

# Dissertation

Auswirkungen von Schalltraumata unterschiedlicher Intensität auf  
das Phänomen der cochleären Synaptopathie am C57BL/6N-  
Mausstamm

vorgelegt von  
Philipp Yann Schätzle

2025

Tag der Promotion: 22. April 2026

Dekan: Prof. Dr. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Jutta Engel  
Prof. Dr. Maximilian Linxweiler

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

**Auswirkungen von Schalltraumata unterschiedlicher Intensität  
auf das Phänomen der cochleären Synaptopathie am  
C57BL/6N-Mausstamm**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2025**

**vorgelegt von: Philipp Yann Schätzle geb. am: 09.10.1996 in Saarbrücken**

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Zusammenfassung.....	6
2 Einleitung.....	8
2.1 Arten von Hörverlust.....	8
2.2 Aufbau des Innenohrs und des Corti-Organ.....	9
2.3 Die afferenten Synapsen der inneren Haarzellen.....	13
2.4 Subtypen von SGN vom Typ I.....	14
2.5 Die Lärm-induzierte cochleäre Synaptopathie.....	16
2.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Versuchstiere.....	21
3.2 ABR-Messungen und Schalltrauma.....	21
3.3 Töten der Versuchstiere und Entnahme der Cochlea.....	22
3.4 Fixierung und Präparation des Corti-Organ.....	23
3.5 Immunhistochemische Färbung der Präparate.....	23
3.6 Laserscan-Mikroskopie.....	26
3.7 Quantifizierung der Fluoreszenzsignale.....	26
3.8 Zuordnung der Aufnahmen zu einem Frequenzbereich.....	27
3.9 Verwendete Daten.....	29
3.10 Statistische Auswertung der Daten.....	31
4 Ergebnisse.....	32
4.1 Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich.....	32
4.1.1 Immunfluoreszenzfärbungen der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea einer Kontrollmaus.....	32
4.1.2 Immunfluoreszenzfärbung der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea nach 100 dB SPL Schalltrauma.....	34
4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea nach 106 dB SPL Schalltrauma.....	36
4.1.4 Immunfluoreszenzfärbung der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea nach 112 dB SPL Schalltrauma.....	38
4.2 Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der Präsynapsen.....	40
4.2.1 Verringerung der Anzahl von Präsynapsen im hochfrequenten Bereich.....	40

4.2.2 Vergrößerung der durchschnittlichen Präsynapsenfläche infolge der Schalltraumata.....	41
4.2.3 Verteilung der Präsynapsenfläche verbreitert sich mit steigender Traumaintensität und in Richtung basale Cochlea-Region.....	43
4.2.4 Zusammenfassung der Trauma-Effekte auf die Präsynapse.....	45
4.3 Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der postsynaptischen Homer1-Cluster.....	45
4.3.1 Geringe Veränderungen in der Anzahl der Postsynapsen.....	45
4.3.2 Anstieg der Postsynapsenfläche in niedrigen bis mittleren Frequenzbereichen.....	47
4.3.3 Verteilung der Postsynapsenfläche verbreitert sich mit steigender Traumaintensität und Cochlea-Region.....	49
4.3.4 Zusammenfassung der Trauma-Effekte auf die Postsynapsen.....	50
4.4 Untersuchung der Paarung von Prä- und Postsynapse.....	50
4.4.1 Anzahl ungepaarter Präsynapsen.....	51
4.4.2 Anzahl ungepaarter Postsynapsen.....	52
4.4.3 Zusammenfassung der Trauma-Effekte auf die synaptische Paarung.....	53
4.5 ABR-Hörschwellen vor und nach dem Trauma.....	53
4.6 Auswirkungen der Schalltraumata auf die Hörschwellen.....	54
4.6.1 Ergebnisse der Messungen der Welle-I Amplituden.....	55
5 Diskussion.....	57
5.1 Ribbonsynapsen ohne Schalltrauma.....	57
5.2 Synaptischer Phänotyp nach einem Schalltrauma von 100 dB SPL.....	58
5.3 Synaptischer Phänotyp bei Steigerung des Schalltraumas auf 106 und 112 dB SPL.....	60
5.4 Mögliche methodische Fehlerquellen.....	61
5.5 Das Phänomen des Hidden Hearing Loss und der cochleären Synaptopathie.....	63
5.5.1 Pathomechanismus des milden Schalltraumas.....	63
5.5.1 Selektiver Verlust von Nervenfasern mit niedriger Spontanaktivität?.....	65
5.5.2 Ursachen der permanenten Hörschwellenerhöhung.....	66
5.5.3 Regenerations- und Schutzmechanismen der Cochlea.....	67
5.5.4 Vulnerabilität der basalen Cochlea.....	68
5.5.5 Cochleäre Synaptopathie beim Menschen.....	69
6 Literaturverzeichnis.....	73
7 Danksagung.....	81
8 Lebenslauf.....	83

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Mittelohrs und der Cochlea.....	11
Abbildung 2: Aufbau der Cochlea.....	12
Abbildung 3: Das Corti-Organ.....	13
Abbildung 4: Aufbau einer Synapse der inneren Haarzelle.....	14
Abbildung 5: Fasertypen der afferenten Innervation der inneren Haarzelle.....	16
Abbildung 6: Temporäre Schwellenerhöhung von ABRs und DPOAEs infolge eines moderaten Schalltraumas von 100 dB SPL.....	18
Abbildung 7: Anzahl von Ribbons im Bereich der Cochlea infolge eines Schalltraumas von 100 dB SPL.....	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung der immunhistochemischen indirekten Antikörperfärbung	25
Abbildung 9: Zusammengesetzte Übersichtsaufnahme der apikalen Hälfte einer Cochlea.....	29
Abbildung 10: Tonotope Organisation der Cochlea.....	30
Abbildung 11: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen der Kontrollgruppe.....	34
Abbildung 12: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen einer Maus mit 100 dB SPL Schalltrauma.....	36
Abbildung 13: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen mit 106 dB SPL Schalltrauma.....	38
Abbildung 14: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen mit 112 dB SPL Schalltrauma.....	40
Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl präsynaptischer Signale pro IHZ.....	42
Abbildung 16: Durchschnittliche Größe eines präsynaptischen Clusters.....	43
Abbildung 17: Verteilung der Präsynapsenfläche in Abhängigkeit vom Schalltrauma und der Cochlea-Region.....	45
Abbildung 18: Durchschnittliche Anzahl postsynaptischer Signale pro IHZ.....	47
Abbildung 19: Durchschnittliche Größe postsynaptischer Signale.....	49
Abbildung 20: Verteilung der Postsynapsenfläche in Abhängigkeit vom Schalltrauma und der Cochlea-Region.....	50
Abbildung 21: Durchschnittliche Anzahl präsynaptischer Signale ohne Postsynapse pro IHZ.....	52
Abbildung 22: Durchschnittliche Anzahl ungepaarter postsynaptischer Signale pro IHZ.....	53
Abbildung 23: Hörschwellen der Kontroll- und Versuchsgruppen vor, unmittelbar nach und 28 Tage nach Schalltraumatisierung.....	55
Abbildung 24: Auswirkung der unterschiedlichen Schallintensitäten auf die Wachstumskurve der Welle I Amplituden der ABR-Messungen 28 Tage nach Trauma.....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 2: Übersicht über die für die statistische Auswertung der Hörschwellen- und ABR-Messungen verwendeten Daten.....	31
Tabelle 3: Übersicht über die für die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen verwendeten Daten .....	31

## Abkürzungsverzeichnis

Hz	Hertz
dB SPL	<i>Decibel Soundpressure Level</i> , Dezibel Schalldruckpegel
ÄHZ	Äußere Haarzellen
IHZ	Innere Haarzellen
SGN	Spiralganglion-Neuron
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ABR	<i>Auditory Brainstem Response</i> , Auditorische Hirnstammantwort
DPOAE	Distorsionsprodukt otoakustische Emissionen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
BPP	Block- und Permeabilisierungspuffer
RP	Reaktionspuffer
WP	Waschpuffer
MIP	<i>Maximum Intensity Projection</i> , Maximale Intensitätsprojektion
LSM	Laserscan-Mikroskop
LSR	<i>Low Spontaneous Rate</i> Faser, Faser mit geringer Spontanrate
MSR	<i>Medium Spontaneous Rate</i> Faser, Faser mit mittlerer Spontanrate
HSR	<i>High Spontaneous Rate</i> Faser, Faser mit hoher Spontanrate
TTS	<i>Temporary Treshold Shift</i> , transiente Schwellenverschiebung
PTS	<i>Permanent Treshold Shift</i> , permanente Schwellenverschiebung

# 1 Zusammenfassung

Die lärminduzierte cochleäre Synaptopathie ist durch einen teilweisen Verlust von Synapsen zwischen den inneren Haarzellen und den Spiralganglion-Neuronen des Innenohres gekennzeichnet, ohne jedoch eine dauerhafte Erhöhung der Hörschwelle zu verursachen.

Dieses Phänomen wurde erstmals an der Mauslinie CBA/CaJ nach einer zweistündigen Schallexposition mit 100 dB SPL im Frequenzbereich 8 – 16 Hz beschrieben. Es kam im mittel- bis hochfrequenten Bereich zu einer Erhöhung der Hörschwellen um bis zu 40 dB, die sich nach 2 Wochen zurückbildete, jedoch zu einem permanenten Verlust von bis zur Hälfte der präsynaptischen Ribbons (Kujawa & Liberman, 2009).

In dieser Studie wurde die cochleäre Synaptopathie bei Mäusen der C57BL/6N-Linie vier Wochen nach einem Schalltrauma untersucht. Die Tiere waren in Narkose für 2 h einem weißen Rauschen von 8 – 16 kHz mit Schalldruckpegeln von 100 dB SPL, 106 dB SPL oder 112 dB SPL ausgesetzt worden. Gleichaltrige Kontrolltiere hatten kein Schalltrauma erhalten. Ableitungen vom auditorischen Hirnstamm (ABR-Ableitungen) dienten der Bestimmung der Hörschwelle vor, direkt nach und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Trauma (Blum *et al.*, 2024; Derleder, eingereicht).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der immunhistochemischen Charakterisierung der Synapsen der inneren Haarzellen 4 Wochen nach dem Trauma in whole-mount-Präparaten der fixierten, unentkalkten Cochlea mit allen cochleären Abschnitten (apikal, medial, midbasal, basal). Präsynaptische Ribbons wurden mit anti-CtBP2-Antikörpern markiert; Postsynapsen mit Antikörpern gegen Homer1, ein tertiäres Strukturprotein der postsynaptischen Glutamatrezeptoren. Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops wurden Bildstapel der indirekten Immunfluoreszenzsignale im Bereich der inneren Haarzellen aufgenommen und offline verarbeitet, wobei die quantitativen Auswertungen an maximalen Intensitätsprojektionen erfolgten.

Die Anzahl der Ribbons von ca. 17,5 pro innerer Haarzelle nahm durch das 100 dB SPL-Trauma midbasal um 40 % und basal um 47 % ab. Die von CBA/CaJ-Mäusen bekannten Veränderungen der Anzahl und Größe der Ribbons wurden in dieser Studie nach dem Schalltrauma von 100 dB SPL, dem niedrigsten Trauma, beobachtet. Überlebende Präsynapsen waren praktisch immer gepaart und wiesen eine Größenzunahme auf. Eine Steigerung der Traumaintensität hatte eine stärkere permanente Erhöhung der Hörschwelle und eine Erweiterung des betroffenen Frequenzbereichs, jedoch keine stärkeren präsynaptischen Veränderungen zur Folge.

Die postsynaptischen Strukturen waren gegenüber den Traumata deutlich widerstandsfähiger als die Ribbons, was zu 3 – 5 ungepaarten Postsynapsen pro innerer Haarzelle führte und im Widerspruch zu den Ergebnissen an CBA/CaJ-Mäusen steht (Kujawa & Liberman, 2009). Wegen des geringeren Verlusts von Postsynapsen im Vergleich zu Ribbons im C57BL/6N-Mausmodell

könnte eine hypothetische Regeneration geschädigter Präsynapsen zu einer Wiederherstellung der unterbrochenen synaptischen Informationskanäle von der Cochlea ins Gehirn führen.

## **Abstract**

### **The impact of different noise trauma intensities on the phenomena of the cochlear synaptopathy in C57BL/6N mice**

Noise-induced cochlear synaptopathy is characterized by partial loss of synapses between inner hair cells and spiral ganglion neurons of the inner ear without causing a permanent increase in hearing thresholds. This phenomenon was first described after exposing CBA/CaJ mice to noise of 100 dB SPL between 8 – 16 kHz for 2 hours. Hearing thresholds, which were elevated up to 40 dB in the mid-to high-frequency range, recovered within two weeks, but up to 50 % of presynaptic ribbons degenerated irreversibly (Kujawa & Liberman, 2009).

In the present study, cochlear synaptopathy was assessed in mice of the C57BL/6N-line four weeks after a noise trauma. Anesthetized mice were exposed to white noise from 8 – 16 kHz with sound pressure levels of 100 dB SPL, 106 dB SPL or 112 dB SPL. Aged-matched control animals did not receive a noise trauma. Recordings from the auditory brainstem (ABR recordings) yielded hearing thresholds before, directly after and at certain time points after the trauma (Blum *et al.*, 2024; Derleder, eingereicht).

The present study focuses on the immunohistochemical characterization of inner hair cell synapses four weeks after trauma in whole-mount specimen of fixed, non-decalcified cochleae containing all cochlear regions (apical, medial, midbasal and basal). Presynaptic ribbons were labelled with anti-CtBP2 antibodies; postsynapses with antibodies against Homer1, a tertiary scaffold protein of postsynaptic glutamate receptors. Using a confocal laser scanning microscope, image stacks of indirect immunofluorescence signals were acquired and processed off-line. Quantitative analyses were carried out on maximum intensity projections.

The 100 dB SPL trauma caused a reduction of the number of ribbons (~ 17,5 per inner hair cell) by 40 % in the midbasal and by 47 % in the midbasal region, respectively. Similar changes in the number and sizes of ribbons known from CBA/CaJ mice were observed in the present study after the trauma of 100 dB SPL, the lowest trauma applied. Surviving ribbons were paired and additionally enlarged. Increasing trauma intensity led to enhanced permanent increases in hearing thresholds in a wider frequency range but not to more pronounced presynaptic changes.

Postsynaptic structures were more resistant to the traumata than ribbons, leading to 3 – 5 unpaired postsynapses per inner hair cell, which contrasts results in CBA/CaJ mice (Kujawa & Liberman, 2009). Because of the smaller loss of postsynapses versus ribbons in the C57BL/6N mouse model, a hypothetical regeneration of damaged ribbons might lead to the restoration of interrupted synaptic information channels from the cochlea to the brain.

## 2 Einleitung

„Der Hörsinn des Menschen ermöglicht uns die akustische Orientierung in der Umwelt und die zwischenmenschliche Kommunikation durch Sprache. Ohne Hörsinn sind unser soziales Leben und unsere beruflichen Möglichkeiten eingeschränkt.“ (Kurtz, Pape & Silbernagl, 2014)

Das Gehör und das Sprachverständnis sind wichtige Fähigkeiten für den Menschen, um mit seiner Umwelt zu kommunizieren. Kommt es zu einer Einschränkung oder einem Verlust in der Wahrnehmung von Schallreizen, so sind die Folgen für den Betroffenen schwerwiegend. Eine angeborene oder erworbene Schwerhörigkeit/Taubheit im Säuglings und Kindesalter kann das Sprachverständnis die Entwicklung des motorischen Sprechens und die geistige Entwicklung lebenslang beeinflussen, wenn keine therapeutischen Maßnahmen ergriffen werden.

### 2.1 Arten von Hörverlust

Ein wichtiges objektives diagnostisches Instrument, um Hörschäden objektiv festzustellen, ist die Bestimmung der Hörschwelle durch die Ableitung von akustischen Hirnstamm-Potentialen, englisch ABR (*auditory brainstem response*)-Messung, (Buettner *et al.*, 2005; Maurer, Lang & Eckert, 2005; Willott, 2006). Bei den Hörstörungen unterscheidet man Schalleitungsstörungen, bei denen es durch Einschränkung der Gehörknöchelchenmechanik zu einem Hörverlust kommt, wie zum Beispiel bei einer Mittelohrentzündung, von Schallempfindungsstörungen, bei denen eine Schädigung der mechanischen oder elektrochemischen Verarbeitung des akustischen Signals in der Cochlea oder der Hörbahn vorliegt (Michels, Duffy & Rogers, 2019). Bei Schallempfindungsstörungen, deren Ursache in der Cochlea liegt, unterscheidet man weiterhin zwischen einer temporären Hörschwellerhöhung (*temporary threshold shift*, TTS), die zum Beispiel durch Medikamente wie das Schleifendiuretikum Furosemid verursacht sein kann, und einer permanenten Hörschwellerhöhung (*permanent threshold shift*, PTS). Zwei häufige Ursachen hierfür sind irreversible Schäden der Cochlea im Alter, die zu Altersschwerhörigkeit führen, oder ein durch ein Schalltrauma ausgelöster Schaden, wie zum Beispiel nach einem Knalltrauma, bei dem in bestimmten Frequenzbereichen die äußeren Haarzellen (ÄHZ) geschädigt werden. Eine PTS geht mit erheblichen Einschränkungen des Betroffenen einher und kann mit einem Hörgerät oder Cochlea-Implantat therapiert werden (Kurtz, Pape & Silbernagl, 2014).

Neben der Erhöhung der Hörschwelle kann es auch zu einem Verlust des selektiven Hörens kommen. Patienten mit einem solchen Verlust, in der Regel Patienten mittleren Alters, beschreiben beispielsweise Schwierigkeiten, in lauter Umgebung ihren Gesprächspartner verstehen zu können. Im Gegensatz zu einer PTS oder TTS ist hierbei die Hörschwelle wenig oder nicht beeinträchtigt, bei einer Tonschwellen-Audiometrie oder ABR-Messung würde eine physiologische Hörschwelle

festgestellt werden. Dieses Phänomen könnte durch den Verlust von bestimmten Hörnervenfasern, die an der Filterung akustischer Signale beteiligt sind, verursacht sein (Wu *et al.*, 2019). Die angenommene zugrunde liegende pathophysiologische Veränderung ist die cochleäre Synaptopathie, welche Gegenstand dieser Arbeit ist. Bei der Altersschwerhörigkeit mit entsprechenden Schwellenerhöhungen ist das selektive Hören vermutlich immer eingeschränkt (Wu *et al.*, 2019)

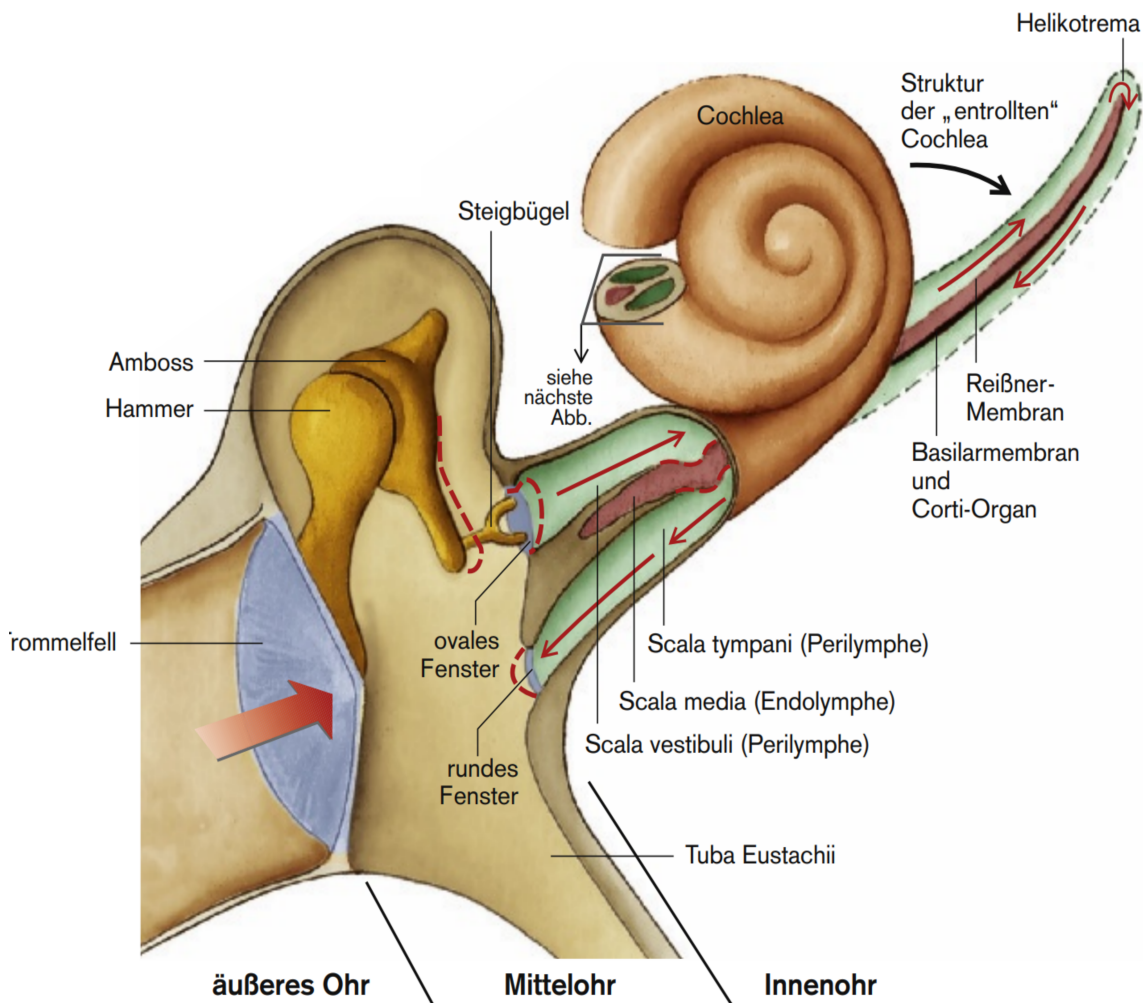
## 2.2 Aufbau des Innenohrs und des Corti-Organs

Das Ohr der Säugetiere lässt sich in drei Abschnitte unterteilen. (Abbildung 1). Das äußere Ohr dient als Trichter für die eintreffenden Schallwellen und setzt sich aus der Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang zusammen. Mit dem Trommelfell beginnt das Mittelohr, welches die Schallwellen über die Gehörknochen Hammer, Amboss und Steigbügel auf das Innenohr überträgt.

Die Cochlea, die Hörschnecke des Innenohrs, besteht aus drei durch Membranen getrennte Gänge und ist für die Umwandlung der Schallwellen in elektrochemische Signale verantwortlich (Klinke, Silbernagl & Pape, 2010) (Abbildung 2). Mit dem ovalen Fenster beginnt die Scala vestibuli, die durch die Reissner-Membran von der Scala media getrennt ist. In der Scala media befindet sich das Corti-Organ. Die Basilarmembran trennt die Scala media von der Scala tympani, welche am runden Fenster endet. Im Helicotrema, der Spitze der Cochlea, gehen Scala vestibuli und Scala tympani ineinander über.

