing Research*, 362, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.12.012>
 46. Guo, L., Cao, W., Niu, Y., He, S., Chai, R., & Yang, J. (2021). Autophagy Regulates the Survival of Hair Cells and Spiral Ganglion Neurons in Cases of Noise, Ototoxic

- Drug, and Age-Induced Sensori-neural Hearing Loss. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 760422. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.760422>
47. Hashimoto, K., Hickman, T. T., Suzuki, J., Ji, L., Kohrman, D. C., Corfas, G., & Liberman, M. C. (2019). Protection from noise-induced cochlear synaptopathy by virally mediated overexpression of NT3. *Scientific Reports*, 9(1), 15362. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51724-6>
 48. Hecker, D. J., Lohscheller, J., Bader, C.-A., Delb, W., Schick, B., & Dlugaiczyk, J. (2011). A new method to analyze distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) in the high-frequency range up to 18 kHz using windowed periodograms. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 58(8). <https://doi.org/10.1109/TBME.2011.2157154>
 49. Heil, P., & Peterson, A. J. (2015). Basic response properties of auditory nerve fibers: A review. *Cell and Tissue Research*, 361(1), 129–158. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2177-9>
 50. Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamic–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>
 51. Heron, S. E., Smith, K. R., Bahlo, M., Nobili, L., Kahana, E., Licchetta, L., Oliver, K. L., Mazarib, A., Afawi, Z., Korczyn, A., Plazzi, G., Petrou, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E., & Dibbens, L. M. (2012). Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe auto-somal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics*, 44(11), 1188–1190. <https://doi.org/10.1038/ng.2440>
 52. Hickman, T. T., Hashimoto, K., Liberman, L. D., & Liberman, M. C. (2020). Synaptic migration and reorganization after noise exposure suggests regeneration in a mature mammalian cochlea. *Scientific Reports*, 10(1), 19945. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76553-w>
 53. Hickox, A. E., Larsen, E., Heinz, M. G., Shinobu, L., & Whitton, J. P. (2017). Translational issues in cochlear synaptopathy. *Hearing research*, 349, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.12.010>
 54. Hill, K., Yuan, H., Wang, X., & Sha, S.-H. (2016). Noise-Induced Loss of Hair Cells and Cochlear Synaptopathy Are Mediated by the Activation of AMPK. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7497–7510. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0782-16.2016>
 55. Hille, B. (1986). Ionic channels: Molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lectures*, 82, 47–69.
 56. Hirose, K., Discolo, C. M., Keasler, J. R., & Ransohoff, R. (2005). Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *Journal of Comparative Neurology*, 489(2), 180–194. <https://doi.org/10.1002/cne.20619>
 57. Huppelsberg, J., & Walter, K. (2013). *Kurzlehrbuch Physiologie*. Georg Thieme Verlag.
 58. Iasevoli, F., Tomasetti, C., Buonaguro, E., & de Bartolomeis, A. (2014). The Glutamatergic Aspects of Schizophrenia Molecular Pathophysiology: Role of the

- Postsynaptic Density, and Implications for Treatment. *Current Neuropharmacology*, 12(3), 219–238. <https://doi.org/10.2174/1570159X12666140324183406>
59. Jeng, J.-Y., Carlton, A. J., Johnson, S. L., Brown, S. D. M., Holley, M. C., Bowl, M. R., & Marcot-ti, W. (2021). Biophysical and morphological changes in inner hair cells and their efferent innervation in the ageing mouse cochlea. *The Journal of Physiology*, 599(1), 269–287. <https://doi.org/10.1113/JP280256>
 60. Jensen, K., Hahn, N. E., Palme, R., Saxton, K., & Francis, D. D. (2010). Vacuum-Cleaner Noise and Acute Stress Responses in Female C57BL/6 Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 49(3), 300–306.
 61. Joachimsthaler, B., Uhlmann, M., Miller, F., Ehret, G., & Kurt, S. (2014). Quantitative analysis of neuronal response properties in primary and higher-order auditory cortical fields of awake house mice (*Mus musculus*). *The European Journal of Neuroscience*, 39(6), 904–918. <https://doi.org/10.1111/ejn.12478>
 62. Jongkamonwiwat, N., Ramirez, M. A., Edassery, S., Wong, A. C. Y., Yu, J., Abbott, T., Pak, K., Ryan, A. F., & Savas, J. N. (2020). Noise Exposures Causing Hearing Loss Generate Proteotoxic Stress and Activate the Proteostasis Network. *Cell Reports*, 33(8), 108431. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108431>
 63. Joris, P. X., Bergevin, C., Kalluri, R., Mc Laughlin, M., Michelet, P., van der Heijden, M., & Shera, C. A. (2011). Frequency selectivity in Old-World monkeys corroborates sharp cochlear tuning in hu-mans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), 17516–17520. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105867108>
 64. Kaczmarek, L. K. (2013). Slack, Slick, and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN Neuroscience*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/354262>
 65. Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H., & Irisawa, H. (1984). Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature*, 309(5966), 354–356. <https://doi.org/10.1038/309354a0>
 66. Kane, K. L., Longo-Guess, C. M., Gagnon, L. H., Ding, D., Salvi, R. J., & Johnson, K. R. (2012). Genetic background effects on age-related hearing loss associated with *Cdh23* variants in mice. *Hearing Research*, 283(1–2), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.11.007>
 67. Kemp, D. T. (2002). Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *British Medical Bulletin*, 63, 223–241. <https://doi.org/10.1093/bmb/63.1.223>
 68. Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E. D., & Moser, T. (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature*, 434(7035), 889–894. <https://doi.org/10.1038/nature03418>
 69. Kim, K. X., Payne, S., Yang-Hood, A., Li, S.-Z., Davis, B., Carlquist, J., V-Ghaffari, B., Gantz, J. A., Kal-logjeri, D., Fitzpatrick, J. A. J., Ohlemiller, K. K., Hirose, K., & Rutherford, M. A. (2019). Vesicular Glutamatergic Transmission in Noise-Induced Loss and Repair of Cochlear Ribbon Synapses. *Journal of Neuroscience*, 39(23), 4434–4447. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2228-18.2019>
 70. Kommareddi, P., Nair, T., Kakaraparthi, B. N., Galano, M. M., Miller, D., Laczkovich, I., Thomas, T., Lu, L., Rule, K., Kabara, L., Kanicki, A., Hughes, E. D., Jones, J. M., Hoenerhoff, M., Fisher, S. G., Alt-schuler, R. A., Dolan, D., Kohrman, D. C., Saunders, T. L., & Carey, T. E. (2015). Hair Cell Loss, Spiral Ganglion Degeneration,

- and Progressive Sensorineural Hearing Loss in Mice with Target-ed Deletion of Slc44a2/Ctl2. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 16(6), 695–712. <https://doi.org/10.1007/s10162-015-0547-3>
71. Kudo, T., Wangemann, P., & Marcus, D. C. (2018). Claudin expression during early postnatal develop-ment of the murine cochlea. *BMC Physiology*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12899-018-0035-1>
 72. Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2009). Adding insult to injury: Cochlear nerve degeneration after „temporary“ noise-induced hearing loss. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(45), 14077–14085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009>
 73. Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2015). Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hearing Research*, 330(Pt B), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.02.009>
 74. Kurt, S., Groszer, M., Fisher, S. E., & Ehret, G. (2009). Modified sound-evoked brainstem poten-tials in Foxp2 mutant mice. *Brain Research*, 1289, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.092>
 75. Lang, I., Jung, M., Niemeyer, B. A., Ruth, P., & Engel, J. (2019). Expression of the LRRc52 γ subunit (γ 2) may provide Ca²⁺-independent activation of BK currents in mouse inner hair cells. *FASEB Jour-nal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(11), 11721–11734. <https://doi.org/10.1096/fj.201900701RR>
 76. Larre, I., Ponce, A., Franco, M., & Cerejido, M. (2014). The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.010>
 77. Lavinsky, J., Crow, A. L., Pan, C., Wang, J., Aaron, K. A., Ho, M. K., Li, Q., Salehide, P., Myint, A., Monges-Hernandez, M., Eskin, E., Allayee, H., Lusic, A. J., & Friedman, R. A. (2015). Genome-wide association study identifies nox3 as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005094. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005094>
 78. Lavinsky, J., Mendonça, A., Bressan, M., da Silva, V. A. R., Kasperbauer, G., Wang, J., Salehi, P., Bous-saty, E. C., & Friedman, R. A. (2021). Large-scale phenotyping of ABR P1-N1 amplitudes before and after exposure to noise in 69 strains of mice. *Mammalian Genome*, 32(6), 427–434. <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09913-0>
 79. Le, T. N., Straatman, L. V., Lea, J., & Westerberg, B. (2017). Current insights in noise-induced hearing loss: A literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and man-agement options. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 46, 41. <https://doi.org/10.1186/s40463-017-0219-x>
 80. Lee, J. H., Kang, M., Park, S., Perez-Flores, M. C., Zhang, X.-D., Wang, W., Gratton, M. A., Chiamvimonvat, N., & Yamoah, E. N. (2019). The local translation of KNa in dendritic projections of auditory neurons and the roles of KNa in the transition from hidden to overt hearing loss. *Aging*, 11(23), 11541–11564. <https://doi.org/10.18632/aging.102553>