Das Corti-Organ sitzt auf der Basilarmembran auf. Es wird aus inneren Haarzellen (IHZ) und äußeren Haarzellen (ÄHZ) sowie zahlreichen Stützzellen gebildet und wird von der Tektorialmembran überdeckt (Klinke, Silbernagl & Pape, 2010) (Abbildung 3). Aus dem Modiolus, der zentralen Achse der Cochlea, gelangen afferente Nervenfasern zu den Haarzellen. Die afferente Innervation erfolgt durch die sogenannten Spiralganglion-Neurone (SGN) vom Typ I und II. Diese sind bipolare Nervenzellen, deren Zellkörper im Ganglion spirale zu finden sind und deren periphere Dendriten über die Habenula perforata zu den Haarzellen gelangen. Ihr Axon bildet je eine Faser des Hörnerven und zieht durch den inneren Gehörgang in den Hirnstamm zum Nucleus cochlearis. Auf die SGN Typ I, die 90-95 % aller SGN ausmachen und die IHZ innervieren (Sun *et al.*, 2018; Moser *et al.*, 2023), wird in Abschnitt 2.4 genauer eingegangen.

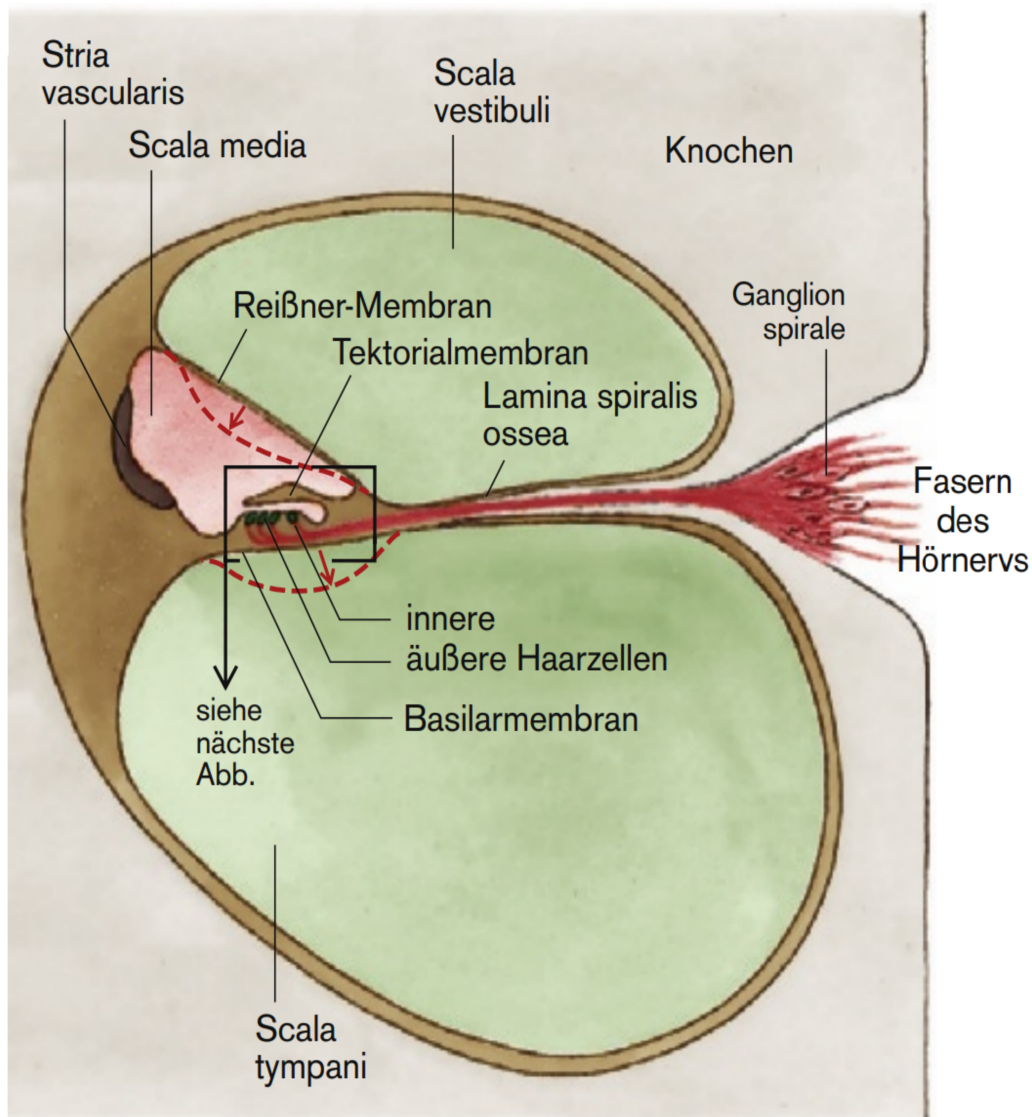
Zu Beginn der Schallwahrnehmung werden die Schallwellen über den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell geleitet. Dieses wird in Schwingung versetzt, überträgt die Bewegung über die Gehörknochen auf das ovale Fenster und somit auf das Innenohr (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Aufbau des Mittelohrs und der Cochlea.**

Das Trommelfell bildet die Grenze zwischen äußerem und Mittelohr. Es überträgt die eintreffenden Schallwellen (roter, dicker Pfeil) auf die Gehörknochen Hammer, Amboss und Steigbügel. Diese übertragen die Schwingung über das ovale Fenster auf die Scala vestibuli im Innenohr (dünne rote Linien und Pfeile). Modifiziert nach Klinker, Silbernagl & Pape, 2010.

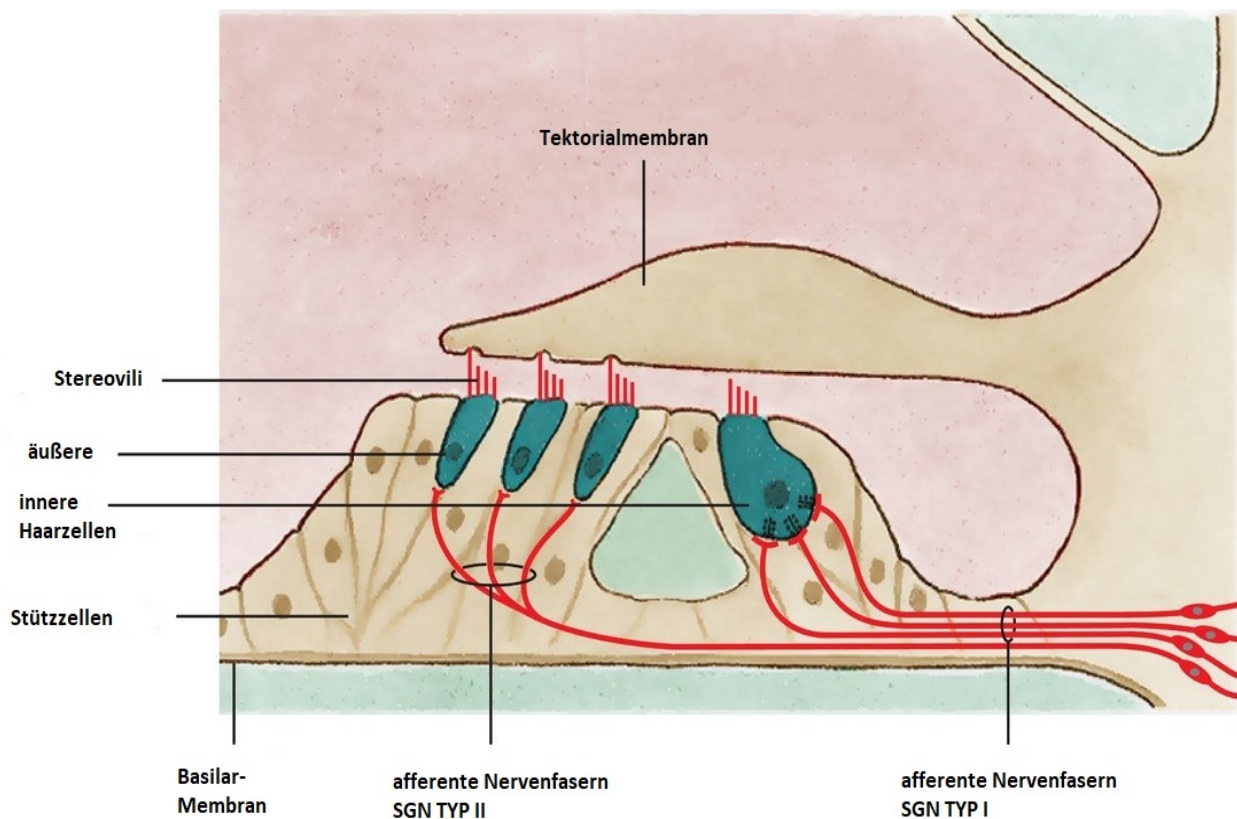
In der Cochlea werden die Schwingungen nun in elektrochemische Signale codiert. Da die Perilymphe in der Scala Vestibuli als Flüssigkeit nicht komprimierbar ist, entsteht eine Auslenkung mit derselben Frequenz wie die der Schwingung der Gehörknöchelchen (Abbildungen 1 und 2). Aufgrund von Gradienten in der Geometrie und Steifigkeit der Basilarmembran entsteht ein nichtlineares Phänomen, das sich in Richtung Helicotrema ausbreitet, die sogenannte Wanderwelle. Der Ort des Amplitudenmaximums der Wanderwelle liegt dabei bei sehr hohen Frequenzen am basalen Ende der Cochlea und für tiefe Frequenzen am apikalen Ende, am Helicotrema, was als Frequenz-Orts-Kodierung oder Tonotopie bezeichnet wird (Zenner, 1994; Klinker, Silbernagl & Pape, 2010).



**Abbildung 2: Aufbau der Cochlea.**

Zu sehen ist die Scala media mit dem näher beschriebenen Corti-Organ. Dieses ist von der Scala vestibuli durch die Reißner-Membran und von der Scala tympani durch die Basilararmembran getrennt. Die roten, gestrichelten Linie beschreiben die Verschiebung der Membranen durch die Wanderwelle, die infolge von Schallwirkung im Innenohr entsteht. Modifiziert nach Klinke, Silbernagl & Pape, 2010.

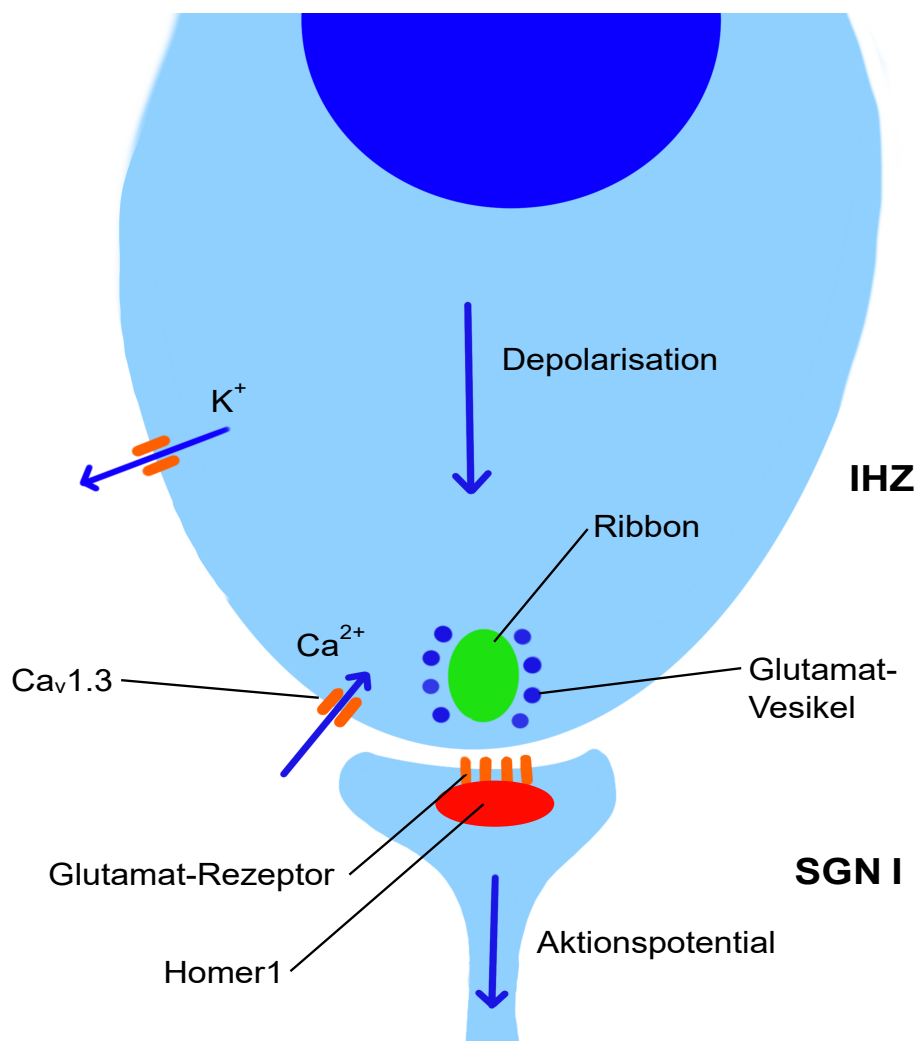
Durch die Wanderwelle werden am frequenzspezifischen Ort die Basilar- und Tektorialmembran maximal gegeneinander verschoben und damit die Stereozilien der ÄHZ, die mit der Tektorialmembran verbunden sind, ausgelenkt. Durch den Transduktionsstrom in die ÄHZ hinein wird die Elektromotilität der ÄHZ angeregt, die die Schwingungen auf der Basilararmembran verstärkt. Die Stereozilien der IHZ werden durch den subtektorialen Flüssigkeitsstrom ausgelenkt, wodurch der Transduktionsstrom aktiviert wird. Infolgedessen kommt es in der IHZ zu einer Depolarisation und zu einer Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat an den cochleären Synapsen und somit zu einer Umwandlung des mechanischen Signals der Schallwelle in ein elektrochemisches Signal (Zenner, 1994; Klinke, Silbernagl & Pape, 2010).



### Abbildung 3: Das Corti-Organ.

Auf der Basilarmembran liegt das Corti-Organ. Eingebettet in Stützzellen findet man 3 Reihen an äußeren Haarzellen (ÄHZ) die für die Schallverstärkung und Dämpfung zuständig sind, sowie eine Reihe mit inneren Haarzellen (IHZ), die die mechanische Anregung durch die Wanderwelle in ein Rezeptorpotenzial und in die Freisetzung von Transmitter umwandeln. An ihren apikalen Enden sind die Stereozilien zu erkennen, überdeckt von der Tektorialmembran. Die afferenten Nervenfasern bilden mit der IHZ jeweils eine Synapse und führen über den Modiolus in das zentrale Nervensystem (SGN I). Die mit den ÄHZ verbundenen afferenten Fasern (SGN II) können mehrere Synapsen mit unterschiedlichen ÄHZ bilden. Efferente Nervenfasern sind hier nicht dargestellt. Modifiziert nach Klinke, Silbernagl & Pape, 2010.

## 2.3 Die afferenten Synapsen der inneren Haarzellen



**Abbildung 4: Aufbau einer Synapse der inneren Haarzelle.**

Jede der ca. 15 afferenten synaptische Verbindungen einer IHZ mit einem SGN I besteht aus einem präsynaptischen Ribbon (grün), das als Glutamat-Vesikel-Anker dient und der Postsynapse, unter anderem bestehend aus Glutamat-Rezeptoren und dem Strukturprotein Homer1 (rot). Durch die Schall-induzierte Depolarisation der IHZ werden spannungsabhängige Ca<sub>v</sub>1.3-Calcium-Kanäle geöffnet. Das Calcium verursacht eine Exozytose der Vesikel und es folgt eine Erregung der SGN I über die Glutamat-Rezeptoren. Abbildung nach Sendin et al., 2007 und Rutherford et al., 2021.

Die Synapsen der inneren Haarzelle (Ribbonsynapsen) bestehen aus einer prä- und einer postsynaptischen Seite (Abbildung 4). Die Präsynapse der IHZ wird auch Ribbon genannt und besteht aus einer speziellen eiförmigen Proteinstrukturen, an die mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel gebunden sind (Schmitz, Königstorfer & Südhof, 2000; Meyer & Moser, 2010; Moser & Starr, 2016). Bei Depolarisation der Zelle werden synapsennahe, spannungsgesteuerte Calcium-

Kanäle geöffnet. Durch den Calcium-Einstrom kommt es zur Exozytose der Neurotransmitter-Vesikel und zur Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt (Platzer *et al.*, 2000; Brandt, Striessnig & Moser, 2003). Die Postsynapse wird durch die Terminale der afferenten Nervenfasern der TYP I SGN gebildet. An ihr befinden sich Glutamatrezeptoren, die durch das Glutamat, das infolge der Depolarisation der IHZ freigesetzt wird, aktiviert werden (Geisler, 1998; Moser & Starr, 2016). Homer1 ist ein tertiäres Strukturprotein der Postsynapse und bindet indirekt über Postsynaptic Density (PSD 95) ionotrope Glutamatrezeptoren an den Typ-I-Afferenzen (Iasevoli *et al.*, 2014; Tao-Cheng *et al.*, 2014; Martinez-Monedero *et al.*, 2016).

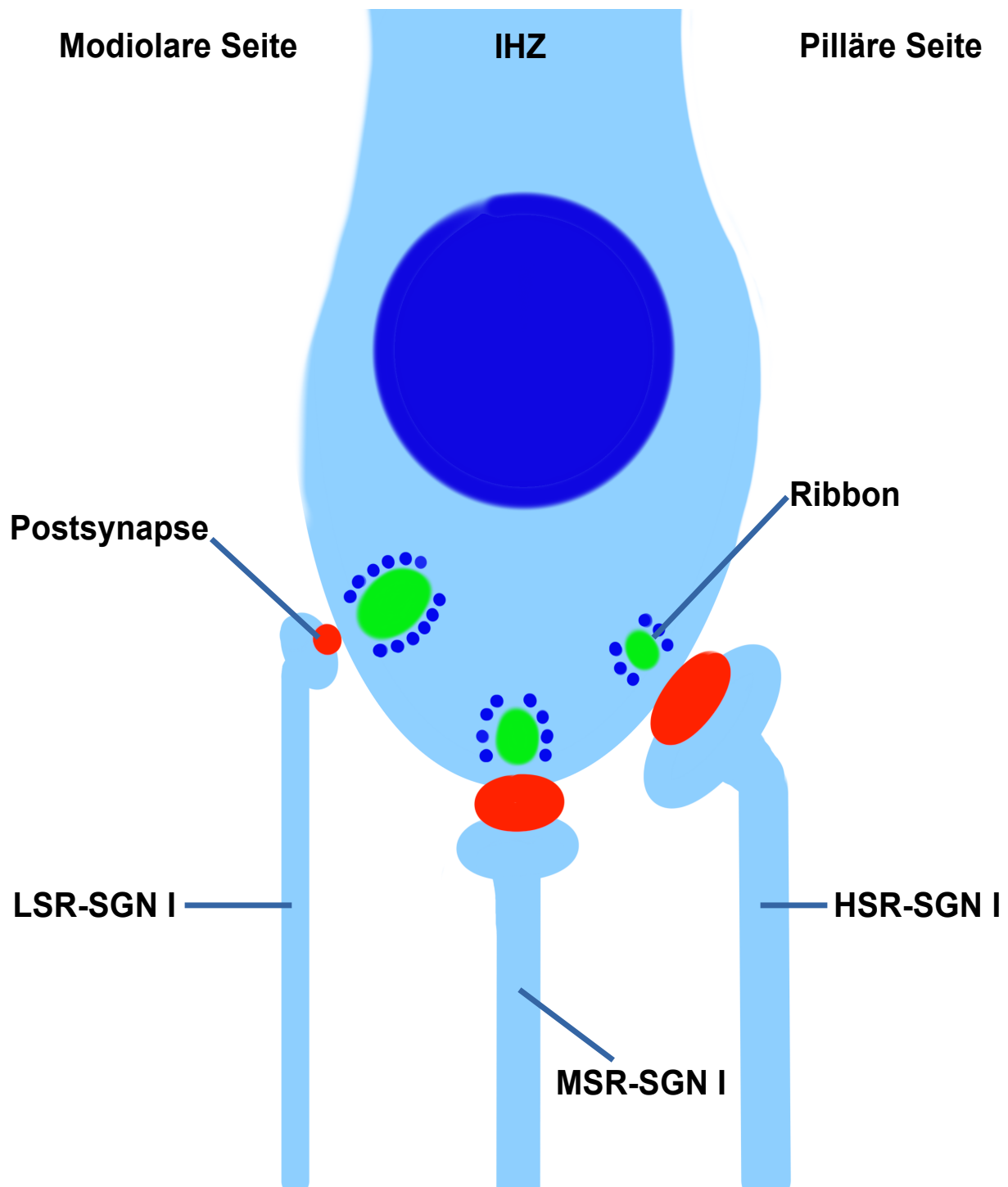
## 2.4 Subtypen von SGN vom Typ I

Eine IHZ wird je nach Spezies und Tonotopie von etwa 5-30 SGN Typ I innerviert (Sun *et al.*, 2018). Diese Nervenfasern unterscheiden sich in ihrer spontanen Aktionspotential-Frequenz und lassen sich aufgrund dessen in 3 verschiedene Gruppen einteilen (Abbildung 5).

Etwa 60 % der Fasern weisen eine hohe Spontanrate (high spontaneous rate, HSR) mit 18 - 100 Entladungen/s auf, 25 % eine mittlere Spontanrate (medium spontaneous rate, MSR) mit 0,5 - 18 Entladungen/s und 15 % eine niedrige (low spontaneous rate, LSR) mit < 0,5 Entladungen/s, wobei diese Daten an Katzen gemessen wurden (Liberman, 1982; Geisler, 1998). HSR-Fasern sind bereits bei geringen Schallintensitäten aktiv, wohingegen LSR-Fasern erst bei Schallintensitäten weit über der Hörschwelle eine erhöhte Aktivität aufweisen. Bei starken Hintergrundgeräuschen erreichen die HSR-Fasern einen Punkt maximaler Erregung, wohingegen bei LSR-Fasern dann einzelne, lautere Töne weiterhin eine Erregung verursachen, ein Mechanismus, der für das selektive Hören in lauter Umgebung unabdingbar ist (Costalupes, Young & Gibson, 1984). Auch bei anderen Säugern, wie z.B. Mäusen, wurde dieses Prinzip gefunden (Moser *et al.*, 2023). Anatomisch befinden sich die HSR- und MSR-Fasern überwiegend auf der pillären Seite der IHZ, LSR-Fasern vor allem auf der modiolen Seite (Liberman, 1982).

Histologisch zeigen die HSR- und MSR-Fasern einen größeren Durchmesser und enthalten mehr Mitochondrien als die LSR-Fasern; Faktoren, die eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Schalleinwirkungen erklären (Liberman, 1980, 1982; Szydlowska & Tymianski, 2010). Des Weiteren besitzen Synapsen einer HSR-Faser eine höhere Dichte an Glutamat-Rücktransportern (GLAST) (Furness & Lawton, 2003).

Molekularbiologisch lassen sich die SGN Typ I ebenfalls in 3 Subtypen, Ia, Ib und Ic, unterteilen. Sie unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von Ionenkanälen, Rezeptoren, synaptischen Proteinen und Adhäsionsmolekülen. Die anatomische Verteilung der SGN Ia, Ib und Ic entlang der Cochlea und an den IHZ (Nomenklatur nach Shrestha u. a. 2018) entspricht der der HSR-, MSR- und LSR-Fasern (Petitpré *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018).



**Abbildung 5: Fasertypen der afferenten Innervation der inneren Haarzelle**

Am basalen Pol der IHZ befinden sich die Synapsen der afferenten SGN I. Unterschieden werden Fasern mit hoher (HSR), mittlerer (MSR) und niedriger (LSR) spontaner Entladungsrates. HSR-SGN befinden sich auf der pillären Seite der IHZ (den ÄHZ zugewandt), LSR-SGN auf der dem Modiolus zugewandten. Der Zellkern der IHZ ist dunkelblau dargestellt. Abbildung nach Coate & Conant, 2018; Klinke, Silbernagl & Pape, 2010; Sun et al., 2018; Kujawa & Liberman, 2009.

## 2.5 Die Lärm-induzierte cochleäre Synaptopathie

Die Lärm-induzierte cochleäre Synaptopathie ist eine durch ein Schalltrauma mit moderater Schallintensität verursachte Hörstörung mit TTS, bei der ein erheblicher Anteil der Ribbonsynapsen der IZH irreversibel verloren geht, ohne eine permanente Hörschwellenerhöhung zu verursachen (Kujawa & Liberman, 2009; Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Shi *et al.*, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015).

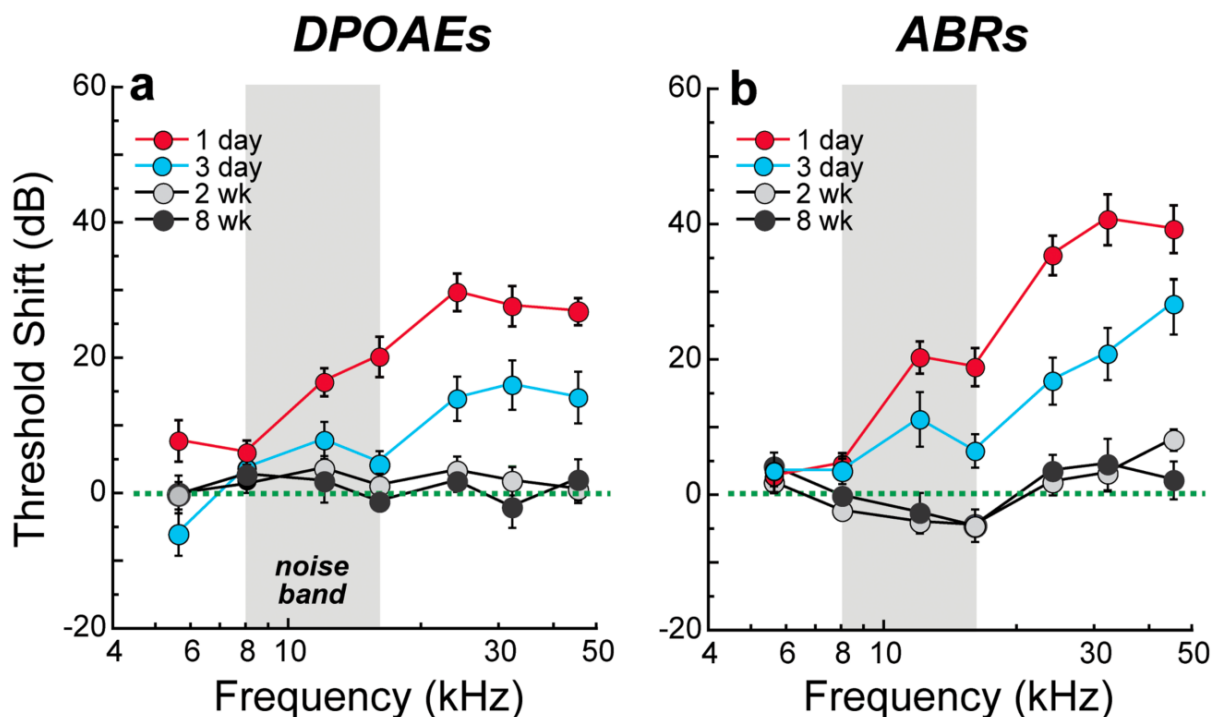
Am Mausmodell der Linie CBA/CaJ konnte gezeigt werden, dass eine initiale Erhöhung der Hörschwelle sich innerhalb von 15 Tagen vollständig zurückbildete (Abbildung 6b). Die TTS wurde auf einen temporären Verlust der ÄHZ-Funktion zurückgeführt und durch eine temporäre Verschlechterung der otoakustischen Emissionen (DPOAE), die die Aktivität der ÄHZ widerspiegeln, bestätigt (Abbildung 6.a, (Kujawa & Liberman, 2009). In weiteren Arbeiten konnte dieses Phänomen bestätigt werden (Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015; Hickox *et al.*, 2017; Liu, Stohl & Overath, 2024).

Analog zur TTS bei hohen Frequenzen wurde die Verminderung der Synapsenzahl maßgeblich in der basalen Hälfte der Cochlea, der für hohe Frequenzen verantwortlichen Regionen nachgewiesen (Kujawa & Liberman, 2009; Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Shi *et al.*, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015) (Abbildung 7). Zusätzlich traten gehäuft ungepaarte Präsynapsen auf, also Ribbons, denen keine postsynaptische Hörnervenfasern zugeordnet werden konnte (Lin *et al.*, 2011).

Der irreversible Verlust von Nervenfasern und Ribbonsynapsen ohne permanente Verschlechterung der Hörschwelle lässt darauf schließen, dass durch das moderate Schalltrauma solche afferenten Hörnervenfasern nicht mehr funktionieren, die *nicht* die Hörschwelle bestimmen. Die einen, noch intakten, sind verantwortlich für die Hörschwelle, weshalb diese keinen permanenten Schaden aufweist. LSR-Fasern besitzen eine im Vergleich zu HSR- und MSR-Fasern höhere Erregungsschwelle (Liberman & Kujawa, 2017; Moser *et al.*, 2023) und somit scheint der Verlust der Nervenfasern vor allem die LSR-Fasern zu betreffen (Furman, Kujawa & Liberman, 2013).

Noch ungeklärt ist der genaue Ablauf der synaptischen Schädigung und Degeneration: ob die Ribbons erst nach der Synapsentrennung zugrunde gehen oder der Ribbonverlust die Ursache für die Trennung ist. Eine mögliche Hypothese ist die der toxischen Wirkung der verstärkten Glutamat-Exozytose (Pujol & Puel, 1999; Kujawa & Liberman, 2009). Durch die dauerhafte Schallexposition über 2 h kommt es zu einer kontinuierlichen Exozytose der Glutamat-Vesikel in den synaptischen Spalt. Die Folge ist eine dauerhafte Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren mit Depolarisation der Nervenzelle. Eine der nachweisbaren Folgen einer solchen Exozytose ist das Anschwellen der Postsynapse und zusätzlich, bei hohen Schallintensitäten, eine Lösung der synaptischen

Verbindung (Pujol & Puel, 1999). Dass die Schwellung durch Glutamat ausgelöst wurde, konnte auch ohne Schalltrauma durch Zugabe des Neurotransmitters nachgewiesen werden (Liberman, Suzuki & Liberman, 2015), weshalb dem Mechanismus der Exzitotoxizität eine wichtige Rolle zukommt. Neben der möglichen Lösung der Synapse (Pujol & Puel, 1999) wurde auch eine protektive Verringerung der Glutamat-Rezeptoren der Postsynapse beobachtet, wodurch der Schaden durch die übermäßige Erregung der SGN verringert werden konnte. Ein Verlust von 40 % der GluA2-Rezeptoren konnte nach dem Schalltrauma an CBA/CaJ-Mäusen nachgewiesen werden (Liberman, Suzuki & Liberman, 2015).

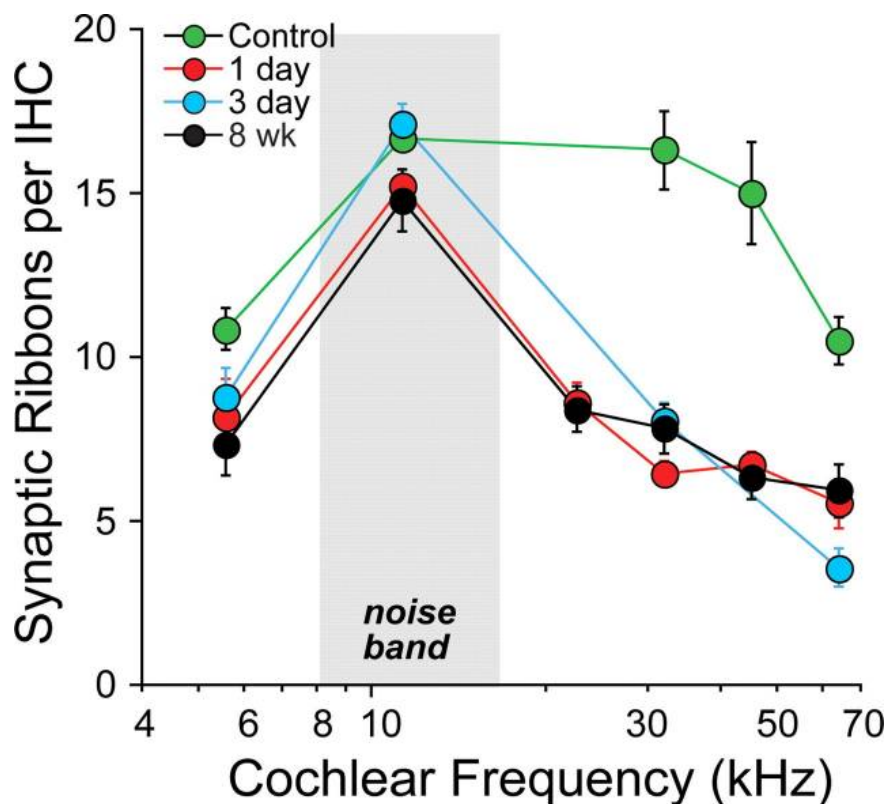


**Abbildung 6: Temporäre Schwellenerhöhung von ABRs und DPOAEs infolge eines moderaten Schalltraumas von 100 dB SPL.**

*a*, Ergebnisse der otoakustischen Emissionen (DPOAE) und *b*, der ABR-Messungen 1 Tag nach (rot), 3 Tage nach (blau), 2 Wochen nach (grau) und 8 Wochen nach dem Schalltrauma (schwarz). Als Referenzwerte sind die Daten von Kontrolltieren als Nulllinie dargestellt (grün gestrichelte Linie). Man erkennt unmittelbar nach dem Schalltrauma eine Erhöhung der Hörschwelle um bis zu 40 dB und der Schwelle für DPOAEs um bis zu 30 dB, die sich bereits nach 2 Wochen zurückbildet. Abbildung aus Kujawa & Liberman, 2009.

Die Diskrepanz zwischen einem Verlust von bis zu 40 % der Ribbons und einer dennoch fast intakten Hörschwelle wird mit der Hypothese begründet, dass die zugrunde gegangenen Synapsen zu den LSR-Fasern gehören (Kujawa & Liberman, 2009; Furman, Kujawa & Liberman, 2013), da diese eine hohe Erregungsschwelle haben und nur bei höheren Schallintensitäten erregt werden. Funktionell übertragen LSR-Fasern erst bei höheren Schallpegeln Informationen zum zentralen Nervensystem, während die Nervenfasern mit niedriger Erregungsschwelle, die für die

Hörschwelle und relativ niedrige Pegel verantwortlich sind (Costalupes, Young & Gibson, 1984), bereits vollständig gesättigt sind. Anhand dessen kann in der Hörbahn eine Filterung bestimmter akustischer Signale in Umgebung mit lauten Störgeräuschen erfolgen (Bakay *et al.*, 2018). Kujawa und Liberman (2009) zeigten einen 40%igen Verlust der Amplitude der ABR-Welle I und postulierten, dass dieser Anteil den LSR-Fasern entspricht (Kujawa & Liberman, 2009). Nach neueren molekularbiologischen Analysen gibt es Hinweise auf ein Verhältnis von Ia (HSR) : Ib (MSR) : Ic (LSR) ca 50 % : 25 % : 25 %, so dass nicht nur LSR-Fasern betroffen sein konnten (Petitpré *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018).



**Abbildung 7: Reduzierte Anzahl von Ribbons infolge eines Schalltraumas von 100 dB SPL im midbasalen und basalen Bereich der Cochlea.**

Anzahl der präsynaptischen Ribbons bei Kontrolltieren ohne Schalltrauma (grün), 1 Tag nach (rot), 3 Tage nach (blau) und 8 Wochen nach dem Schalltrauma (schwarz). Durch das 100 dB SPL Schalltrauma kam es zu einer Verminderung der Präsynapsenzahl im hochfrequenten Bereich, z.B. um über 40 % bei 32 kHz. Abbildung aus Kujawa & Liberman, 2009.

Es stellt sich die Frage, warum die LSR-Fasern anfälliger sind als die HSR-Fasern. Eine erste Hypothese ist, dass der Abtransport des beim Trauma erhöht vorkommenden, toxischen Glutamats in den LSR-Synapsen vermindert ist. Ursächlich hierfür scheint die geringere Ausprägung des Glutamat-Rücktransporters an der zum Modiolus zugewandten Seite der IHZ zu sein, an der auch die LSR-Fasern überwiegend lokalisiert sind (Furness & Lawton, 2003). Bestätigt wird dies durch

Versuche an Mäusen mit einem Glutamat-Rücktransporter(GLAST)-Mangel. Nach akustischer Überstimulation wurde an GLAST-Knock-Out-Mäusen eine deutlich ausgeprägtere Hörschwellensteigerung nachgewiesen als an Wildtypen mit intakter GLAST-Funktion (Hakuba *et al.*, 2000). Der Rücktransport des Glutamats und die davon abhängige Konzentration im synaptischen Spalt scheint also eine entscheidende Rolle zu spielen, was mit der Hypothese der Exzitotoxizität vereinbar wäre. In Vglut3-(Glutamat-Transporter 3-) Knock-Out Mäusen, bei denen die synaptischen Vesikel nicht mit Glutamat befüllt werden können, wurde nach Schalltrauma kein signifikanter Synapsenverlust beobachtet (Kim *et al.*, 2019), was ebenfalls die Rolle der Exzitotoxizität durch Glutamat unterstreicht.

Eine zweiter Grund ist, dass LSR-Fasern weniger Mitochondrien besitzen und daher schneller in ein Energiedefizit fallen (Lieberman, Wang & Liberman, 2011). Eine weitere wichtige Funktion der Mitochondrien ist das Puffern des enormen Einstroms von Calcium-Ionen und die Energiebereitstellung für das Herauspumpen der Calcium-Ionen bei einer dauerhaften Depolarisation und Exozytose der IHZ. Bei einer geringeren Anzahl an Mitochondrien sind schädliche Effekte einer hohen intrazellulären Calciumkonzentration schneller zu erwarten (Szydłowska & Tymianski, 2010).

## 2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

In der Arbeitsgruppe stehen genetisch modifizierte Mäuse mit Veränderungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanälen oder synaptischen Proteinen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6N zur Verfügung. Zwar zeigt diese Linie ein früheres Auftreten von Altersschwerhörigkeit mit Beginn von sensorineuraler Schwerhörigkeit im Hochfrequenz-Bereich ab 3 Monaten (Kane *et al.*, 2012; Jeng *et al.*, 2020), der Hintergrund der C57BL/6N-Linie wurde jedoch sehr häufig für die Generierung von Knock-Out- oder Knock-In-Mäusen benutzt (Mianné *et al.*, 2016). Um die Erforschung der cochleären Synaptopathie bei diesen genetisch modifizierten Mausstämmen zu ermöglichen, müssen zunächst die an CBA/CaJ-Mäusen durchgeführten Experimente an C57BL/6N-Mäuse reproduziert und die Ergebnisse verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden in dieser Studie die Versuche an Tieren des C57BL/6N-Stamms durchgeführt. Zusätzlich zu den 2 h Schalleexposition mit einem 100 dB SPL Schalltrauma wurden die Auswirkung einer Erhöhung der Schallintensität auf 106 und 112 dB SPL untersucht. Vertäubungen sowie ABR-Messungen, die die Hörschwelle und die Funktion der Hörbahn überprüfen, wurden von Philip Derleder, Philipp Fischer und Pauline Schepsky durchgeführt.

Die Zielstellungen dieser Arbeit waren:

1. Etablierung eines immunhistochemischen Färbeprotokolls für whole-mount-Präparate für die Markierung von Präsynapsen (Ribbons) und Postsynapsen an den IHZ von 3 Monate alten C57BL/6N-Mäusen ohne oder mit Vertäubung im Alter von 8 Wochen
2. Durchführung der Cochlea-Präparation und immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung mit anti-CtBP2/Ribeye und anti-Homer1 für Kontrolltiere und Tiere 4 Wochen nach Schalltrauma mit einer Stärke von 100 dB SPL, 106 dB SPL oder 112 dB SPL
3. Aufnahme von hochaufgelösten Bildstapeln der immungefärbten Präparate aus allen Cochlea-Regionen (apikal, medial, midbasal und basal) am Laserscanningmikroskop LSM 710
4. Bildauswertung und
5. statistische Analyse der Zahl und Größe der Prä- und Postsynapsen sowie der Anzahl ungepaarter Prä- und Postsynapsen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Versuchstiere**

Die Haltung der Versuchstiere verlief im Rahmen der Vorgaben des Tierschutzgesetzes und der Auflagen der Veterinärbehörde des Saarlandes. Verwendet wurden Tiere aus dem Mausstamm C57Bl/6N (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) oder Wildtyp-Tiere verschiedener Knock-Out-Linien, die mehr als 7 Generationen auf diesem genetischen Hintergrund gezüchtet wurden. Die Mäuse waren in der Versuchstierhaltung des CIPMM untergebracht, wurden in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum.

### **3.2 ABR-Messungen und Schalltrauma**

Zur Bestimmung von Hörschwellen und anderen Parametern wurden Ableitungen akustisch evozierter Hirnstammpotenziale der Hörbahn (ABR-Ableitungen) durchgeführt (Maurer, Lang & Eckert, 2005). In einer klassischen Hirnstammableitung lassen sich mehrere Wellen erkennen und zeitlich bestimmten Bereichen der Hörbahn zuordnen (Murillo-Cuesta *et al.*, 2012). Durch Variation der Schalldruckpegel der verwendeten Reize (entweder ein breitbandiger Klick-Reiz bei der Klick-ABR oder ein Ton einer bestimmten Frequenz bei der f-ABR) können Hörschwellen bestimmt werden, genauer gesagt die Klick-Hörschwelle oder eine frequenzabhängige Hörschwelle. Die Variation der Frequenzen führt zu einer frequenzabhängigen Hörschwellenkurve, dem Audiogramm.

Für das Schalltrauma wurden die Tiere im Alter von 46 bis 56 Tagen unter Narkose für die Dauer von 2 h einer Schallquelle ausgesetzt (Tag 0). Die Vertäubungen wurden mit einem weißen Rauschen im Frequenzband von 8 – 16 kHz und Schallpegeln von 100, 106 oder 112 dB SPL für 2 h durchgeführt. Initiale ABR-Messungen erfolgten 2 Tage vor dem Schalltrauma (Tag -2). Eine vierte Gruppe mit 4 Versuchstieren diente als Kontrollgruppe, bei der lediglich eine initiale und eine finale ABR-Messung am Tag 28 (ohne vorangegangenes Schalltrauma) durchgeführt wurde.

Im Anschluss an das Schalltrauma wurden ABR-Messungen an den Tagen 0, 1, 2, 5, 7, 14, 21, 28 durchgeführt.

Aus den ABR-Messungen wurden nicht nur Hörschwellen bestimmt. Untersucht wurden auch Latenzen der ABR-Wellen, was Aussagen über die Leitungsgeschwindigkeit ermöglicht, sowie Amplituden, welche als Summe aller Aktionspotenziale bei einer Veränderung der Nervenfasernzahl Veränderungen aufweisen.

Die Versuchstiere waren während der Schallexposition und aller ABR-Messungen durch 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-hameln®, 50 µg/ml, Hameln Pharma Plus GmbH), 5 mg/kg Midazolam (Midazolam-hameln®, 5 mg/ml, Hameln Pharma Plus GmbH) und Medetomidin (Domiton®, 1 mg/ml, Orion Corporation) narkotisiert.

Das Schalltrauma und die ABR-Messungen bei den 106 und 112 dB SPL-Versuchsgruppen wurden von Philip Derleder, ebenfalls medizinischer Doktorand am CIPMM in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jutta Engel, durchgeführt (Derleder, eingereicht). Weitere Informationen zu den verwendeten Versuchstieren, Durchführung von Narkose, Vertäubung und Hörschwellenmessung sind in seiner Dissertation sowie in (Blum *et al.*, 2024) zu finden.

Die Tiere mit dem 100 dB SPL-Schalltrauma sind Teil einer anderen Versuchsreihe, die von Pauline Schepsky durchgeführt wurde (Schepsky, 2023). Da Teile der Präparation, immunhistochemischen Färbung, Mikroskopie und Auswertung von mir durchgeführt wurden, werden die Ergebnisse hier ergänzend gezeigt.

### **3.3 Töten der Versuchstiere und Entnahme der Cochlea**

Im Alter von etwa 11 Wochen, am 28. Tag nach der Vertäubung, wurden die Tiere nach der letzten ABR-Messung getötet und histologisch untersucht. Für jede Versuchsbedingung bzw. Kontrolle wurden beide Ohren von jeweils 4 Tieren verwendet. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts genutzt. Befanden sich die Tiere von der letzten ABR noch in Narkose, so wurde bis zum Töten der Mäuse für einen ausreichenden Wärmeerhalt mittels Infrarot-Lampe gesorgt, um Unterkühlung des Tieres durch den Ausfall der Thermoregulation zu vermeiden. Befanden sich die Tiere wieder im Wachzustand, wurden sie mit Isofluran Forene (AbbVie) narkotisiert. Durch zervikale Dislokation wurde eine fachgerechte Euthanasie der Versuchstiere durch eine hierfür befugte Person durchgeführt. Nach Abtrennen des Kopfes mit einer Schere wurde der Schädel mit einer kleinen Schere über das Foramen magnum sagittalisiert. Nach Entfernen der Kopfhaut, Kopfmuskulatur und der Ohrmuscheln konnten die Schädelhälften auseinandergespreizt werden. Mit einer Pinzette wurde das Gehirn entfernt, wodurch das Felsenbein sichtbar wurde. Mit einem Finger und einer Pinzette ließ sich das Innenohr mit der Cochlea und dem Vestibularorgan entlang der Knochennähte heraushebeln. Die Cochlea wurde in eine kleine Petrischale mit einer selbst hergestellten eiskalten physiologischen Lösung (305 mOsmol, pH-Wert 7,35, Zusammensetzung: NaCl 143 mM; KCl 5,8 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,9 mM, Glukose 5,6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 mM, Hepes 10 mM, alle Chemikalien Sigma-Aldrich) überführt. Diese Lösung ähnelt der Perilymphe und diente dem kurzfristigen Erhalt der Zellen.

### **3.4 Fixierung und Präparation des Corti-Organ**

Unter einem Olympus SZX16-Stereomikroskop wurde die Cochlea in 2- bis 6-facher Vergrößerung präpariert. Zuerst wurde die Cochlea von Bindegewebe und Nervenfasernresten gesäubert und das runde Fenster dargestellt. Mit einer Kanüle wurde ein kleines Loch in die apikale Spitze der Cochlea gebrochen und diese in eine kleine Petrischale mit eiskaltem Zambonis Fixans (Morphisto, Artikel-Nr.: 12773) gelegt. Diese Fixierungslösung besteht aus Paraformaldehyd (PFA), Phosphate Buffered Saline (PBS), Pikrinsäure, Natronlauge (NaOH) und destilliertem Wasser. Mithilfe einer 1 ml-Spritze und einer 0,2 mm-Kanüle wurde das Fixans vorsichtig in das runde Fenster gespritzt. Die Lösung durchspülte die Cochlea und konnte sie über das Loch in der Spitze der Cochlea verlassen. Nach 30 Minuten Einwirkzeit war das Gewebe fixiert und die Cochlea wurde in eine Petrischale mit PBS (Gibco, Artikel.-Nr.: 189-12-014, Lot-Nr.: 1755496) gegeben, wo diese mit dem gleichen Vorgehen wieder mit PBS durchgespült wurde.