81. Leenaars, C. H. C., van der Mierden, S., Durst, M., Goerlich-Jansson, V. C., Ripoli, F. L., Keubler, L. M., Talbot, S. R., Boyle, E., Habedank, A., Jirkof, P., Lewejohann, L., Gass, P., Tolba, R., & Bleich, A. (2020). Measurement of corticosterone in mice: A protocol for a mapping review. *Laboratory Animals*, 54(1), 26–32. <https://doi.org/10.1177/0023677219868499>
82. Liberman, L. D., Suzuki, J., & Liberman, M. C. (2015). Dynamics of cochlear synaptopathy after acoustic overexposure. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 16(2), 205–219. <https://doi.org/10.1007/s10162-015-0510-3>
83. Liberman, L. D., Wang, H., & Liberman, M. C. (2011). Opposing gradients of ribbon size and AMPA re-ceptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(3), 801–808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-10.2011>
84. Liberman, M. C. (1982). Single-Neuron Labeling in the Cat Auditory Nerve. *Science*, 216(4551), 1239–1241. <https://doi.org/10.1126/science.7079757>
85. Liberman, M. C. (2017). Noise-induced and age-related hearing loss: New perspectives and potential therapies. *F1000Research*, 6, 927. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11310.1>
86. Liberman, M. C., & Beil, D. G. (1979). Hair Cell Condition and Auditory Nerve Response in Normal and Noise-Damaged Cochleas. *Acta Oto-Laryngologica*, 88(1–6), 161–176. <https://doi.org/10.3109/00016487909137156>
87. Liberman, M. C., & Kiang, N. Y. (1978). Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Oto-Laryngologica. Supplementum*, 358, 1–63.
88. Lingle, C. J., Martinez-Espinosa, P. L., Yang-Hood, A., Boero, L. E., Payne, S., Persic, D., V-Ghaffari, B., Xiao, M., Zhou, Y., Xia, X.-M., Pyott, S. J., & Rutherford, M. A. (2019). LRRC52 regulates BK channel function and localization in mouse cochlear inner hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(37), 18397–18403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907065116>
89. Liu, C., Glowatzki, E., & Fuchs, P. A. (2015). Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), 14723–14727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515228112>
90. Lu, R., Bausch, A. E., Kallenborn-Gerhardt, W., Stoetzer, C., Debruin, N., Ruth, P., Geisslinger, G., Leffler, A., Lukowski, R., & Schmidtke, A. (2015). Slack Channels Expressed in Sensory Neurons Control Neuropathic Pain in Mice. *Journal of Neuroscience*, 35(3), 1125–1135. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2423-14.2015>
91. Maison, S. F., Usubuchi, H., & Liberman, M. C. (2013). Efferent Feedback Minimizes Cochlear Neuropathy from Moderate Noise Exposure. *Journal of Neuroscience*, 33(13), 5542–5552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5027-12.2013>
92. Manickam, V., Gawande, D. Y., Stothert, A. R., Clayman, A. C., Batakina, L., Warchol, M. E., Ohlemiller, K. K., & Kaur, T. (2023). Macrophages Promote Repair of Inner Hair Cell Ribbon Synapses following Noise-Induced Cochlear Synaptopathy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for*