Zum Präparieren wurde nun mithilfe einer feinen Pinzette der Knochen der Cochlea, beginnend am Loch in der Spitze der Hörschnecke, unter Schonung des Corti-Organ entfernt. Im Bereich der basalen Windung wurde nun das Corti-Organ am Modiolus vom Vestibularorgan entfernt. Das Corti-Organ wurde etwa mittig in einen apikal-medialen und einen midbasal-basalen Part geteilt. Anschließend wurden die Reste des Modiolus und des Spiralganglions sowie die Tektorialmembran entfernt. Bei der Präparation musste darauf geachtet werden, die Außenränder der Windungen, an denen sich die ÄHZ befinden, bestmöglich zu schonen.

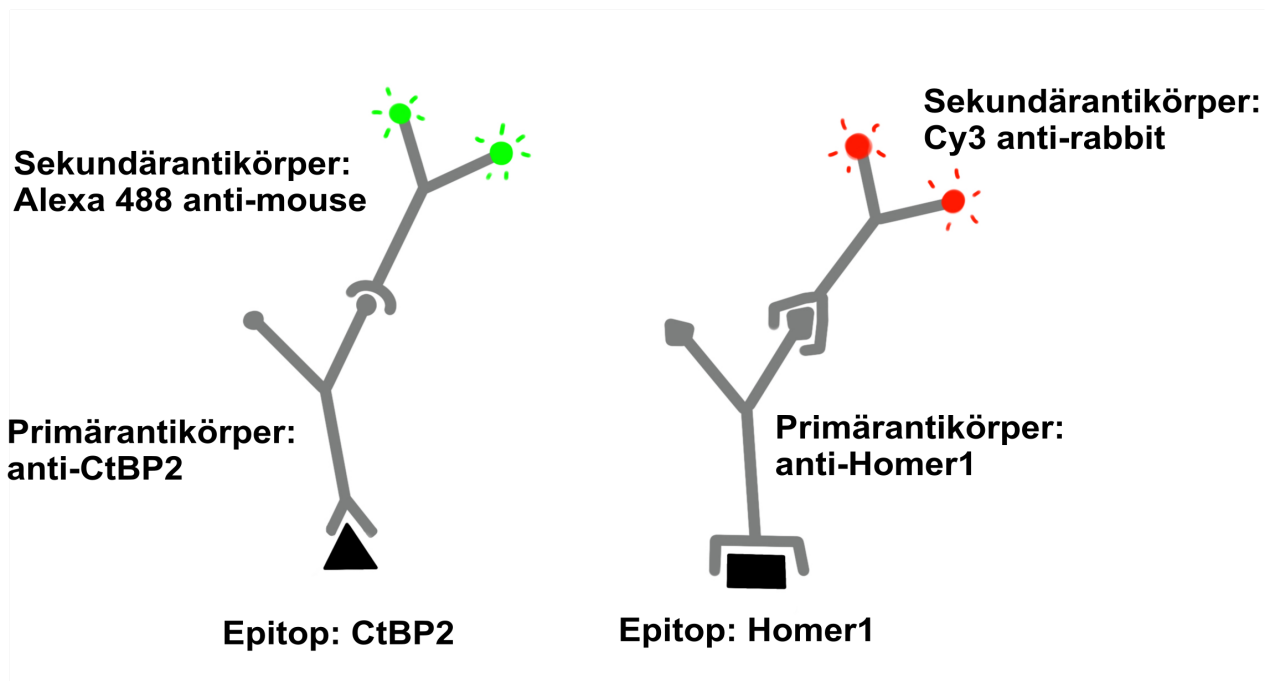
Die Präparate wurden mithilfe eines Mikrolöffels unter mikroskopischer Kontrolle auf Objektträger übertragen. Auf diese war zuvor mit einem Immuno-Pen (EMD Milipore Corp., Artikel-Nr.: 402176-1, Lot-Nr.: 3054588) ein hydrophober Ring aufgetragen worden. Dieser verhinderte ein Verlaufen der Puffer auf dem Objektträger.

Für die folgende immunhistochemische Färbung der Präparate wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt, um die Proben vor Licht zu schützen und das Verdunsten der Puffer zu verhindern.

### **3.5 Immunhistochemische Färbung der Präparate**

Zur Darstellung der prä- und postsynaptischen Strukturen wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mithilfe von spezifischen Antikörpern angewandt (Im *et al.*, 2019). Bei dieser Methode binden Primärantikörper einer bestimmten Spezies an eine Zielstruktur (Epitop). Sekundärantikörper, die gegen Primärantikörper dieser Spezies gerichtet sind, können an die Primärantikörper binden und enthalten einen Fluoreszenzfarbstoff der mithilfe von Anregung durch Licht bestimmter Wellenlängen sichtbar gemacht werden kann. Da ungebundene Primär- und

Sekundärantikörper ausgewaschen werden, sind am Ende nur die Zielstrukturen der Primärantikörper markiert (Abbildung 8). Für die Präsynapse wurde ein Antikörper gegen das C-terminale Binding Protein 2 (CtBP2) der Ribbons (Schmitz, Königstorfer & Südhof, 2000; Jean *et al.*, 2018) verwendet und für die Postsynapse ein Antikörper gegen Homer1, ein Strukturprotein der Postsynapse (Ehrengruber *et al.*, 2004; Tao-Cheng *et al.*, 2014). Sekundärantikörper waren Alexa 488-donkey bzw goat anti-mouse, die gegen den Maus-Anti-CtBP2-Antikörper gerichtet sind und Cy3-goat anti-rabbit, der gegen den Kaninchen-Anti-Homer1-Antikörper gerichtet ist. (vgl. Tabelle 1).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung.** Die Epitope der Prä- (CtBP2) und Postsynapse (Homer1) sind Bindungspartner der spezifischen Primärantikörper anti-CtBP2 und anti-Homer1. Die Primärantikörper werden durch speziesspezifische Sekundärantikörper gebunden. Anti-CtBP2 ist ein Maus-Antikörper, an den viele anti-mouse IgG-Sekundärantikörper binden, während an den Kaninchen-Antikörper anti-Homer1 viele anti-rabbit IgG-Sekundärantikörper binden. Beide Sekundärantikörper sind mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Alexa 488 und Cy3) markiert, die in der Laserscanmikroskopie durch Anregung mit Licht spezifischer Wellenlängen zur Emission von Fluoreszenzlicht gebracht werden können. Abbildung nach Im *et al.*, 2019.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper**

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikel-Nr</b>	<b>Lot-Nr</b>
Primär-antikörper	anti-Homer1	Kaninchen	1:1000	Synaptic Systems	160003	1-39
	anti-CtBP2	Maus	1:500	Becton Dickson	612044	2111738
Sekundär-antikörper	Cy3 anti-rabbit	Ziege	1:1500	Jackson Immuno Research	1111660460	94213
	Alexa488 anti-mouse	Ziege	1:500	Thermo Fisher	A11001	774904
		Esel			A21202	1975519

Die für die Immunhistochemie verwendeten Puffer bestanden aus PBS (Gibco, Artikel Nr.: 189-12-014, Lot-Nr.: 1755496), BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Artikel-Nr.: A3912-10G, Lot-Nr.: SLBW9829/SLBW4141) und Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Artikel-Nr.:T8787, Lot-Nr.: MKBH7028V). Das Reaktionsvolumen in diesem und allen folgenden Schritten betrug 50 µl. Begonnen wurde mit dem Block- und Permeabilisierungspuffer (BPP, 0,5 % Triton X, 3 % BSA in PBS). Durch das BSA wurden unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert, um unspezifische Signale durch gebundene Antikörper zu vermeiden. Durch die Permeabilisierung mittels Triton X wurde die Zellmembran durchlässig für Antikörper. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde der BPP wieder abpipettiert und es folgte die Inkubation der Primärantikörper in Reaktionspuffer (RP, 0,2 % Triton X, 3 % BSA in PBS) über Nacht bei 4°C.

Zum Auswaschen der Primärantikörper diente der Waschpuffer (WP, 0,1 % Triton X in PBS). Nach zwei Waschschritten zu je 15 Minuten bei Raumtemperatur waren alle nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen und der Waschpuffer wurde entfernt. Die Inkubationszeit der Sekundärantikörper in RP betrug 70 Minuten und erfolgte bei Raumtemperatur. Es erfolgen wieder zwei 15-minütige Waschschrritte. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI (1:333 in PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Artikel-Nr.: D9542, Lot-Nr.: 097M4085V) für sechs Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und danach dreimal mit PBS gewaschen.

Die Präparate wurden unter dem Mikroskop sorgfältig auf dem Objektträger platziert. Während die tonotope Orientierung des apikal-medialen Präparats aufgrund des Helicotremas eindeutig war, musste beim midbasal-basalen Präparat darauf geachtet werden, dass das basale Ende des Präparates in Richtung der unteren waagerechten Kante des Objektträgers ausgerichtet wurde, damit die tonotope Orientierung nach dem Eindeckeln noch erkennbar war. Die Präparate wurden mit Vectashield H1000 (Vector Laboratories, Artikel-Nr.: VEC H 1000, Lot-Nr.: ZD0515C) eingedeckelt und bis zur Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop in einer Objektträgermappe im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.6 Laserscan-Mikroskopie

Mithilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops, LSM 710 (Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt. Für die Übersichtsaufnahmen der Cochlea-Präparate wurde ein Plan-Apochromat 20x/0.8-Objektiv (Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und für die Detailaufnahmen ein Plan-Apochromat 63x/1.40 oil DIC M27-Objektiv (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Als Immersionsöl wurde Immersol 518 F und als Aufnahmeprogramm wurde ZEN 2012 SP1, Version 8.1.10.484 (Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) verwendet.

Die Übersichtsaufnahmen, die der späteren Zuordnung der Frequenzbereiche dienten, wurden mit einer Bildgröße von 1024x1024 Pixeln (606,69  $\mu\text{m}$  x 606,69  $\mu\text{m}$ ) erstellt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Detailaufnahmen mit derselben Größe von 948x546 Pixeln (64,26  $\mu\text{m}$  x 37,01  $\mu\text{m}$ ) aufgenommen, wobei jedes Pixel 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$  maß. Dieser Bildausschnitt umfasste einen Bereich mit etwa 8 IZH. Nach der Definition von zwei Ebenen in z-Richtung, die den synaptischen Pol der IZH einschlossen, wurden automatische z-Stapel mit einem z-Abstand von 0,32  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Jede Aufnahme wurde mit gleicher Laserstärke und angepassten Verstärkereinstellungen für eine optimale Signalstärke aufgenommen. Nach diesem Schema wurden alle Bereiche mit relevanten Signalen auf einem Objektträger gescannt. Zu jeder Detailaufnahme wurde anhand des Winkels der Ausrichtung des Scanbereiches notiert, an welcher Stelle der entsprechenden Übersichtsaufnahme man sich befand, um die Detailbilder nach der Auswertung einem bestimmten Frequenzbereich zuordnen zu können.

### 3.7 Quantifizierung der Fluoreszenzsignale

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Open Source Programm FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Zunächst wurden die unterschiedlichen z-Ebenen einer Aufnahme als Maximum Intensity Projection (MIP) überlagert dargestellt. Diese MIP konnte nun noch zurechtgeschnitten werden, um evtl. unspezifische Hintergrundfärbung im Bereich der Kutikularplatten zu entfernen.

Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale von Ribbons und Postsynapsen erfolgte automatisch mithilfe eines Makros, das von Dr. Stefan Münkner erstellt wurde und die Particle Analysis Funktion in Fiji nutzt (Fell *et al.*, 2016). Das Makro zählte und vermaß die Signale und erstellte eine Tabelle mit Einzelwerten zu jedem Signal sowie eine Datei, die alle Signale mittelte und zusammenfasste. Die so ermittelten Werte bildeten den Ausgangspunkt für die statistische Untersuchung der Daten. Diese Analyse wurde für den ersten Kanal, welcher Homer1 und die Postsynapse repräsentierte und für den zweiten Kanal mit CtBP2 für die Präsynapse getrennt durchgeführt. Durch das Makro

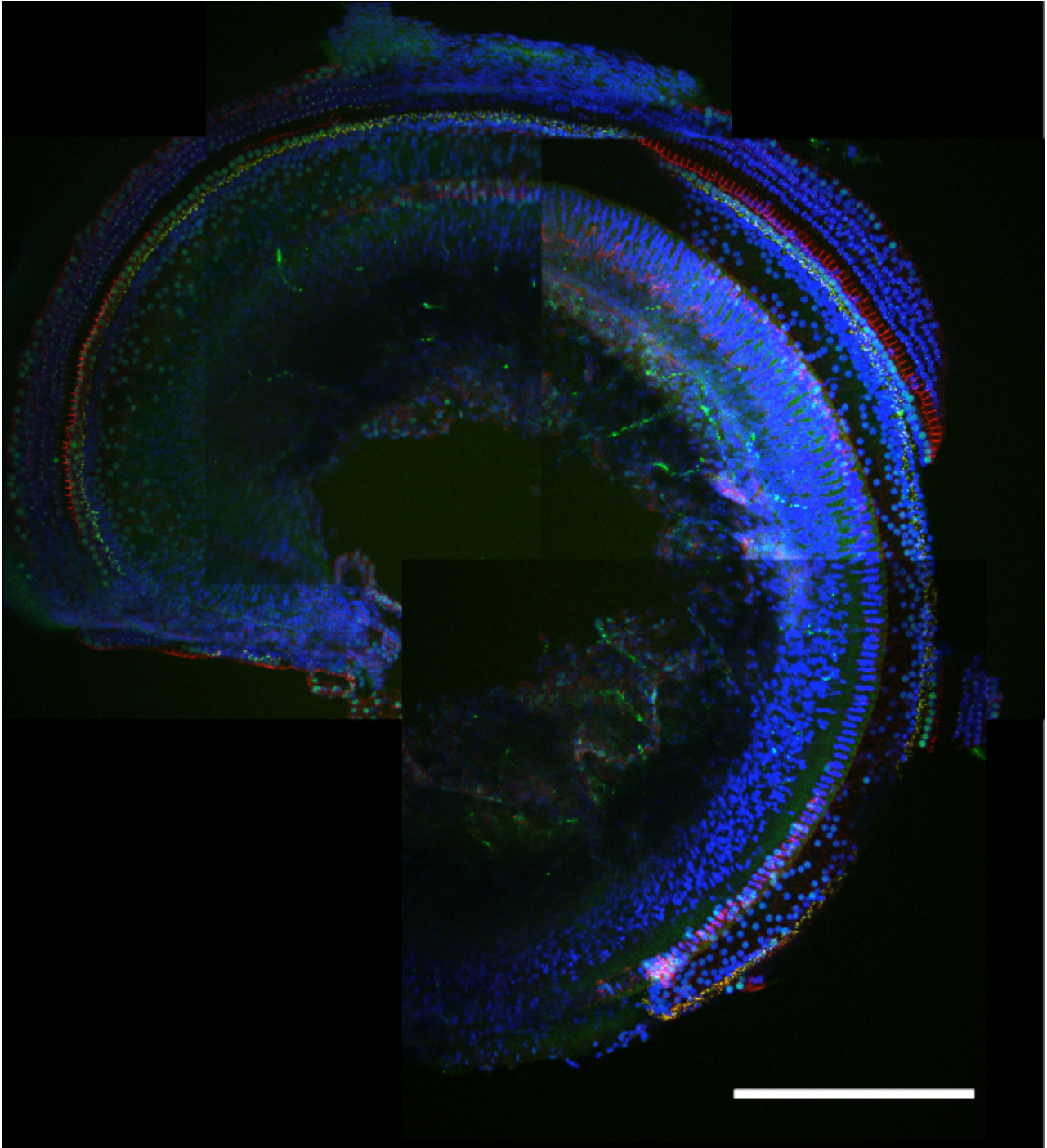
bestimmte relevante Größen waren die Anzahl und die Größe der Signale. Zur besseren Vergleichbarkeit und Übersicht wurden die Daten auf eine IHz normiert.

Die im Makro verwendeten Analyseparameter gestalteten sich wie folgt: die Mindestfläche, die ein Signal haben musste, betrug für alle Aufnahmen und beide Bildkanäle  $0.05 \mu\text{m}^2$ . Für die Subtraktion des Hintergrundes wurde das Instrument „rolling ball diameter“ mit einem Durchmesser von  $5 \mu\text{m}$  benutzt. Die Messschwelle definierte, ab welcher Intensität ein Signal vom Makro gezählt und ausgewertet wurde. Aufgrund von Überlagerungen durch Stützzellen, Bindegewebe und Knochen (Lamina spiralis) konnte die Intensität der Aufnahmen variieren. Aus diesem Grund wurde die Messschwelle individuell für jeden Kanal jeder Aufnahme angepasst. Die verwendeten Messschwellen reichten von 5 % bis 16 % für Homer1 und von 6 % bis 16 % für CtBP2.

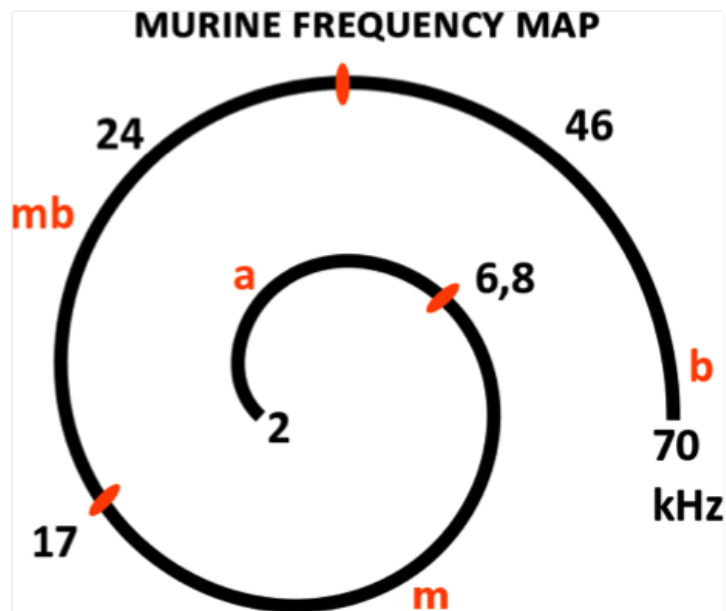
Da das Makro lediglich die Anzahl der Signale zählte und nicht ermitteln konnte, ob ein präsynaptisches Signal auch ein zugehöriges postsynaptisches hatte, wurden paarlose Prä- bzw. Postsynapsen manuell gezählt. Um die Objektivität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Benennung der Bilddateien vor der Zählung verblindet.

### **3.8 Zuordnung der Aufnahmen zu einem Frequenzbereich**

Der bei der cochleären Synaptopathie beobachtete Schaden manifestiert sich überwiegend in den hochfrequenten Abschnitten der Cochlea. Aus diesem Grund war eine genaue Zuordnung der Detailaufnahme zu einem Frequenzbereich notwendig. Anhand der Übersichtsaufnahmen bei der 20x Vergrößerung (Abbildung 9) und einer „Frequenzkarte“ der Cochlea (Abbildung 10, modifiziert nach (Müller *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2006) wurden die Daten den apikalen (4,7 bis 6,8 kHz), medialen (6,8 bis etwa 17 kHz), midbasalen (17 bis etwa 32 kHz) und basalen (ab 32 kHz) Frequenzbereichen zugeordnet und dann innerhalb dieser Einteilung auf signifikante Unterschiede untersucht.



**Abbildung 9: Zusammengesetzte Übersichtsaufnahme der apikalen Hälfte einer Cochlea.**  
*Übersichtsaufnahme der apikalen Cochlea-Hälfte in 20x Vergrößerung. Sie dient dem Abgleich mit der Frequenzkarte und der Zuordnung der Detailaufnahmen zu einem Frequenzbereich. Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .*



**Abbildung 10: Tonotope Organisation der Cochlea.**

Schematische Darstellung der Windungen der Cochlea mit dem frequenzspezifischen Ort und verwendeten Ortsbezeichnungen. a=apikale Windung, m=mediale Windung, mb=midbasale Windung und b=basale Windung. Abbildung modifiziert nach Müller et al., 2005b; Engel et al., 2006.

**3.9 Verwendete Daten**

Für jede Versuchsbedingung (Kontrolle, unterschiedliche Schalltraumata) wurden einheitlich 2 Tage vor und 28 Tage nach Schalltrauma elektrophysiologische ABR-Messungen durchgeführt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Anzahl der Ohren der hierbei verwendeten Tiere. Nach den letzten ABR-Messungen wurden ein Teil der Tiere für die Immunfluoreszenzversuche getötet, die cochleären Regionen präpariert, immunhistochemisch markiert und mit dem Laserscanmikroskop aufgenommen. Da das basale Ende der Cochlea extrem schwer unter Erhalt der Haarzellen zu präparieren ist, ist die Anzahl an verwertbaren Aufnahmen im basalen Bereich geringer als in den anderen Regionen. Tabelle 3 zeigt zusammenfassend die Anzahl der Aufnahmen, der IHZ und der Prä- und Postsynapsen für alle Regionen und Versuchsbedingungen.

**Tabelle 2: Übersicht über die für die statistische Auswertung der Hörschwellen- und ABR-Messungen verwendeten Datenmengen**

*Anzahl untersuchter Ohren der Kontrollgruppe und der Traumagruppen*

Versuchsgruppe	Anzahl Ohren Tag -2	Anzahl Ohren Tag 0	Anzahl Ohren Tag 28
Kontrolle	14	0	14
100 dB SPL	18	16	16
106 dB SPL	39	39	37
112 dB SPL	20	20	20

**Tabelle 3: Übersicht über die für die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen verwendeten Daten**

*Die jeweiligen Anzahlen sind für jedes Schalltrauma und nach cochleärer Lokalisation geordnet. Die Zahl der Aufnahmen bezieht sich auf jeweils eine Gruppe von etwa 8 IHz.*

Lokalisation und Schalltrauma	Aufnahmen (Anzahl Tiere)	IHz gesamt	Präsynapsen gesamt	Postsynapsen gesamt
Kontrolle apikal	19 (4)	148	2386	2556
100 dB SPL apikal	8 (4)	64	1173	1200
106 dB SPL apikal	18 (4)	144	2324	2382
112 dB SPL apikal	46 (4)	368	6186	6505
Kontrolle medial	37 (4)	295	5169	5242
100 dB SPL medial	10 (4)	77	1133	1331
106 dB SPL medial	33 (4)	261	4237	4575
112 dB SPL medial	51 (4)	390	5851	6829
Kontrolle midbasal	82 (4)	650	11124	11240
100 dB SPL midbasal	15 (4)	120	1252	1681
106 dB SPL midbasal	64 (4)	498	5068	6750
112 dB SPL midbasal	48 (4)	380	4538	6172
Kontrolle basal	12 (4)	89	1316	1282
100 dB SPL basal	4 (4)	32	255	389
106 dB SPL basal	4 (4)	26	142	259
112 dB SPL basal	10 (4)	78	603	945

### 3.10 Statistische Auswertung der Daten

Statistische Größen der Ergebnisse der Immunhistochemie wurden mit dem Programm scidavis errechnet und in graphischer Form dargestellt. Die n-Zahlen entsprechen jeweils der Anzahl der analysierten Regionen mit etwa 8 IHz für eine Versuchsbedingung und cochleäre Region. Ein anschließender Signifikanztest wurde mit SPSS-Statistics durchgeführt. Je nach Varianzhomogenität (Brown-Forsythe-Test) wurde ein Oneway ANOVA-Test oder der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrisches Verfahren verwendet. Für multiple Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen wurde für eine Lokalisation die Bonferroni-Korrektur als post hoc-Test durchgeführt.

Für die Ergebnisse der ABR-Messungen wurde der Wilcoxon-Signifikanztest verwendet.