- Neuroscience, 43(12), 2075–2089. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1273-22.2023>
93. Marchetta, P., Eckert, P., Lukowski, R., Ruth, P., Singer, W., Rüttiger, L., & Knipper, M. (2022). Loss of central mineralocorticoid or glucocorticoid receptors impacts auditory nerve processing in the cochlea. *IScience*, 25(3), 103981. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103981>
 94. Martinez-Monedero, R., Liu, C., Weisz, C., Vyas, P., Fuchs, P. A., & Glowatzki, E. (2016). GluA2-Containing AMPA Receptors Distinguish Ribbon-Associated from Ribbonless Af-ferent Contacts on Rat Cochlear Hair Cells. *Eneuro*, 3(2), ENEURO.0078-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0078-16.2016>
 95. McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>
 96. Mehraei, G., Hickox, A. E., Bharadwaj, H. M., Goldberg, H., Verhulst, S., Liberman, M. C., & Shinn-Cunningham, B. G. (2016). Auditory Brainstem Response Latency in Noise as a Marker of Coch-lear Synaptopathy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neurosci-ence*, 36(13), 3755–3764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4460-15.2016>
 97. Metzger, D., & Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 470–476. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00012-9)
 98. Meyer, A. C., & Moser, T. (2010). Structure and function of cochlear afferent innervation. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 18(5), 441–446. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32833e0586>
 99. Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1(4), reviews0004.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-4-reviews0004>
 100. Milon, B., Mitra, S., Song, Y., Margulies, Z., Casserly, R., Drake, V., Mong, J. A., Depireux, D. A., & Hertzano, R. (2018). The impact of biological sex on the response to noise and otoprotective therapies against acoustic injury in mice. *Biology of Sex Differences*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0171-0>
 101. Milon, B., Shulman, E. D., So, K. S., Cederroth, C. R., Lipford, E. L., Sperber, M., Sellon, J. B., Sarlus, H., Pregernig, G., Shuster, B., Song, Y., Mitra, S., Orvis, J., Margulies, Z., Ogawa, Y., Shults, C., Depi-reux, D. A., Palermo, A. T., Canlon, B., ... Hertzano, R. (2021). A cell-type-specific atlas of the inner ear transcriptional response to acoustic trauma. *Cell Reports*, 36(13), 109758. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109758>
 102. Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., & Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters*, 585(4), 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.028>
 103. Möhrle, D., Ni, K., Varakina, K., Bing, D., Lee, S. C., Zimmermann, U., Knipper, M., & Rüttiger, L. (2016). Loss of auditory sensitivity from inner hair cell synaptopathy can be centrally compensated in the young but not old brain. *Neurobiology of Aging*, 44, 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.001>

104. Moser, T., & Starr, A. (2016). Auditory neuropathy—Neural and synaptic mechanisms. *Nature Reviews. Neurology*, 12(3), 135–149. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.10>
105. Moser, T., Brandt, A., & Lysakowski, A. (2006). Hair cell ribbon synapses. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 347–359. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0276-3>
106. Moser, T., Predoehl, F., & Starr, A. (2013). Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 34(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182814d4a>
107. Motov, S., Rockoff, B., Cohen, V., Pushkar, I., Likourezos, A., McKay, C., Soleyman-Zomalan, E., Homel, P., Terentiev, V., & Fromm, C. (2015). Intravenous Subdissociative-Dose Ketamine Versus Mor-phine for Analgesia in the Emergency Department: A Randomized Controlled Trial. *Annals of Emergency Medicine*, 66(3), 222-229.e1. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2015.03.004>
108. Müller, M., Hünerbein, K. von, Hoidis, S., & Smolders, J. W. T. (2005). A physiological place–frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hearing Research*, 202(1), 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.011>
109. Murillo-Cuesta, S., Camarero, G., González-Rodríguez, A., De La Rosa, L. R., Burks, D. J., Avendaño, C., Valverde, A. M., & Varela-Nieto, I. (2012). Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 18, 260–269. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00328>
110. Nunes, F. D., Lopez, L. N., Lin, H. W., Davies, C., Azevedo, R. B., Gow, A., & Kachar, B. (2006). Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 23), 4819–4827. <https://doi.org/10.1242/jcs.03233>
111. Ohn, T.-L., Rutherford, M. A., Jing, Z., Jung, S., Duque-Afonso, C. J., Hoch, G., Picher, M. M., Scharinger, A., Strenzke, N., & Moser, T. (2016). Hair cells use active zones with different voltage dependence of Ca²⁺ influx to decompose sounds into complementary neural codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(32), E4716–E4725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605737113>
112. Orvis, J., Gottfried, B., Kancherla, J., Adkins, R. S., Song, Y., Dror, A. A., Olley, D., Rose, K., Chrysostomou, E., Kelly, M. C., Milon, B., Matern, M. S., Azaiez, H., Herb, B., Colantuoni, C., Carter, R. L., Ament, S. A., Kelley, M. W., White, O., ... Hertzano, R. (2021). gEAR: Gene Expression Analysis Resource portal for community-driven, multi-omic data exploration. *Nature Methods*, 18(8), 843–844. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01200-9>
113. Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology*, 30(10), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>
114. Patuzzi, R. (2011). Ion flow in cochlear hair cells and the regulation of hearing sensitivity. *Hearing Research*, 280(1), 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.04.006>

115. Paulais, M., Lachheb, S., & Teulon, J. (2006). A Na⁺- and Cl⁻-activated K⁺ channel in the thick ascend-ing limb of mouse kidney. *The Journal of General Physiology*, 127(2), 205–215. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509360>
116. Perkins, R. E., & Morest, D. K. (1975). A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *The Journal of Comparative Neurology*, 163(2), 129–158. <https://doi.org/10.1002/cne.901630202>
117. Petitpré, C., Wu, H., Sharma, A., Tokarska, A., Fontanet, P., Wang, Y., Helmbacher, F., Yackle, K., Sil-berberg, G., Hadjab, S., & Lallemand, F. (2018). Neuronal heterogeneity and stereotyped con-nectivity in the auditory afferent system. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06033-3>
118. Pickles, J. O., & Corey, D. P. (1992). Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends in Neurosci-ences*, 15(7), 254–259. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90066-h](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90066-h)
119. Plain, A., Pan, W., O'Neill, D., Ure, M., Beggs, M. R., Farhan, M., Dimke, H., Cordat, E., & Alexander, R. T. (2020). Claudin-12 Knockout Mice Demonstrate Reduced Proximal Tubule Calcium Permea-bility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), E2074. <https://doi.org/10.3390/ijms21062074>
120. Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., & Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell*, 102(1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00013-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00013-1)
121. Puel, J.-L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Progress in Neurobiology*, 47(6), 449–476. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00028-3)
122. Raphael, Y. (2002). Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. *British Medical Bulletin*, 63(1), 25–38. <https://doi.org/10.1093/bmb/63.1.25>
123. Reijntjes, D. O. J., & Pyott, S. J. (2016). The afferent signaling complex: Regulation of type I spiral gan-glion neuron responses in the auditory periphery. *Hearing Research*, 336, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.03.011>
124. Reijntjes, D. O. J., Köppl, C., & Pyott, S. J. (2020). Volume gradients in inner hair cell-auditory nerve fiber pre- and postsynaptic proteins differ across mouse strains. *Hearing Research*, 390, 107933. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107933>
125. Reijntjes, D. O. J., Lee, J. H., Park, S., Schubert, N. M. A., Tuinen, M. van, Vijayakumar, S., Jones, T. A., Jones, S. M., Gratton, M. A., Xia, X.-M., Yamoah, E. N., & Pyott, S. J. (2019). Sodium-activated potassium channels shape peripheral auditory function and activity of the primary auditory neurons in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 2573. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39119-z>
126. Relkin, E. M., & Doucet, J. R. (1991). Recovery from prior stimulation. I: Relationship to spontaneous firing rates of primary auditory neurons. *Hearing Research*, 55(2), 215–222. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(91\)90106-J](https://doi.org/10.1016/0378-5955(91)90106-J)
127. Rouse, S. L., Matthews, I. R., Li, J., Sherr, E. H., & Chan, D. K. (2020). Integrated stress response inhibi-tion provides sex-dependent protection against noise-induced cochlear synaptopathy. *Scien-tific Reports*, 10(1), 18063. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75058-w>

128. Ruebhausen, M. R., Brozoski, T. J., & Bauer, C. A. (2012). A comparison of the effects of isoflurane and ketamine anesthesia on auditory brainstem response (ABR) thresholds in rats. *Hearing Research*, 287(1), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.04.005>
129. Ruel, J., Chen, C., Pujol, R., Bobbin, R. P., & Puel, J. L. (1999). AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig. *The Journal of Physiology*, 518 (Pt 3), 667–680. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0667p.x>
130. Ryan, A. F., Kujawa, S. G., Hammill, T., Le Prell, C., & Kil, J. (2016). Temporary and Permanent Noise-induced Threshold Shifts: A Review of Basic and Clinical Observations. *Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 37(8), e271-275. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001071>
131. Scharinger, A., Eckrich, S., Vandael, D. H., Schönig, K., Koschak, A., Hecker, D., Kaur, G., Lee, A., Sah, A., Bartsch, D., Benedetti, B., Lieb, A., Schick, B., Singewald, N., Sinnegger-Brauns, M. J., Carbone, E., Engel, J., & Striessnig, J. (2015). Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca²⁺-channels by a C-terminal automodulatory domain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00309>
132. Schimmang, T., Tan, J., Müller, M., Zimmermann, U., Rohbock, K., Köpschall, I., Limberger, A., Minichiello, L., & Knipper, M. (2003). Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss. *Development (Cambridge, England)*, 130(19), 4741–4750. <https://doi.org/10.1242/dev.00676>
133. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji—An Open Source platform for biological image analysis. *Nature methods*, 9(7), 10.1038/nmeth.2019. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
134. Schmitz, F. (2009). The making of synaptic ribbons: How they are built and what they do. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 15(6), 611–624. <https://doi.org/10.1177/1073858409340253>
135. Sergeyenko, Y., Lall, K., Liberman, M. C., & Kujawa, S. G. (2013). Age-Related Cochlear Synaptopathy: An Early-Onset Contributor to Auditory Functional Decline. *Journal of Neuroscience*, 33(34), 13686–13694. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1783-13.2013>
136. Shi, L., Chang, Y., Li, X., Aiken, S., Liu, L., & Wang, J. (2016). Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. *Neural Plasticity*, 2016, e6143164. <https://doi.org/10.1155/2016/6143164>
137. Shi, L., Liu, L., He, T., Guo, X., Yu, Z., Yin, S., & Wang, J. (2013). Ribbon synapse plasticity in the cochlea of Guinea pigs after noise-induced silent damage. *PloS One*, 8(12), e81566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081566>
138. Shrestha, B. R., Chia, C., Wu, L., Kujawa, S. G., Liberman, M. C., & Goodrich, L. V. (2018). Sensory Neuron Diversity in the Inner Ear Is Shaped by Activity. *Cell*, 174(5), 1229-1246.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.007>