In den Abbildungen in Abschnitt 4 sind lediglich signifikante Beziehungen hervorgehoben (\*, \*\* oder \*\*\*); ist ein Vergleich nicht entsprechend markiert, so ist er als nicht signifikant getestet worden. In den Balkendiagrammen in den Abbildungen 15, 16, 18 und 19 werden Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. In den Box-Plots der Abbildungen 21 und 22 sind folgende Werte dargestellt: die Box geht vom 1. zum 3. Quartil, der große Querbalken ist der Median, die kleinen Querbalken zeigen die 10. und 90. Perzentile. Das kleine Rechteck markiert den Mittelwert, Maxima und Minima sind zur besseren Übersicht nicht abgebildet.

## **4 Ergebnisse**

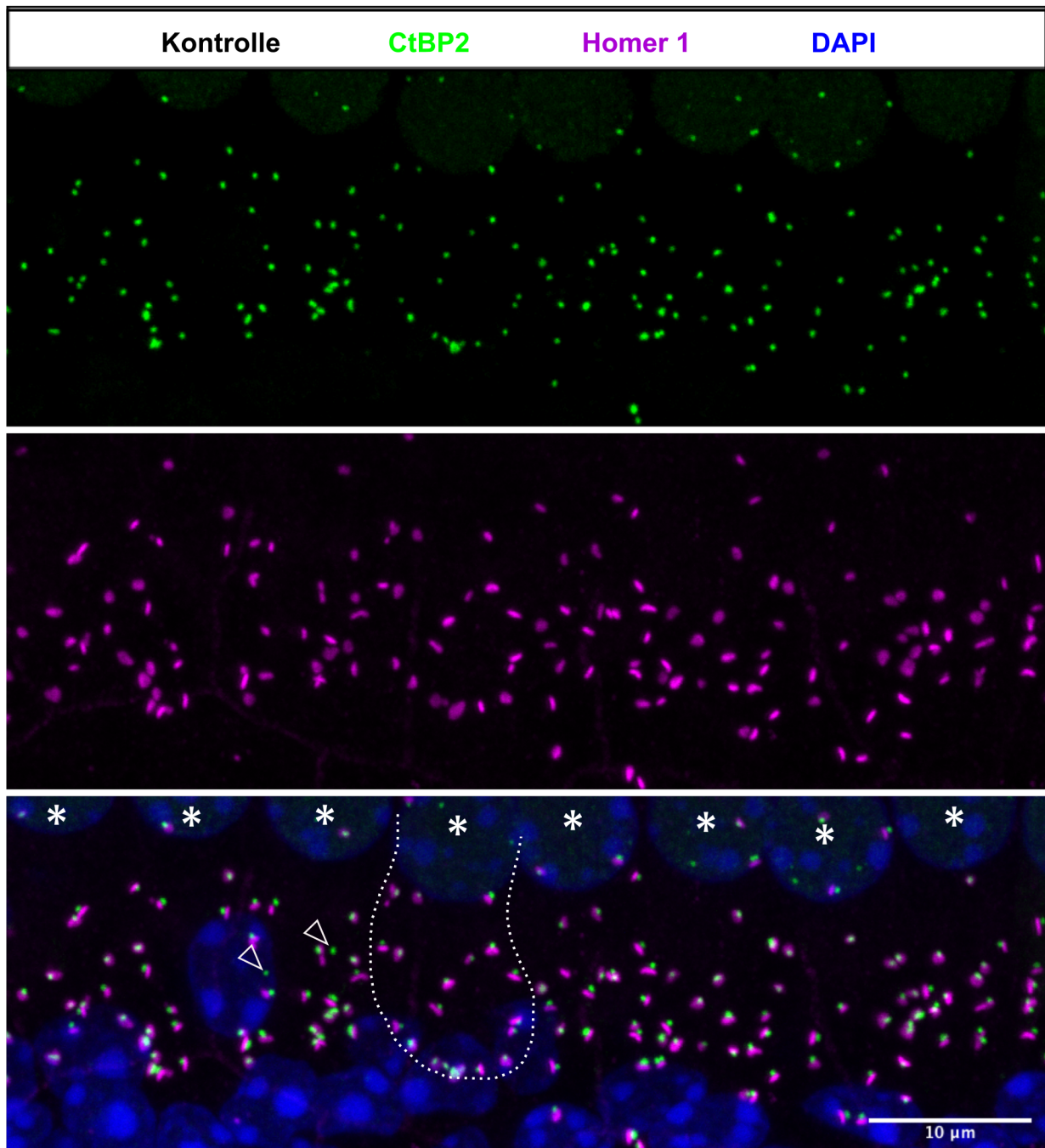
In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Schalltraumata unterschiedlicher Schallintensität auf die cochleären Synapsen der inneren Haarzellen von Mäusen der C57BL/6N-Linie mittels Immunfluoreszenzfärbung und Laserscan-Mikroskopie zum Zeitpunkt 28 Tage nach Trauma analysiert. Untersucht wurden Kontrolltiere (kein Trauma) und Versuchsgruppen nach 100, 106 oder 112 dB SPL-Trauma. Im Anschluss werden ergänzend die Ergebnisse der ABR-Ableitungen gezeigt.

### **4.1 Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich**

Die z-Ebenen und Farbkanäle der Immunfluoreszenz-Detailaufnahmen mit 63x Vergrößerung wurden zu einer MIP zusammengefasst und nach Festlegen einer Intensitätsschwelle analysiert. Größe und Anzahl der Prä- und Postsynapsen wurden semiautomatisiert ausgewertet, das Vorkommen ungepaarter Synapsen hingegen manuell und verblindet. Zur Veranschaulichung der synaptischen Veränderungen wurden Detailaufnahmen der einzelnen Kontroll- und Versuchsgruppen aus dem midbasalen Bereich ausgewählt.

#### **4.1.1 Immunfluoreszenzfärbungen der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea einer Kontrollmaus**

Abbildung 11 zeigt die MIP einer Detailaufnahme aus dem midbasalen Bereich eines Kontrolltieres. Zu erkennen sind die grünen Ribboncluster bzw. Präsynapsen, im oberen Abschnitt isoliert abgebildet, sowie die Homer1-Cluster der Postsynapsen in magenta, in der Mitte isoliert dargestellt. Gemeinsam mit der blauen DAPI-Zellkernfärbung sind sie in der unteren Aufnahme überlagert abgebildet. Bei der Zellkernreihe am oberen Bildrand, markiert mit weißen Sternen, handelt es sich um die Zellkerne der IHZ. Die Zellkerne am unteren Rand gehören zu den Stützzellen des Corti-Organs. Gut erkennbar sind die zahlreichen gepaarten Synapsen. Vereinzelt sind isolierte Ribbons auszumachen, ungepaarte Präsynapsen, auch als orphan ribbons (Kujawa & Liberman, 2009) bezeichnet. Ungepaarte Postsynapsen sind kaum zu erkennen.

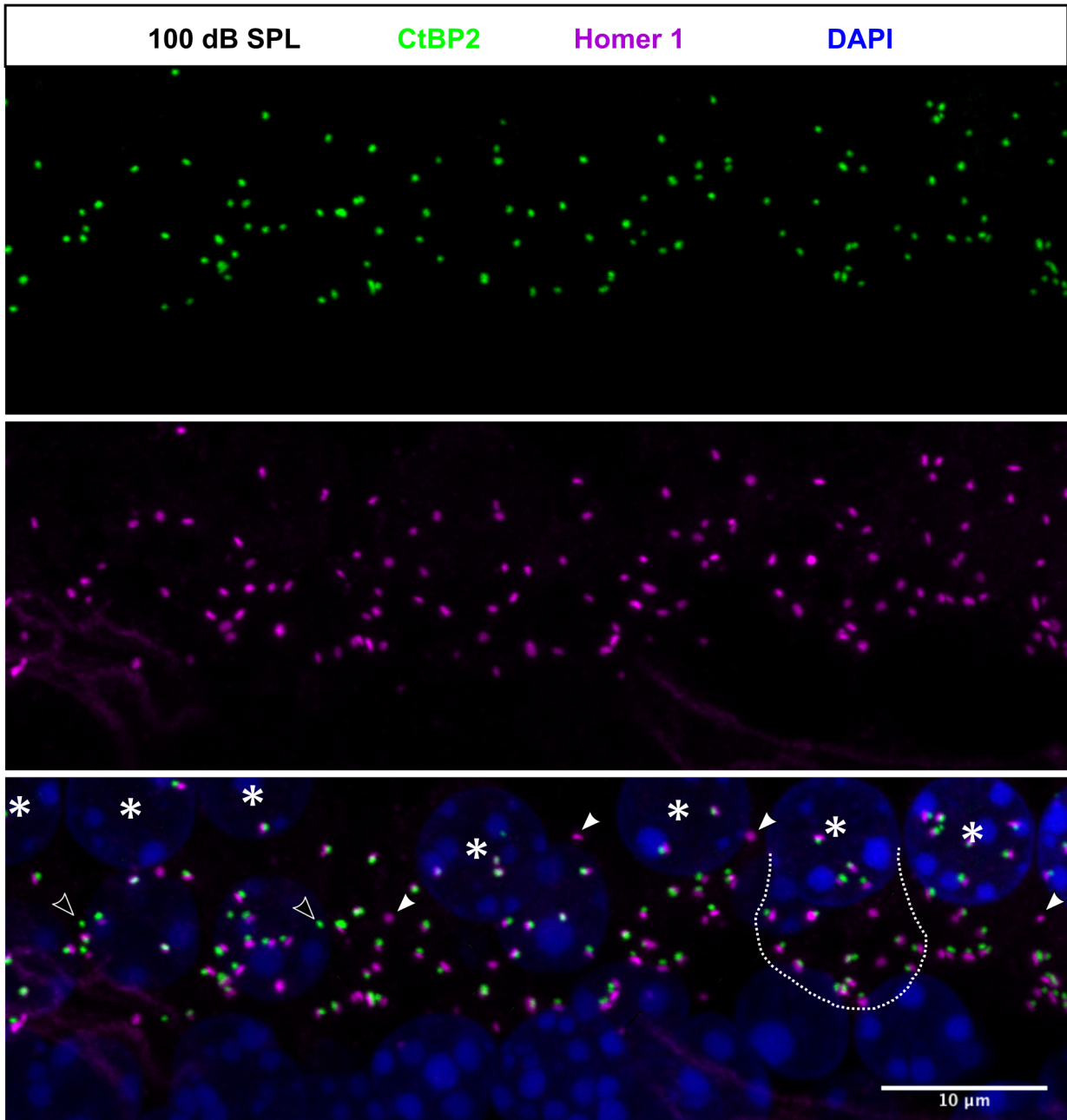


**Abbildung 11: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen der Kontrollgruppe.**

*Oben: präsynaptische CtBP2-Signale (grüner Kanal). Mitte: postsynaptische Homer1-Signale (magenta). Unten: Darstellung der Prä- und Postsynapsen nach Überlagerung der oberen zwei Farbkanäle und des blauen Farbkanals, der mit DAPI blau angefärbte Zellkerne zeigt. Die Zellkerne der IHZ sind durch weiße Sterne hervorgehoben. Die Kontur des synaptischen Pols einer IHZ ist mit der weißen Strichellinie angedeutet. Weiße, leere Pfeile: ungepaarte Präsynapsen.*

#### **4.1.2 Immunfluoreszenzfärbung der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea nach 100 dB SPL Schalltrauma**

In Abbildung 12 ist die MIP einer Aufnahme von IZH 28 Tage nach dem Schalltrauma mit 100 dB SPL Schallintensität aus dem midbasalen Bereich dargestellt. Oben sind isoliert die präsynaptischen Ribbon-Cluster in grün zu sehen; in der Mitte die postsynaptischen Homer1-Cluster in magenta. Unten sind beide Kanäle mit dem blauen DAPI-Kanal gemeinsam dargestellt. In der Überlagerung (unten) sind vermehrt ungepaarte Postsynapsen zu erkennen (volle Pfeile). Ungepaarte Präsynapsen (leere Pfeile), gab es hingegen weniger. Gegenüber der Postsynapsenzahl, die unverändert schien, war die Menge an Präsynapsen im Vergleich zur unvertäubten Kontrolle (Abbildung 11) sichtlich ausgedünnt.

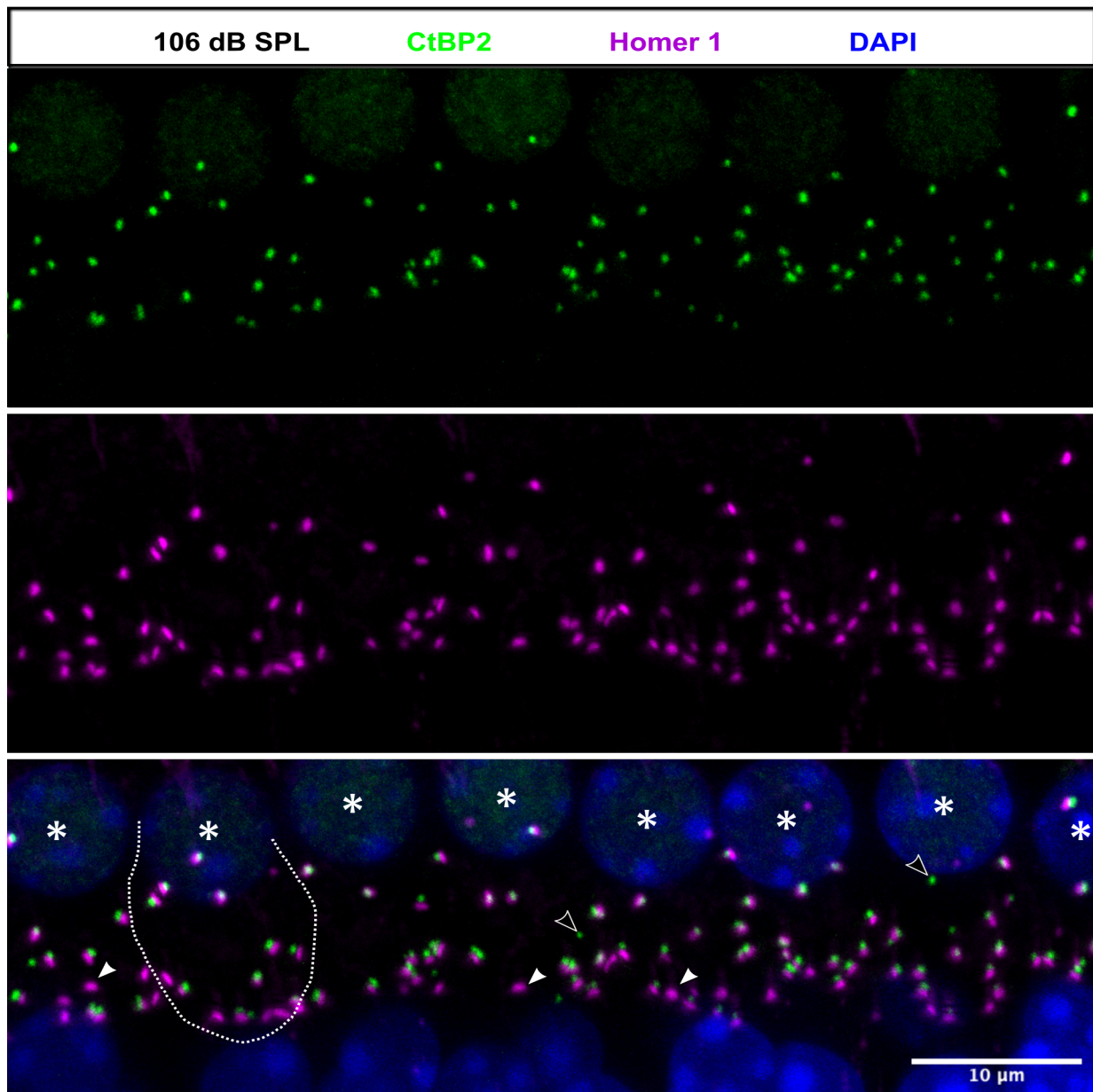


**Abbildung 12: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen einer Maus 28 Tage nach dem 100 dB SPL Schalltrauma.**

*Oben: präsynaptische CtBP2-Signale (grün). Mitte: postsynaptische Homer1-Signale (magenta). Unten: Überlagerung der Prä- und Postsynapse, zusätzlich mit DAPI blau angefarbte Zellkerne. Weiße Sterne markieren die Zellkerne der IHZ. Die Kontur des synaptischen Pols einer IHZ ist mit der weißen Strichellinie angedeutet. Weiße, leere Pfeile: ungepaarte Präsynapsen. Weiße, volle Pfeile: ungepaarte Postsynapsen.*

### **4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea nach 106 dB SPL Schalltrauma**

Abbildung 13 zeigt eine MIP von IHZ im midbasalen Bereich, 28 Tage nach einem 106 dB SPL Schalltrauma: oben die Präsynapsen in grün, in der Mitte die Postsynapsen in magenta. Im unteren Abschnitt sind beide Kanäle überlagert, um die Paarung der Synapsen zu zeigen und gemeinsam mit den blau gefärbten Zellkernen dargestellt; Sterne markieren die Zellkerne der IHZ. Auch nach dem 106 dB SPL-Trauma sind sichtbar weniger Präsynapsen zu erkennen und dementsprechend gehäuft ungepaarte Postsynapsen vorhanden (weiße, volle Pfeile). Die Menge an orphan ribbons (weiße, leere Pfeile) hingegen scheint unverändert.

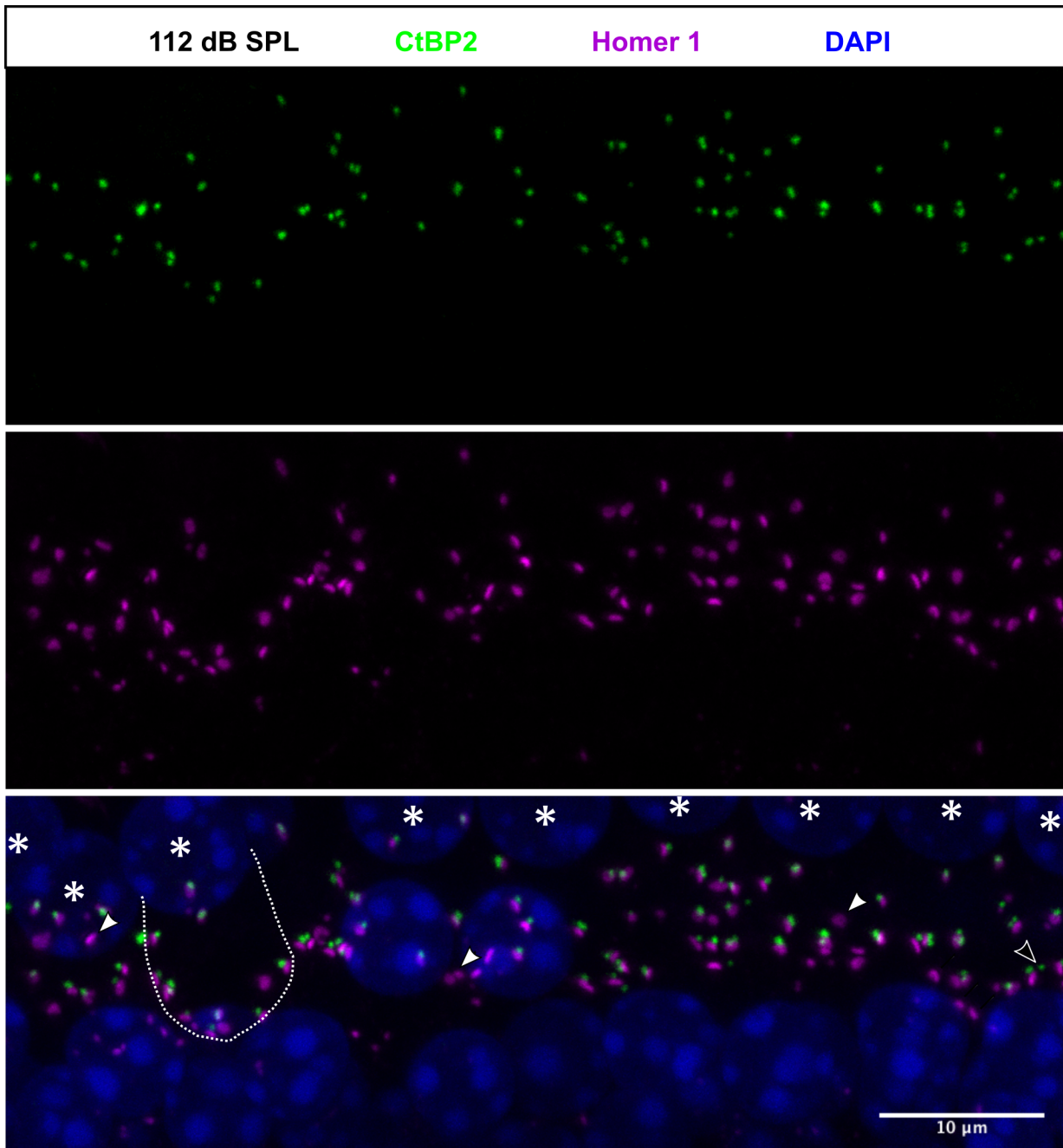


**Abbildung 13: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen einer Maus 28 Tage nach dem 106 dB SPL Schalltrauma.**

*Oben: präsynaptische CtBP2-Signale (grün). Mitte: postsynaptische Homer1-Signale (magenta). Unten: Überlagerung der Prä- und Postsynapsen, zusätzlich mit DAPI blau angefärbte Zellkerne. Die Zellkerne der IHZ sind durch weiße Sterne markiert. Die Kontur des synaptischen Pols einer IHZ ist mit der weißen Strichellinie angedeutet. Weiße, leere Pfeile: ungepaarte Präsynapsen. Weiße, volle Pfeile: ungepaarte Postsynapsen.*

#### **4.1.4 Immunfluoreszenzfärbung der cochleären Synapsen im midbasalen Bereich der Cochlea nach 112 dB SPL Schalltrauma**

Der Schaden an den cochleären Synapsen 28 Tage nach einem 112 dB SPL Schalltrauma ist in Abbildung 14 beispielhaft für den midbasalen Bereich dargestellt. Oben ist isoliert die MIP des CtBP2-Kanals abgebildet (grün). In der Mitte ist die MIP der mit Homer1-markierten Postsynapsen (magenta) zu sehen. Unten sind beide Kanäle gemeinsam mit den blauen Zellkernen dargestellt, die der IHZ sind mit Sternen markiert. Auch hier ist eine deutliche Abnahme der Präsynapsenzahl zu erkennen. Die Größe und Anzahl der Postsynapsen scheinen unverändert, sie sind jedoch häufiger ungepaart (weiße, volle Pfeile).