139. Shuster, B., Casserly, R., Lipford, E., Olszewski, R., Milon, B., Viechweg, S., Davidson, K., Enoch, J., McMurray, M., Rutherford, M. A., Ohlemiller, K. K., Hoa, M., Depireux, D. A., Mong, J. A., & Hertzano, R. (2021). Estradiol Protects against Noise-Induced Hearing Loss and Modulates Auditory Physiology in Female Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12208. <https://doi.org/10.3390/ijms222212208>
140. Smith, A. R., Kwon, J. H., Navarro, M., & Hurley, L. M. (2014). Acoustic trauma triggers upregulation of serotonin receptor genes. *Hearing Research*, 315, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2014.06.004>
141. Spoenclin, H. (1971). Primary Structural Changes in the Organ of Corti After Acoustic Overstimulation. *Acta Oto-Laryngologica*, 71(1–6), 166–176. <https://doi.org/10.3109/00016487109125346>
142. Spoenclin, H. (1981). Differentiation of Cochlear Afferent Neurons. *Acta Oto-Laryngologica*, 91(1–6), 451–456. <https://doi.org/10.3109/00016488109138527>
143. Spoenclin, H., & Brun, J. P. (1973). Relation Of Structural Damage To Exposure Time And Intensity In Acoustic Trauma. *Acta Oto-Laryngologica*, 75(2–6), 220–226. <https://doi.org/10.3109/00016487309139699>
144. Stöver, T., & Diensthuber, M. (2011). [Molecular biology of hearing]. *Laryngo- Rhinotologie*, 90 Suppl 1, S22-34. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270444>
145. Sun, S., Babola, T., Pregernig, G., So, K. S., Nguyen, M., Su, S.-S. M., Palermo, A. T., Bergles, D. E., Burns, J. C., & Müller, U. (2018). Hair Cell Mechanotransduction Regulates Spontaneous Activity and Spiral Ganglion Subtype Specification in the Auditory System. *Cell*, 174(5), 1247-1263.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.008>
146. Suthakar, K., & Liberman, M. C. (2019). A simple algorithm for objective threshold determination of auditory brainstem responses. *Hearing Research*, 381, 107782. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.107782>
147. Suthakar, K., & Liberman, M. C. (2021). Auditory-nerve responses in mice with noise-induced cochlear synaptopathy. *Journal of Neurophysiology*, 126(6), 2027–2038. <https://doi.org/10.1152/jn.00342.2021>
148. Taberner, A. M., & Liberman, M. C. (2005). Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *Journal of Neurophysiology*, 93(1), 557–569. <https://doi.org/10.1152/jn.00574.2004>
149. Tamsett, T. J., Picchione, K. E., & Bhattacharjee, A. (2009). NAD⁺ Activates KNa Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(16), 5127–5134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0859-09.2009>
150. Tsukita, S., & Furuse, M. (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: From occludin to claudin. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 3(9), 569–573. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00212.x>
151. Turner, J. G., Bauer, C. A., & Rybak, L. P. (2007). Noise in Animal Facilities: Why It Matters. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(1), 10–13.

152. Turner, J. G., Parrish, J. L., Hughes, L. F., Toth, L. A., & Caspary, D. M. (2005). Hearing in Laboratory Animals: Strain Differences and Nonauditory Effects of Noise. *Comparative Medicine*, 55(1), 12–23.
153. Valero, M. D., Burton, J. A., Hauser, S. N., Hackett, T. A., Ramachandran, R., & Liberman, M. C. (2017). Noise-induced cochlear synaptopathy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hearing Research*, 353, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.07.003>
154. Verdoodt, D., Eens, S., Van Dam, D., De Deyn, P. P., Vanderveken, O. M., Szewczyk, K., Saldien, V., Ponsaerts, P., & Van Rompaey, V. (2021). Effect of Oral Allylnitrile Administration on Cochlear Functioning in Mice Following Comparison of Different Anesthetics for Hearing Assessment. *Frontiers in Toxicology*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftox.2021.641569>
155. Verhulst, S., & Shera, C. A. (2015). Relating the Variability of Tone-Burst Otoacoustic Emission and Auditory Brainstem Response Latencies to the Underlying Cochlear Mechanics. *AIP Conference Proceedings*, 1703, 090003. <https://doi.org/10.1063/1.4939401>
156. Vidler, M., & Parkert, D. (2004). Auditory brainstem response threshold estimation: Subjective threshold estimation by experienced clinicians in a computer simulation of the clinical test. *International Journal of Audiology*, 43(7), 417–429. <https://doi.org/10.1080/14992020400050053>
157. von Békésy, G., & Peake, W. T. (1990). *Experiments in hearing*. Acoustical Society of America.
158. Wang, H., Li, B., Lu, Y., Han, K., Sheng, H., Zhou, J., Qi, Y., Wang, X., Huang, Z., Song, L., & Hua, Y. (2021). Real-time threshold determination of auditory brainstem responses by cross-correlation analysis. *IScience*, 24(11). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103285>
159. Wangemann, P. (2006). Supporting sensory transduction: Cochlear fluid homeostasis and the endo-cochlear potential. *The Journal of Physiology*, 576(1), 11–21. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112888>
160. Warchol, M. E. (2019). Interactions between Macrophages and the Sensory Cells of the Inner Ear. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(6), a033555. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033555>
161. Wei-ju, H., Xiao-rui, S., & Nuttall, A. (2010). Noise exposure induced cochlear hair cell death pathways in guinea pig. *Journal of Otology*, 5(1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S1672-2930\(10\)50010-2](https://doi.org/10.1016/S1672-2930(10)50010-2)
162. Wilcox, E. R., Burton, Q. L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N. A., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J., Riazuddin, S., & Friedman, T. B. (2001). Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 104(1), 165–172. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00200-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00200-8)
163. Wright, S. H. (2004). Generation of resting membrane potential. *Advances in Physiology Education*, 28(4), 139–142. <https://doi.org/10.1152/advan.00029.2004>
164. Yang, B., Desai, R., & Kaczmarek, L. K. (2007). Slack and Slick KNa Channels Regulate the Accuracy of Timing of Auditory Neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2617–2627. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5308-06.2007>

165. Yang, C.-H., Schrepfer, T., & Schacht, J. (2015). Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00276>
166. Yuan, A., Santi, C. M., Wei, A., Wang, Z.-W., Pollak, K., Nonet, M., Kaczmarek, L., Crowder, C. M., & Salkoff, L. (2003). The Sodium-Activated Potassium Channel Is Encoded by a Member of the Slo Gene Family. *Neuron*, 37(5), 765–773. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00096-5)
167. Zanazzi, G., & Matthews, G. (2009). The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals. *Molecular Neurobiology*, 39(2), 130–148. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8058-z>
168. Zhang, Y., Brown, M. R., Hyland, C., Chen, Y., Kronengold, J., Fleming, M. R., Kohn, A. B., Moroz, L. L., & Kaczmarek, L. K. (2012). Regulation of neuronal excitability by interaction of fragile X mental retardation protein with slack potassium channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(44), 15318–15327. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2162-12.2012>
169. Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Li, W., Hong, G., Guo, S., Xiao, Y., Liu, Z., Ding, S., Bi, X., Ye, F., Jin, J., & Chai, R. (2023). Macrophage-mediated immune response aggravates hearing dysfunction caused by the disorder of mitochondrial dynamics in cochlear hair cells. *Human Molecular Genetics*, 32(7), 1137–1151. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac270>
170. Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D., & Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783), 149–155. <https://doi.org/10.1038/35012009>
171. Zheng, Q. Y., Johnson, K. R., & Erway, L. C. (1999). Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing research*, 130(1–2), 94–10

Danksagung

Liebe Jutta,

vielen Dank für die Möglichkeit zu einer qualifizierten Wissenschaftlerin zu wachsen. Wir sind erfolgreich zusammen durch viele Herausforderungen, gegangen, die die Erarbeitung der Daten und die Fertigstellung der Dissertation an uns herangetragen hat. Ich bedanke mich für deine Hilfe und dein offenes Ohr.

Liebes IRTG1830 und liebe Gabi,

ich bedanke mich für die Chance wissenschaftliche Beziehungen zu knüpfen und davon zu profitieren.

Liebe AG Engel,

liebe Simone, liebe Kerstin, lieber Stefan, lieber Guobin,

Dankeschön für die gemeinsame Zeit in der AG und für den konstruktiven Austausch! Danke Kerstin für die Hilfe beim Fertigstellen der Daten zu den Slack-Tieren über diese Arbeit hinaus!