**Abbildung 14: MIP einer Detailaufnahme aus der midbasalen Region von 8 inneren Haarzellen einer Maus 28 Tage nach dem 112 dB SPL Schalltrauma.**

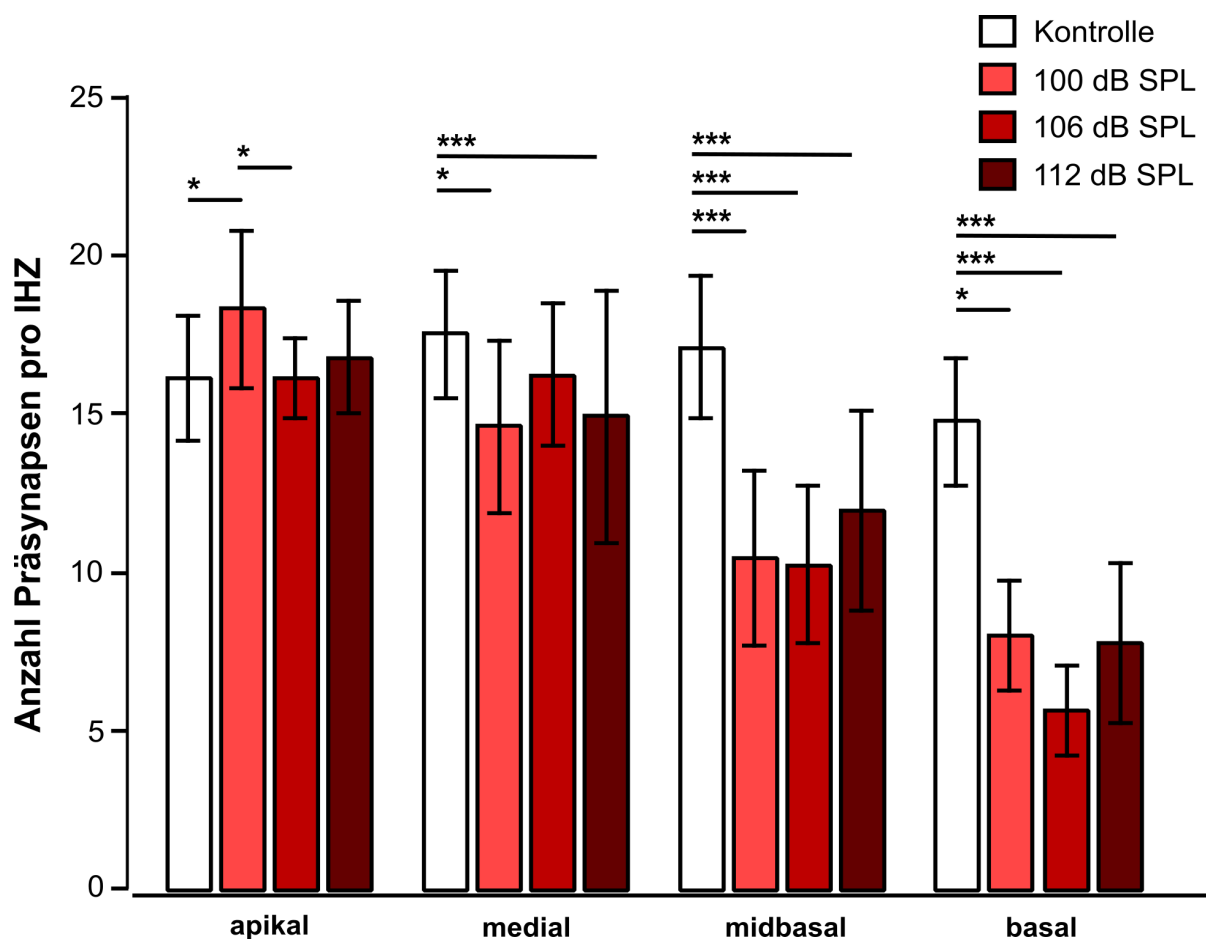
*Oben: präsynaptische CtBP2-Signale (grün). Mitte: postsynaptische Homer1-Signale (magenta). Unten: Überlagerung der Kanäle für Prä- und Postsynapsen und der blau mit DAPI angefärbten Zellkerne. Die Zellkerne der IHZ sind durch weiße Sterne markiert. Die Kontur des synaptischen Pols einer IHZ ist mit der weißen Strichellinie angedeutet. Weiße, leere Pfeile: ungepaarte Präsynapsen. Weiße, volle Pfeile: ungepaarte Postsynapsen.*

## **4.2 Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der Präsynapsen**

### **4.2.1 Die Traumata führen zu einer verringerten Anzahl von Präsynapsen im hochfrequenten Bereich**

Die Signale des grünen Farbkanals (CtBP2-Färbung der Präsynapsen) wurden nach dem Festlegen einer Messschwelle in jeder Aufnahme semiautomatisch gezählt und für eine bessere Vergleichbarkeit auf ihre Anzahl pro IHz normiert. Die normierte Anzahl der Präsynapsen jeder Aufnahme von Kontroll- oder Versuchsbedingung wurde nach Frequenzbereich sortiert und eine statistische Auswertung durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte der Anzahl der Präsynapsen pro cochleärer Region  $\pm$  SD und vorhandene signifikante Unterschiede innerhalb einer Region zwischen den Traumabedingungen.

In der apikalen Cochlea-Region kam es mit Steigerung des Schalltraumas kaum zu signifikanten Veränderungen der Präsynapsenanzahl pro IHz. Lediglich bei 100 dB SPL zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 16,2 auf 18,3 gegenüber der Kontrollgruppe. In den 106 und 112 dB SPL-Trauma-Gruppen lagen die Werte wieder bei 16,1 und 16,7 Präsynapsen pro IHz. In der medialen Cochlea-Region erfolgte nach dem 100 dB SPL-Trauma eine signifikante Verringerung von etwa 17,5 auf 14,6 Präsynapsen und auf 14,9 nach dem 112 dB SPL-Schalltrauma. Nach dem 106 dB SPL-Trauma zeigt sich mit 16,2 Präsynapsen pro IHz keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. In der hochfrequenten Region der Cochlea, dem midbasalen und basalen Bereich, bewirkte jedes Schalltrauma eine signifikante Reduktion der Präsynapsenzahl pro IHz. Midbasal sank die Anzahl von 17,1 auf 10,4 (100 dB SPL), 10,2 (106 dB SPL) bzw. 11,9 (112 dB SPL); basal von 14,8 auf 8 (100 dB SPL), 5,6 (106 dB SPL) und 7,8 (112 dB SPL) Präsynapsen pro IHz. Midbasal entsprach das einem Verlust von bis zu 41 % und basal sogar von bis zu 63 %. Man sieht also bei jeder der 3 Schalltraumaintensitäten einen zur hochfrequenten, basalen Cochleahälfte hin ansteigenden Verlust der Präsynapsen, jedoch keinen signifikant größeren Verlust durch Erhöhung der Traumaintensität. Der Verlust der Präsynapsen ist also abhängig vom Frequenzbereich - am Rand bzw. basalwärts vom Traumaaband. Er lässt sich nicht durch eine Erhöhung des Lautstärkepegels des Traumas verstärken.

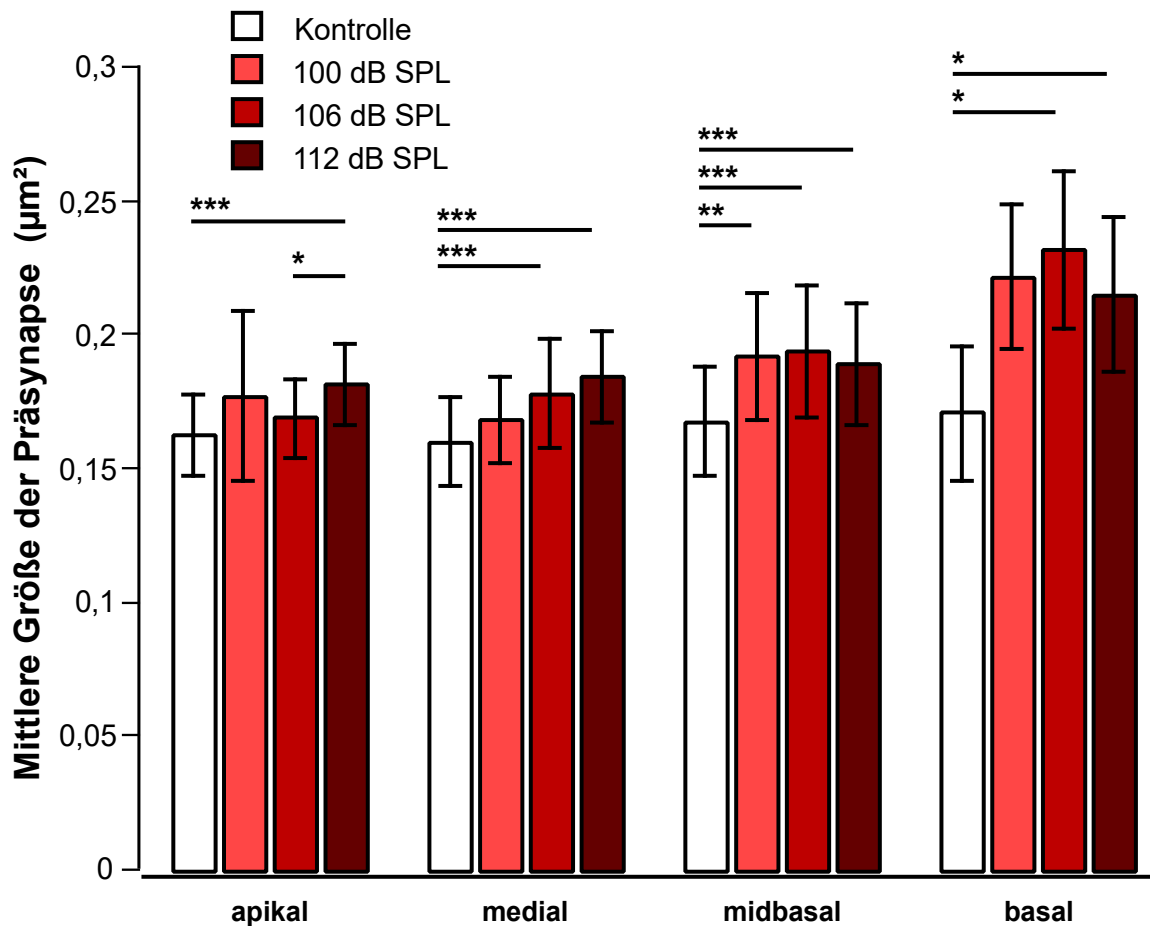


**Abbildung 15: Auswirkung der Schalltraumata auf die Anzahl präsynaptischer Signale pro IHZ nach 28 Tagen.**

Vergleich zwischen den Mittelwerten  $\pm$  SD der Kontrollgruppe und der Traumagruppen 100 dB SPL, 106 dB SPL und 112 dB SPL, geordnet nach Cochlea-Region. Signifikanztest: für die apikale Gruppe Oneway ANOVA, für die mediale, midbasale und basale Gruppe Kruskal-Wallis-Test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2 Vergrößerung der durchschnittlichen Präsynapsenfläche infolge der Schalltraumata

Als zweites Kriterium zur Charakterisierung der Größe der Präsynapse wurde die durchschnittliche Fläche der CtBP2-Cluster in der MIP untersucht. Abbildung 16 zeigt Mittelwerte pro cochleärer Region  $\pm$  SD und vorhandene signifikante Unterschiede innerhalb einer Region zwischen den Traumabedingungen.



**Abbildung 16: Auswirkung der Schalltraumata auf die Größe der präsynaptischen Signale nach 28 Tagen.**

Vergleich zwischen den Mittelwerten  $\pm$  SD der Kontrollgruppe und der Trauma-Gruppen 100 dB SPL, 106 dB SPL und 112 dB SPL, geordnet nach Cochlea-Region: apikal, medial, midbasal und basal. Signifikanztest: Kruskal-Wallis-Test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Im apikalen Bereich wurde nach dem 112 dB SPL-Trauma im Vergleich zur Kontrolle ein hochsignifikanter Anstieg der mittleren Größe von  $0,16 \mu\text{m}^2$  auf  $0,18 \mu\text{m}^2$  beobachtet. Für alle medial, midbasal oder basal gelegenen IHZ der Cochlea war sowohl nach dem 106 dB SPL- als auch nach dem 112 dB SPL-Trauma ein signifikanter Größenzuwachs der Ribbons erkennbar. Nach dem 100 dB SPL-Trauma betraf der Zuwachs der Präsynapsenfläche, die von  $0,17 \mu\text{m}^2$  auf  $0,19 \mu\text{m}^2$  anstieg, lediglich den midbasalen Bereich. Nach dem 106 dB SPL-Trauma vergrößert sich medial die Fläche von  $0,16 \mu\text{m}^2$  auf  $0,18 \mu\text{m}^2$ , midbasal von  $0,17 \mu\text{m}^2$  auf  $0,19 \mu\text{m}^2$  und basal von  $0,17 \mu\text{m}^2$  auf  $0,22 \mu\text{m}^2$ . Nach dem 112 dB SPL-Trauma war medial eine Vergrößerung der Fläche von  $0,16 \mu\text{m}^2$  auf  $0,18 \mu\text{m}^2$ , midbasal von  $0,17 \mu\text{m}^2$  auf  $0,19 \mu\text{m}^2$  und basal von  $0,17 \mu\text{m}^2$  auf  $0,2 \mu\text{m}^2$  vorhanden.

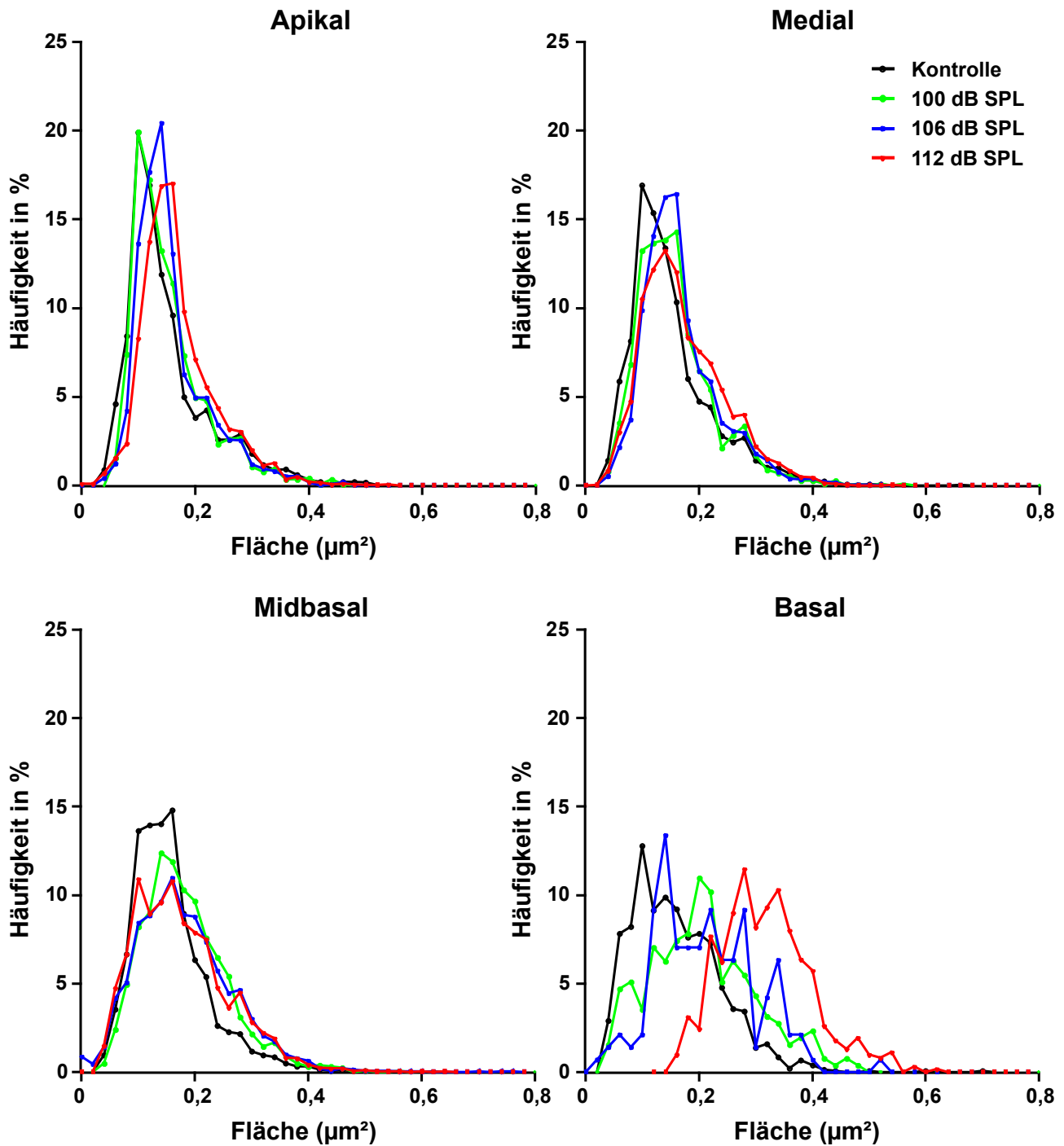
Vergleicht man die Versuchsgruppen in den vier verschiedenen Regionen untereinander, war nur im apikalen Bereich ein signifikanter Zuwachs mit steigendem Schalldruckpegel von 106 dB SPL auf 112 dB SPL zu erkennen ( $0,17 \mu\text{m}^2$  auf  $0,18 \mu\text{m}^2$ ).

Im midbasalen Bereich kam es bereits nach einem Schalltrauma mit 100 dB SPL zu einer Vergrößerung der Cluster, bei weiterer Schallpegelerhöhung medial und basal ab 106 dB SPL und apikal erst nach 112 dB SPL. Schon ein geringeres Schalltrauma führte midbasal und basal zur Erhöhung der Größe der Präsynapsen; ein höheres Trauma verstärkte diesen Effekt nicht.

### **4.2.3 Verteilung der Präsynapsenfläche verbreitert sich mit steigender Traumaintensität und in Richtung basale Cochlea-Region**

Die Häufigkeitsverteilungen der Präsynapsenflächen sind in Abbildung 17 nach Region und Versuchsbedingung getrennt dargestellt.

Bei der Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der Präsynapsenfläche (Abbildung 17) fällt zunächst auf, dass mit steigender Hörfrequenz bereits bei der Kontrollgruppe eine Verbreiterung und Abflachung der Verteilung auftrat. Apikal waren Präsynapsen mit einer Größe von  $0,19 \mu\text{m}^2$  mit einer maximalen Häufigkeit von 20 % am ausgeprägtesten. Dieses Maximum betrug medial nur noch etwa 17 %, midbasal 15 % und basal 14 %, gleichzeitig nahm der Anteil sowohl kleinerer als auch größerer Präsynapsen zu. Durch das 100 dB SPL-Schalltrauma kam es bei den niedrigen Frequenzen zu keiner sichtbaren Veränderung, die Kontroll- und 100 dB SPL-Kurven sind fast deckungsgleich. Basal fällt eine deutliche Rechtsverschiebung der Größenverteilung auf. Mit steigender Schallintensität des Traumas nahm die Größe der Präsynapsen gegenüber der Kontrolle zu, insbesondere nach dem 112 dB SPL-Trauma.



**Abbildung 17: Verteilung der Präsynapsenfläche in Abhängigkeit vom Schalltrauma und der Cochlea-Region.**

Vergleich der Verteilungen der Präsynapsenfläche der Kontrollgruppe (schwarz) mit den Verteilungen der 100 dB SPL- (grün), 106 dB SPL- (blau) und 112 dB SPL-Gruppe (rot) im apikalen, medialen, midbasalen und basalen Bereich.

## **4.2.4 Zusammenfassung der Trauma-Effekte auf die Präsynapse**

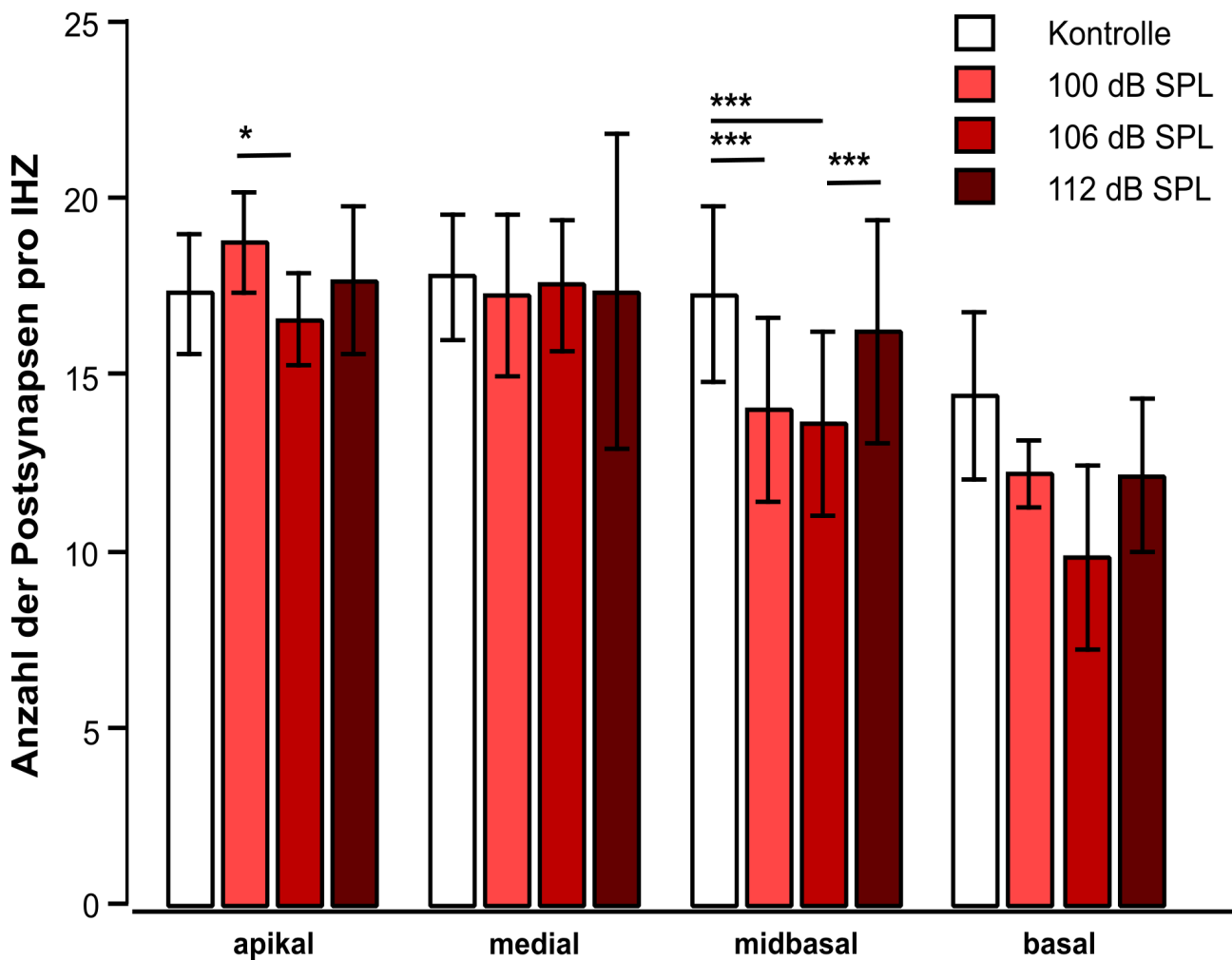
Zusammenfassend lässt sich über die Auswirkungen der Schalltraumata auf die Präsynapsen sagen, dass medial und basal, aber vor allem in der midbasalen Cochlea-Region die Anzahl der Präsynapsen durch das Trauma verringert wurde und gleichzeitig die Größe der noch vorhandenen Präsynapsen signifikant zunahm. In der apikalen Region, wo durch das applizierte Schalltrauma keine Auswirkungen erwartet wurden, gab es dennoch geringe Veränderungen. Des Weiteren ging eine höhere Schallintensität des Traumas nicht mit höheren Verlusten bei der Anzahl der Präsynapsen pro IHz einher oder skalierte mit einem Anstieg ihrer Größe.

## **4.3 Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der postsynaptischen Homer1-Cluster**

Die Homer1-positiven Cluster der Postsynapsen wurden genau wie die präsynaptischen Ribbons bezüglich Anzahl und Größe untersucht.

### **4.3.1 Geringe Veränderungen in der Anzahl der Postsynapsen**

Die postsynaptischen Homer1-Signale wurden in jeder Aufnahme bestimmt und ihre Anzahl anschließend auf die Anzahl der IHz normiert. Die Daten wurden nach Frequenzbereich und Versuchsbedingung sortiert und statistisch ausgewertet. Abbildung 18 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen.



**Abbildung 18: Auswirkung der Schalltraumata auf die Anzahl postsynaptischer Signale pro IHZ.**

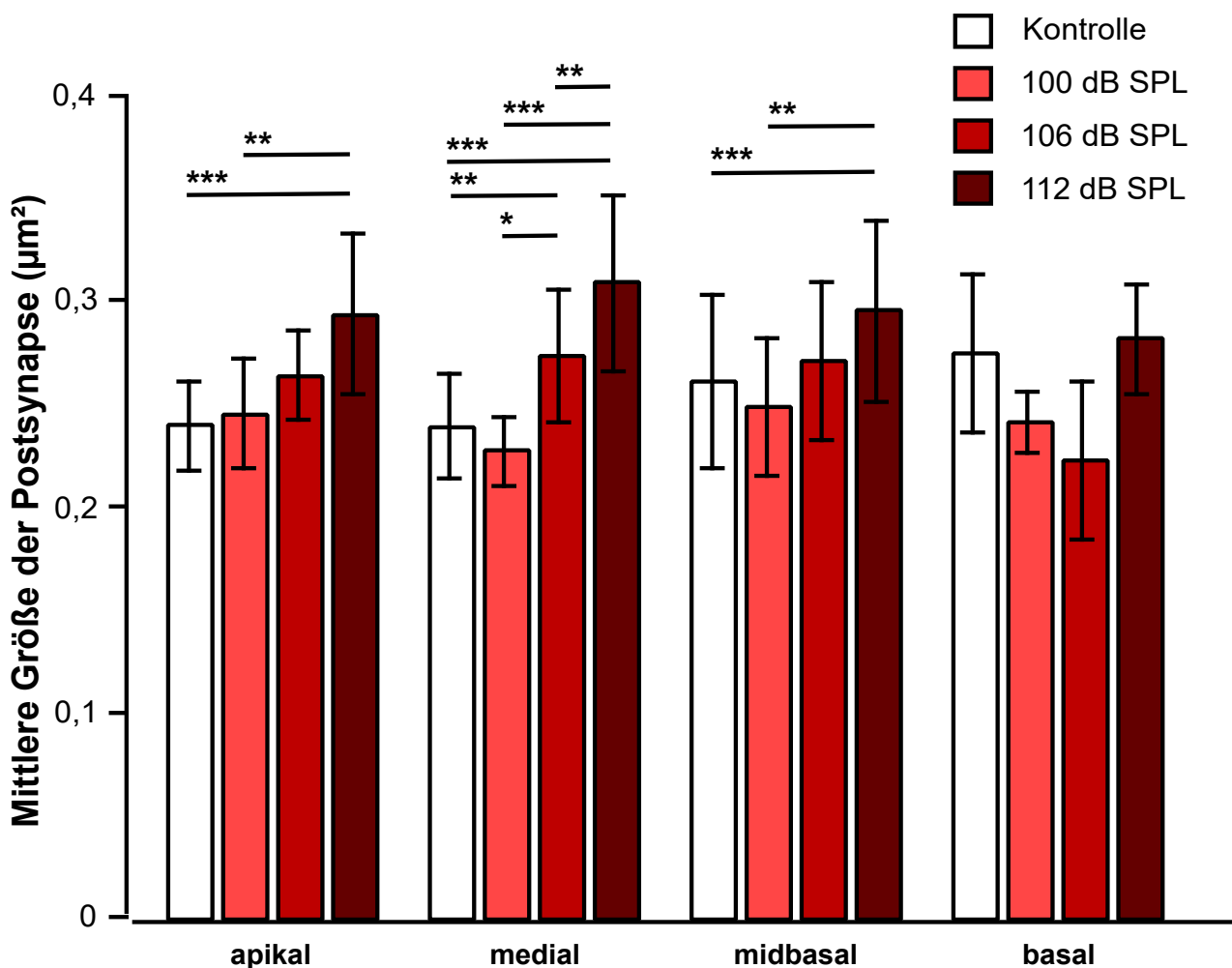
Vergleich zwischen den Mittelwerten  $\pm$  SD der Kontrollgruppe und den 100 dB SPL-, 106 dB SPL- und 112 dB SPL-Gruppen, geordnet nach Cochlea-Region. Signifikanztests: medial Oneway ANOVA; apikal, midbasal und basal Kruskal-Wallis-Test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Apikal war zwischen dem 100 dB SPL und dem 106 dB SPL-Trauma eine signifikante Verringerung von 18,75 auf 16,54 Cluster pro IHZ nachweisbar, nicht jedoch im Vergleich zur Kontrollbedingung. Medial wurde die Anzahl der Postynapsen durch die Traumata nicht verändert. Midbasal zeigt sich nach den 100 dB SPL- und 106 dB SPL-Traumata ein signifikanter Verlust von Postsynapsen von 17,29 auf 14,01 bzw. 13,63 Signalen pro IHZ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den 13,63 Postsynapsen nach 106 dB SPL-Trauma kam es nach dem 112 dB SPL-Trauma zu einem signifikanten Anstieg auf durchschnittlich 16,23 Signale pro IHZ. Im basalen Bereich fiel ein Verlust an postsynaptischen Signalen von 14,39 auf bis zu 9,8 bei 106 dB SPL auf, welcher jedoch nicht signifikant war. Grund hierfür war möglicherweise die geringe Datenmenge (Vergleich Tabelle 3).

Im midbasalen Bereich, in dem der erwartete Schaden durch das Trauma am größten war, war bereits nach 100 dB SPL ein signifikanter Verlust von Postsynapsen erkennbar, in den übrigen Regionen auch nach höherer Schallintensität nicht.

### 4.3.2 Anstieg der Postsynapsenfläche in niedrigen bis mittleren Frequenzbereichen

Die durchschnittliche Fläche der in Abbildung 18 gezählten Postsynapsen wurde bestimmt, nach Region und Versuchsbedingung sortiert und statistisch analysiert. Abbildung 19 zeigt Mittelwerte mit Standardabweichung und Signifikanzen. Die Verteilung der Einzeldaten wird in Abschnitt 4.4.3 gezeigt.

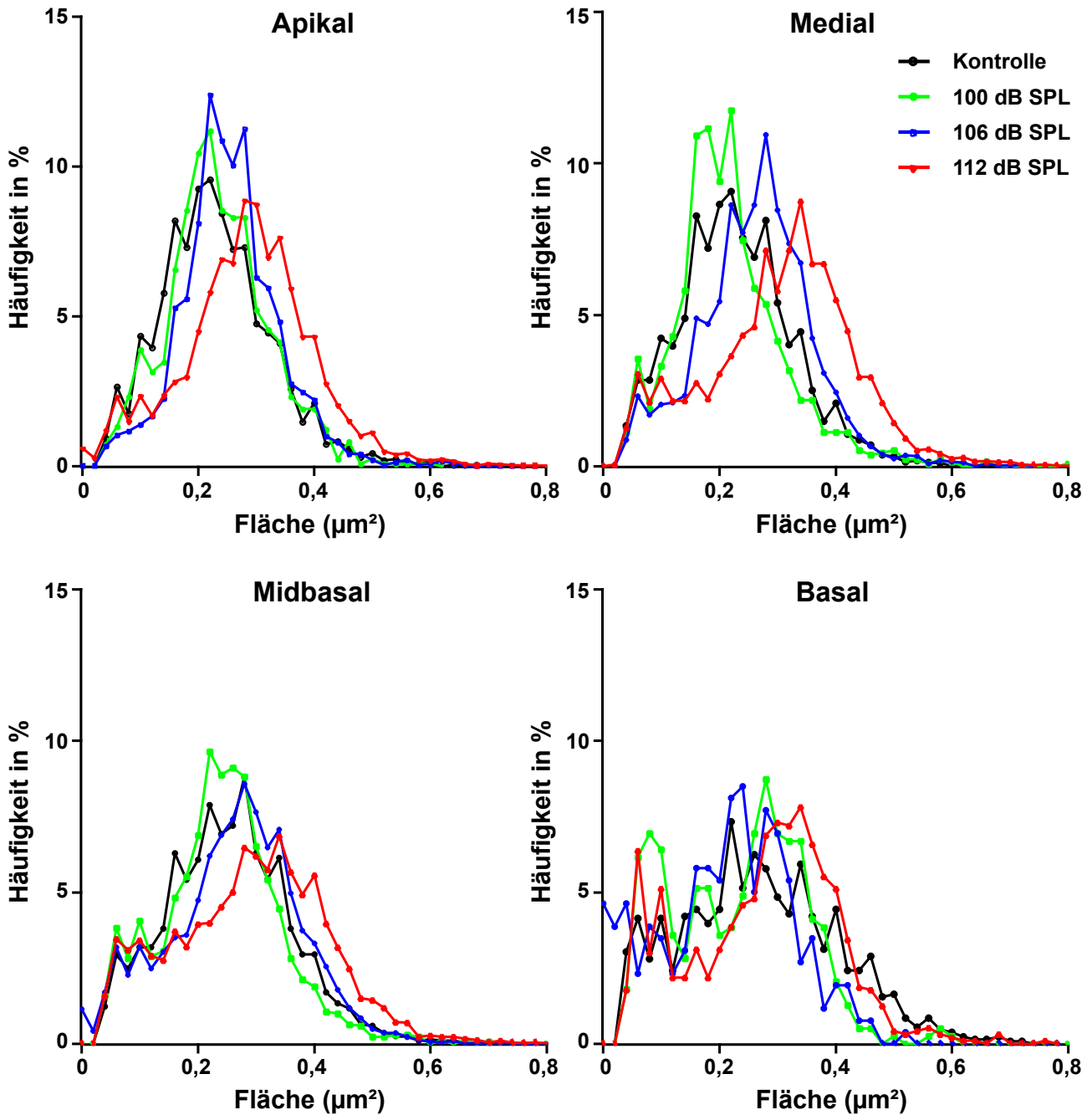


**Abbildung 19: Auswirkung der Schalltraumata auf die Größe postsynaptischer Signale**  
 Vergleich zwischen den Mittelwerten  $\pm$  SD der Kontrollgruppe und der Traumagruppen 100 dB SPL, 106 dB SPL und 112 dB SPL, geordnet nach Cochlea-Region. Signifikanztest: Kruskal-Wallis-Test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Flächen der postsynaptischen Signale wiesen im apikalen Bereich erst nach dem 112 dB SPL-Trauma einen signifikanten Anstieg von  $0,24 \mu\text{m}^2$  auf  $0,29 \mu\text{m}^2$  auf; medial bereits nach dem 106 dB SPL-Trauma von  $0,24 \mu\text{m}^2$  auf  $0,27 \mu\text{m}^2$  und nach dem 112 dB SPL-Trauma sogar auf  $0,31 \mu\text{m}^2$ . Midbasal war dagegen nur nach dem 112 dB SPL-Trauma eine signifikante Vergrößerung von  $0,26 \mu\text{m}^2$  auf  $0,3 \mu\text{m}^2$  messbar. Im basalen Bereich gab es keine signifikanten Veränderungen. Somit scheinen die Postsynapsen eher in den niedrigen bis mittleren Frequenzbereichen der Cochlea von einer Vergrößerung der Fläche infolge der Schalltraumata betroffen zu sein.

### **4.3.3 Verteilung der Postsynapsenfläche verbreitert sich mit steigender Traumaintensität und Cochlea-Region**

In Abbildung 20 sind die Häufigkeitsverteilungen der Postsynapsenflächen in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen nach cochleärer Region getrennt dargestellt.



**Abbildung 20: Verteilung der Postsynapsenfläche in Abhängigkeit vom Schalltrauma und der Cochlea-Region**

Vergleich der Verteilung der Kontrollgruppe (schwarz) mit den Verteilungen der Traumagruppen mit 100 dB SPL (grün), 106 dB SPL (blau) und 112 dB SPL (rot) im apikalen, medialen, midbasalen und basalen Bereich.

Die Verteilungen der Postsynapsenflächen der Kontrolltiere und der 100 dB SPL-Versuchstiere scheinen nahezu deckungsgleich. Nach dem 106 dB SPL-Schalltrauma war vor allem medial eine deutliche Verschiebung der Verteilungskurve zugunsten einer durchschnittlich größeren Postsynapsenfläche zu erkennen, apikal und midbasal war dieser Effekt nur angedeutet (Abbildung 20). Nach dem 112 dB SPL-Schalltrauma war diese Verschiebung apikal, medial und

midbasal deutlich zu erkennen. Im basalen Bereich war die Verteilung der Postsynapsen-Größe bimodal mit einem kleineren Maximum bei ca.  $0.05 \mu\text{m}^2$  und einem zweiten Maximum von ca.  $0,35 \mu\text{m}^2$ ; außerdem war die Verteilung am weitesten nach rechts verschoben (Abb. 20). Eine ähnliche Tendenz – Zweigipfligkeit und Verbreiterung der Verteilung – war in der basalen Region auch bei den anderen Versuchsgruppen zu beobachten.

#### **4.3.4 Zusammenfassung der Trauma-Effekte auf die Postsynapsen**

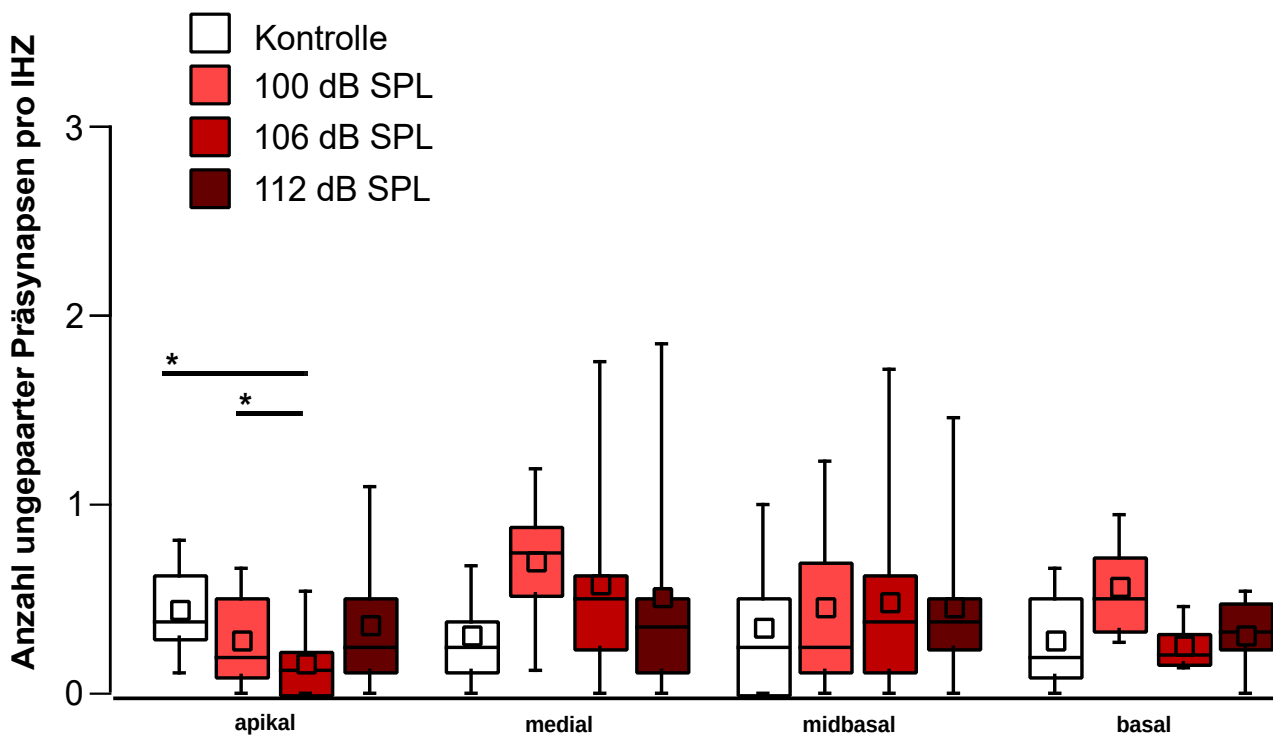
Zu den Veränderungen der Postsynapsen infolge unterschiedlich starker Schalltraumata lässt sich zusammenfassend sagen, dass mit Ausnahme des 112 dB SPL-Traumas die Anzahl lediglich im midbasalen Bereich vermindert war. Die Auswirkungen dieses höchsten Schalltraumas weiteten sich jedoch über diesen Bereich hinweg aus und führten zu einer Zunahme der postsynaptischen Fläche auch in den niederfrequenten Regionen der Cochlea.

#### **4.4 Untersuchung der Paarung von Prä- und Postsynapse**

Seit der Entdeckung der lärminduzierten cochleären Synaptopathie wurden ungepaarte Präsynapsen beschrieben (Kujawa & Liberman, 2009; Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Da im Rahmen dieser Studie der Verlust von Präsynapsen (Abbildung 15) im Vergleich zum Verlust von Postsynapsen (Abbildung 18) deutlich größer war (ein Verlust von bis zu 7 Präsynapsen pro IHZ im Vergleich zu nur 3,5 Postsynapsen pro IHZ im midbasalen Bereich), war ein Auftreten ungepaarter Postsynapsen zu erwarten. Die Datensätze wurden verblindet und die ungepaarten Prä- und Postsynapsen manuell gezählt. Im Anschluss wurde der Mittelwert pro IHZ errechnet, nach der Entblindung nach Frequenzbereich und Versuchsbedingung geordnet und eine statistische Auswertung durchgeführt.

##### **4.4.1 Anzahl ungepaarter Präsynapsen**

Abbildung 21 zeigt Box-Plots der CtBP2-Signale (Präsynapsen) pro IHZ, die keinem postsynaptischen Homer1-Signal zugeordnet werden konnten. Signifikante Ergebnisse der statistischen Auswertung sind hervorgehoben.



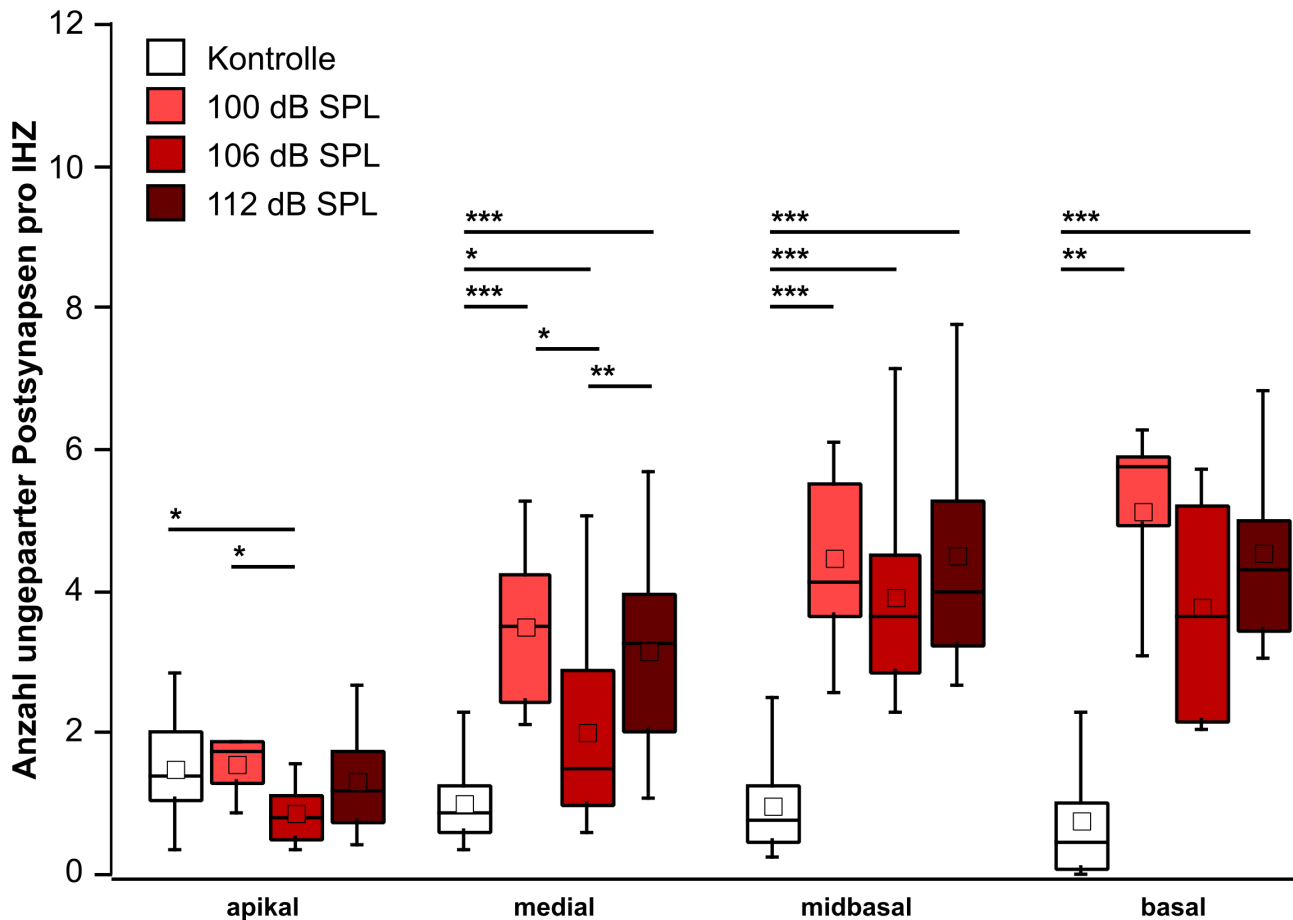
**Abbildung 21: Wirkung der Schalltraumata auf die Anzahl präsynaptischer Signale ohne Postsynapse pro IHz**

Vergleich zwischen Kontrollgruppe, 100 dB SPL-, 106 dB SPL- und 112 dB SPL-Traumagruppe, geordnet nach cochleärer Region. Darstellung als Box-Plot. Box vom 1. zum 3. Quartil, großer Querbalken Median, kleine Querbalken 10 % und 90 %, das kleine Rechteck markiert den Mittelwert. Signifikanztest: für die midbasale und basale Gruppe Oneway ANOVA, für die apikalen und mediale Gruppe Kruskal-Wallis-Test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

In der apikalen Region trat eine signifikante Verringerung der ungepaarten Präsynapsen bei 106 dB SPL von 0,5 auf 0,2 pro IHz gegenüber den Kontroll- und 100 dB SPL-Gruppen auf. Es gab in den folgenden Frequenzbereichen keine weiteren signifikanten Veränderungen. Der Median der ungepaarten Präsynapsen pro IHz lag in allen Gruppen für alle Regionen deutlich unter 1, d.h. es gab praktisch keine ungepaarten Präsynapsen.

#### 4.4.2 Anzahl ungepaarter Postsynapsen

Als nächstes wurden ungepaarte Postsynapsen gezählt, d.h. Homer1-Cluster ohne zugehörigen CtBP2-Cluster. Ihre Anzahl im Bildausschnitt wurde wieder auf die Zahl der IHz normiert. Der Boxplot in Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse für die unterschiedlichen Frequenzbereiche und Versuchsbedingungen sowie die Resultate der Signifikanztests.