Liebe Heike,

du hast mir mein Leben in der Welt der Universitätsbürokratie so oft erleichtert und mir damit so manchen Stress erspart. Danke dir für alle Hilfe!

Liebe Swenja und Tatjana, lieber Daniel,

ich bedanke mich sehr herzlich, dass ihr mich so gut unterstützt habt durch euer Engagement mit „meinen Slacksis“.

Liebe Steffi,

vielen Dank für die gemeinsamen Stunden am Homeoffice-PC, die gefüllt waren mit Lektionen zum wissenschaftlichen Arbeiten, viel wichtiger aber mit wertvollen Beziehungsfischen.

Liebe Fischi,

vielen Dank für deine Arbeit mit den Mäusen. Ohne dein Zutun und dein Kollegentum wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, danke dass ich so oft auf dich zählen konnte.

Fischi und Steffi, Danke für die vielen kleinen gemeinsamen, aber mir umso wichtigeren, Schritte durch meine Zeit der Promotion.

Liebe Rike,

als ehemalige Kollegin und nun enge Freundin müsste ich mich für so viele besondere Momente bedanken, die uns zusammengeschweißt haben - ich möchte keinen missen. Danke!!!!

Danke an die wichtigen Menschen, die mich in den letzten Wochen der Fertigstellung dieser Arbeit motiviert haben.

Liebe Familie und liebe Freunde,

mit aller Liebe einen herzlichen Dank für die Unterstützung, die ich während meiner langen Ausbildung erfahren habe. Ich bedanke mich für jeden Rat und jede Tat, jedes gemeinsame Essen, jedes gemeinsame Freuen und jeden Trost. Ich weiß, ihr feiert diesen Erfolg genauso wie ich! Danke für den gemeinsamen Weg.

Curriculum Vitae

Pauline Schepsky

Publikationen, Konferenzen und Forschungsaufenthalt

Blum*, **Schepsky***, Nasri, Schätzle, Derleder, Fischer, Engel#, Kurt#; Cochlea synaptopathy revisited: Acoustic trauma affects inner hair cell synaptic ribbons more than glutamatergic postsynapses in C57Bl6/N mice.

(Manuskript in Vorbereitung)

Schepsky, Blum, Schätzle, Bauch, Lukowski, Sorg, Hecker, Wenzel, Ruth, Kurt#, Engel#; Hearing function, inner hair cell synapses and vulnerability to noise trauma in mice lacking Slack (Slo2.2) K⁺ channels

(Manuskript in Vorbereitung)

Pohlová, **Schepsky**, Lehmann, Hochkirch, Masopustová, Simek, Schoo, Vodička, Robovský (2014):

Defining management units for European captive aardvarks. Zoo Biol. Sep-Oct;33(5):433-9. doi: 10.1002/zoo.21164. Epub 2014 Sep 3.

- Digital Ribbon Synapses Seminar Series (RSSS), Jan. – Feb. 2021
- Digital 44th Annual MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology, USA, Posterpräsentation; Jan. 2021
- Colloquium & Trainee Retreat IRTG 1830, Bad Dürkheim; Vortrag & Poster; Mär.2020
- 43rd Annual MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology, San Jose, USA, Posterpräsentation, Jan. 2020
- Joint Symposium IRTG 1830, Weiskirchen, talk; Sept. 2019,
- Colloquium & Trainee Retreat IRTG 1830, Trippstadt, talk & poster; Apr. 2019
- 14th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, Posterpräsentation Mär. 2019
- Tissue Cleaning and 3D Imaging Vourse, Paris, France, LaVision BioTec GmbH – A Miltenyi Biotec Company, Dez. 2018
- Colloquium IRTG 1830, Nonnweiler, Vortrag; Aug. 2018
- CSMB Meeting BANFF: Membrane Proteins in Health and Disease, University of Alberta, Posterpräsentation, Apr. 2018
- 41st Annual MidWinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology, Posterpräsentation, Feb. 2018
- 54th Workshop/Symposium on Inner Ear Biology, The VIANNA research team, Posterpräsentation; Sept. 2017
- Joint Symposium IRTG 1830, Annweiler, Posterpräsentation, Aug. 2017
- 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Posterpräsentation, Mär. 2017
- Colloquium IRTG 1830, St. Martin, Mär. 2017

04/2019-07/2019

Forschungsaufenthalt in der “Division of Pediatric Nephrology”, Edmonton, University of Alberta, Canada; Prof. Todd Alexander
Erste Ergebnisse zur Expression von LacZ unter dem Promotor des Claudin12 in der Cochlea von Cldn12-knockout Maus