**Abbildung 22: Auswirkung der Schalltraumata auf die Anzahl ungepaarter postsynaptischer Signale pro IHZ**

Vergleich zwischen Kontrollgruppe, 100 dB SPL, 106 dB SPL und 112 dB SPL, geordnet nach cochleärer Region. Darstellung als Box-Plot. Box vom 1. zum 3. Quartil, großer Querbalken Median, kleine Querbalken 10 % und 90 %. Das kleine Rechteck markiert den Mittelwert. Signifikanztest: Kruskal-Wallis-Test. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Im apikalen Bereich war nach dem 106 dB SPL-Trauma ein geringer Verlust an ungepaarten Signalen gegenüber der Kontrolle vorhanden (von 1,5 auf 0,9 ungepaarte Postsynapsen pro IHZ). Hingegen kam es in den mittleren bis hohen Frequenzbereichen nach allen drei Traumata zu einem signifikanten Anstieg ungepaarter Postsynapsen pro IHZ: medial von 0,97 auf 3,5 nach dem 100 dB SPL-, auf 2 nach dem 106 dB SPL- und auf 3,2 nach dem 112 dB SPL-Trauma. Im midbasalen Bereich erhöhte sich die Anzahl ungepaarter Postsynapsen pro IHZ von 0,97 auf 4,5 nach dem 100 dB SPL-, auf 3,9 nach dem 106 dB SPL- und auf 4,5 nach dem 112 dB SPL-Trauma. Basal war nach dem 100 dB SPL-Trauma ein Anstieg von 0,75 auf 5,1 und nach dem 112 dB SPL-Trauma auf 4,5 ungepaarte Postsynapsen pro IHZ nachweisbar, während der Anstieg nach dem 106 dB SPL-Trauma nicht signifikant war, was vermutlich auf die geringere Datenmenge für den basalen Bereich und die hohe Variabilität bei diesem Trauma zurückzuführen war.

### **4.4.3 Zusammenfassung der Trauma-Effekte auf die synaptische Paarung**

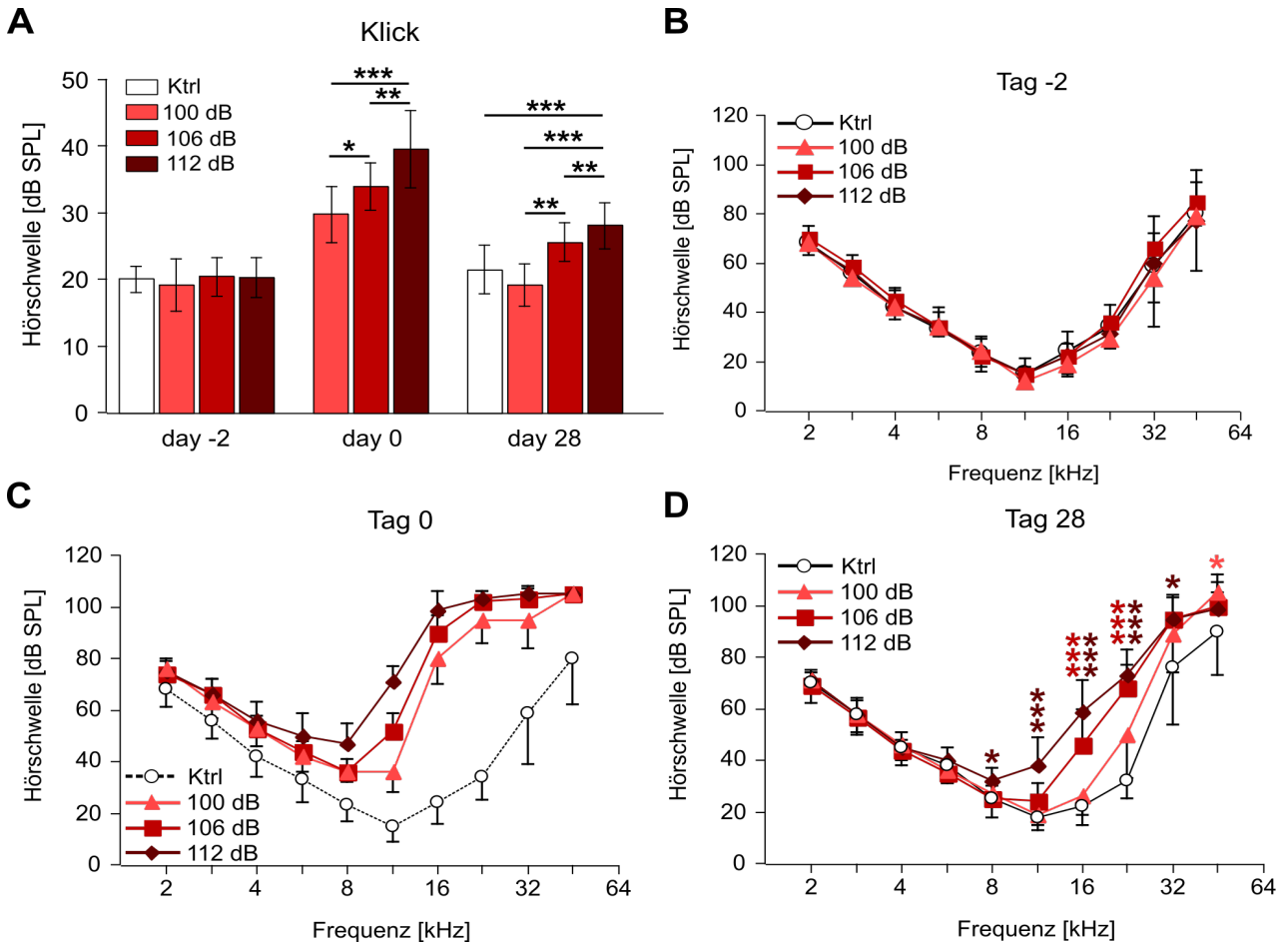
Der beobachtete hohe Verlust an präsynaptischen Signalen in hohen Frequenzbereichen vier Wochen nach Schallexposition (Abbildung 15) gegenüber der unveränderten Anzahl an postsynaptischen Signalen (Abbildung 18) lässt auf eine erhöhte Anzahl an ungepaarten Postsynapsen schließen, eine Annahme, die sich in der Einzelanalyse der ungepaarten Postsynapsen bestätigte (Abbildung 22). Ungepaarte Präsynapsen traten in Folge der Schalltraumata nicht vermehrt auf (Abbildung 21).

### **4.5 ABR-Hörschwellen vor und nach dem Trauma**

Bei den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen handelt es sich um eine kurze Zusammenfassung der ABR-Messungen von Philip Derleder und Philipp Fischer nach den Traumata von 106 dB SPL und 112 dB SPL, sowie von Pauline Schepskys nach dem Trauma von 100 dB SPL.

Mithilfe der Hirnstammableitungen kann der Verarbeitungsprozess des zentralen Nervensystems von akustischen Signalen beurteilt werden. Diese Untersuchungen werden unter Narkose durchgeführt und bieten somit eine objektive Möglichkeit, die Funktion der Cochlea zu überprüfen. Für jede Frequenz kann eine Schwelle ermittelt werden, ab der die Schallintensität ausreicht um im Hörnerven ein typisches Signal zu erzeugen (Wellen I-V der ABR). Von besonderem Interesse ist hier die Welle I, die die Summenaktivität des Hörnerven widerspiegelt. Vergleicht man nach einem Schalltrauma diese Schwelle mit der Schwelle derselben Frequenz der Kontrollgruppe, so lässt sich eine Aussage über eine Schwellenerhöhung und somit verschlechterte Schallwahrnehmung in der Cochlea treffen. Zudem ist die Amplitude der Welle I von der Anzahl an aktivierten afferenten Nerven abhängig. Aus einer verminderten Amplitude kann auf eine geringere Aktivität oder Zahl von Nervenfasern im Hörnerv geschlossen werden.

### **4.6 Auswirkungen der Schalltraumata auf die Hörschwellen**



**Abbildung 23: Hörschwellen der Kontroll- und Versuchsgruppen vor, unmittelbar nach und 28 Tage nach Schalltrauma**

Klick-ABR-Schwellen (A) und Tonaudiogramme (B-D) der 100, 106 und 112 dB SPL Versuchsgruppen vor (Tag -2), unmittelbar nach (Tag 0) und 28 Tage nach Schalltrauma und der Kontrollgruppe an Tag -2 und Tag 28. Dargestellt sind Mittelwerte und SD, in B-D zur besseren Übersicht SD nur in eine Richtung. In Abbildung C ist zum Vergleich das Audiogramm der Kontrollgruppe von Tag -2 gestrichelt abgebildet. Untersucht wurde die permanente Hörschwellerhöhung 28 Tage nach Trauma im Verhältnis zur Kontrollgruppe (D), sowie die Klick-ABR-Ergebnisse aller Gruppen untereinander (A). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , die Farbe der Sterne korrespondiert der untersuchten Versuchsgruppe. Die Daten wurden von Philip Derleder, Pauline Schepsky und Philipp Fischer erhoben und ausgewertet. Abbildung modifiziert nach Blum et al., 2024.

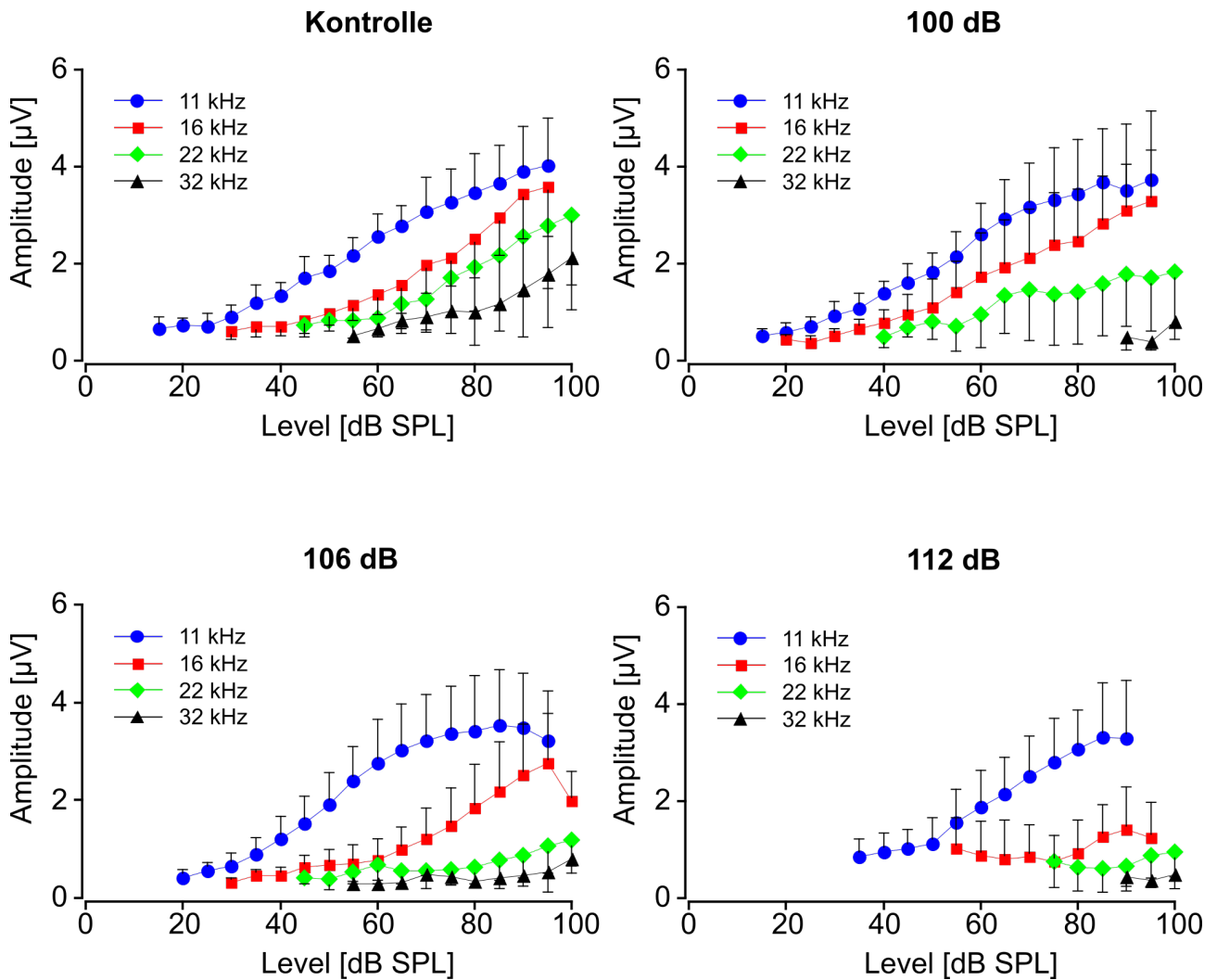
Zur Bestimmung der Hörfunktion wurden an Versuchstieren aller Versuchsgruppen vor, unmittelbar nach dem Schalltrauma, sowie 28 Tage später zwei Typen von ABR-Messungen durchgeführt: zum einen nach Stimulation mit einem breitbandigen Klick (Klick-ABR; Klick-Hörschwellen siehe Abbildung 23A) und zum anderen nach Stimulation mit frequenzspezifischen Reintönen (f-ABR). Aus diesen Reinton-Messungen wurden frequenzspezifische Audiogramme erstellt (Abbildung 23B-D).

Am Tag 0, direkt nach dem Trauma, stiegen oberhalb von 8 kHz die Hörschwellen für alle Traumagruppen an, und zwar besonders stark im Bereich 16 – 32 kHz (Abbildung 23C).

Für das 100 dB SPL-Trauma hatte sich 28 Tage später die Hörschwelle für alle Frequenzen unterhalb von 16 kHz normalisiert. Zwischen 16 und 64 kHz gab es noch immer eine kleine Erhöhung um etwa 15 dB SPL, die jedoch nur bei 45,2 kHz statistisch signifikant war (Abbildung 23D). Vier Wochen nach dem 106 dB SPL-Trauma waren gegenüber der Kontrolle die Hörschwellen bei 16 kHz und 22,6 kHz signifikant erhöht (Abbildung 23D). Unmittelbar nach der Schallexposition mit 112 dB SPL (Abbildung 23C) war die Schwellenerhöhung deutlich ausgeprägter als bei den geringeren Traumastärken, auch bei niederen Frequenzen. Vier Wochen nach Trauma war oberhalb 5,6 kHz (mit Ausnahme von 45 kHz) keine vollständige Regeneration zur Ursprungsschwelle vorhanden und die Schwellen blieben signifikant erhöht (Abbildung 23D). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Stärke der PTS und der Frequenzbereich ihres Auftretens mit der Stärke des Traumas skalierten.

#### **4.6.1 Ergebnisse der Messungen der Welle-I Amplituden**

Aus den f-ABR-Messungen wurden nicht nur die frequenzspezifischen Schwellen, sondern auch die Amplituden der ABR-Welle I ermittelt. Die Amplitude der Welle I entspricht der Summe der Aktionspotentiale im Hörnerv bei einer bestimmten Schallintensität. Durch eine Erhöhung der Schallintensität kann die Anzahl an aktiven Neuronen, und somit die Amplitude der Welle, erhöht werden, bis die Aktivierungsschwelle aller Neuronen erreicht ist. Abbildung 24 zeigt den Anstieg der Amplituden mit steigender Schallintensität („Wachstumsfunktion“) für die Kontrollgruppe und die drei Traumagruppen. Hierbei ist zu beachten, dass die Amplituden bereits für die Kontrollgruppe in unterschiedlichen Frequenzbereichen unterschiedlich groß waren und z.B. im Bereich des besten Hörens (11 kHz) ein Maximum erreichten. Vier Wochen nach dem 100 dB SPL-Schalltrauma zeigte die Welle I ab einer Frequenz von 22 kHz eine reduzierte Wachstumsfunktion (Abbildung 24B). Beim 106 dB SPL-Trauma (Abbildung 24C) waren die Wachstumsfunktionen bereits ab 16 kHz reduziert, nach dem 112 dB SPL-Trauma sogar ab 11 kHz.



**Abbildung 24: Effekte der unterschiedlichen Traumaintensitäten auf die Wachstumsfunktionen der ABR-Welle I 28 Tage nach Trauma**

A-D, Wachstumsfunktionen der mittleren Amplitude  $\pm$  SD der Welle I nach Stimulation bei 11, 16, 22 und 32 kHz der Kontrollgruppe (A) und der Versuchsgruppen 28 Tage nach 100 dB SPL- (B), 106 dB SPL- (C) und 112 dB SPL-Schalltrauma (D). Die SD sind zur besseren Übersicht nur in eine Richtung abgebildet. Die Daten wurden von Philip Derleder, Pauline Schepsky und Philipp Fischer erhoben und ausgewertet. Abbildung modifiziert nach Blum et al., 2024.

Zusammengefasst zeigen die Wachstumsfunktionen der Amplituden der ABR-Welle I, dass die Zahl funktionaler Nervenfasern mit ansteigender Traumastärke und ansteigender Hörfrequenz abnehmen. Dies korreliert mit dem Verlust von Präsynapsen bei mittleren und höheren Frequenzen nach jedem Trauma.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit habe ich mittels hochauflösender Immunfluoreszenzaufnahmen die Anzahl und Größe von Ribbons, den Präsynapsen der IHZ und von Homer1-Clustern als Marker für die Postsynapsen der IHZ an drei Monate alten C57BL/6N-Mäusen entlang der Cochlea analysiert. Die Mäuse hatten vier Wochen zuvor kein Schalltrauma (Kontrolltiere) bzw. ein Schalltrauma von 100, 106 oder 112 dB SPL erhalten. Eine Abnahme von Ribbons im midbasalen und basalen Bereich wurde bei allen Traumata beobachtet und war bei 100 dB SPL bereits gesättigt. Überlebende Ribbons waren häufig größer. Das Trauma reduzierte die Zahl der Postsynapsen wenig; die Größe der Postsynapsen nahm jedoch zu. Als Folge wurden ungepaarte Postsynapsen im medialen, midbasalen und basalen Bereich beobachtet, wohingegen die Ribbons regelmäßig gepaart waren.

### 5.1 Ribbonsynapsen ohne Schalltrauma

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Kontrollgruppen decken sich größtenteils mit vorherigen Erkenntnissen.

In dieser Studie wurde eine durchschnittliche Anzahl von Ribbons von 17,5 pro IHZ, die basal bei 15 pro IHZ liegt, nachgewiesen. Dies entspricht den Ergebnissen der Versuche an den Mäusen des CBA/CaJ-Stamms von Kujawa und Liberman (Kujawa & Liberman, 2009), die für den gleichen Bereich ebenfalls einen Durchschnitt von 17 Ribbons pro IHZ feststellten. Diese Zahlen stimmen gut mit denen von Kim (Kim *et al.*, 2019) und Oestreicher (Oestreicher *et al.*, 2025) an C57BL/6J-Mäusen überein. Basal und apikal wiederum zählten Liberman und Kujawa nur etwa 12 Ribbons pro IHZ. Bei den in dieser Studie verwendeten Kontrolltieren betrug der niedrigste Wert ~14,8 Ribbons pro IHZ in der basalen Windung, während apikal ~16,2 Präsynapsen pro IHZ gezählt wurden. Grund für diese Diskrepanz könnte sein, dass die bei Kujawa und Liberman gemessenen Werte an entkalkten Cochleae noch deutlich höhere Frequenzen mit einbezogen. Diese Cochlea-Region konnte in meinen Versuchen aufgrund der schwierigen Präparation und der durch die höhere Knochendicke in der äußersten basalen Region erschwerten Bildaufnahme nicht berücksichtigt werden. Genetisch bedingte Unterschiede in der Regionen-spezifischen Anzahl der Ribbons zwischen verschiedenen Mauslinien sind nicht auszuschließen (Boussaty *et al.*, 2020; Lavinsky, Kasperbauer, *et al.*, 2021).

Im Gegensatz zu den Ribbons wurde die Zahl der postsynaptischen Strukturen insgesamt seltener quantitativ beschrieben. Ein direkter Vergleich der Immunfärbung der Postsynapsen ist schwierig, da in einigen Studien das Neurofilament der Nervenfasern angefärbt wurde (Kujawa & Liberman, 2009), welches oftmals nicht bis an die Synapse heranreicht (Lin *et al.*, 2011). Weitere Studien

färbten andere Bestandteile der Postsynapse als in der vorliegenden Arbeit, wie PSD95 (Shi *et al.*, 2013) oder direkt verschiedene Glutamat-Rezeptoren (Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Maison, Usubuchi & Liberman, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015; Kim *et al.*, 2019). Die durchschnittliche Anzahl an Synapsen unserer Kontrolltiere bestätigt die bisherigen Ergebnisse anderer Arbeiten.

## **5.2 Synaptischer Phänotyp nach einem Schalltrauma von 100 dB SPL**

Nach dem Trauma von 100 dB SPL konnte apikal keine Verminderung der Ribbonzahl nachgewiesen werden, medial sank die Anzahl der Ribbons/IHZ jedoch um 17 %. Midbasal reduzierte sich die Ribbonzahl um etwa 40 %, und basal um 47 % (Abbildung 15). Bei Kujawa und Liberman wiesen die Mäuse nach Trauma in den höherfrequenten Bereichen (32 kHz) ebenfalls einen Verlust von 50 % der Ribbonsynapsen auf, bei 12 kHz jedoch, was in dieser Studie im medialen Bereich liegt, nur von 10 % (Kujawa & Liberman, 2009). Der beobachtete Verlust entspricht also recht gut den Ergebnissen von Kujawa und Libermans nach dem 100 dB SPL-Trauma (Kujawa & Liberman, 2009). Vergleicht man die ABR-Messungen, stellt man fest, dass sich die Ergebnisse unterscheiden: In der vorliegenden Arbeit kam es ab 16 kHz zu einem transienten Anstieg der Hörschwellen um bis zu 40 dB SPL, der sich für die meisten Frequenzen innerhalb von 28 Tagen nach dem Schalltrauma normalisierte. Nur bei 45 kHz blieb die Hörschwelle gegenüber der Kontrolle erhöht, d.h. hier lag eine permanenten Hörschwellenerhöhung (PTS) vor (Abbildung 23D). Diese könnte z.B. auf einer funktionellen Schädigung der äußeren Haarzellen beruhen (Rüttiger, Zimmermann & Knipper, 2017). Die CBA/CaJ Mäuse wiesen nach Trauma ebenfalls eine Erhöhung um bis zu 40 dB SPL auf, die sich innerhalb von 2 Wochen jedoch vollständig regenerierte, was einer temporären Hörschwellenerhöhung entspricht (TTS) (Kujawa & Liberman, 2009).

Die cochleäre Synaptopathie, die durch das 100 dB SPL-Trauma im Rahmen der vorliegenden Studie verursacht wurde, zeigte sich ebenfalls in einer Vergrößerung der noch vorhandenen Ribbons. Hatten bei den Kontrolltieren die Ribbons in allen Regionen der Cochlea eine mittlere Fläche von 0,16 bis 0,171  $\mu\text{m}^2$ , so stieg sie midbasal auf 0,192  $\mu\text{m}^2$  und basal auf 0,222  $\mu\text{m}^2$  (basal jedoch nicht signifikant, Abbildung 16). In der apikalen und medialen Region blieb die Fläche der Präsynapsen unverändert. In anderen Studien wird die Vergrößerung der Ribbons zwar häufig erwähnt, jedoch selten quantitativ beschrieben (Kujawa & Liberman, 2009; Kim *et al.*, 2019; Reijntjes, Köppl & Pyott, 2020). Eine genaue Angabe zum Volumen der Ribbons ergab eine Vergrößerung vor allem im basalen Bereich (Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Da in der vorliegenden Arbeit die Fläche der Präsynapsen anhand von MIPs bestimmt wurde, ist ein

Vergleich mit den Volumenangaben anderer Autoren nicht möglich. Dennoch kann eine Trauma-induzierte Größenzunahme der Ribbons bei den hohen Frequenzen bestätigt werden.

In der Literatur wurde das Phänomen von Präsynapsen, die ihre Postsynapse und somit ihre Funktion verloren haben, beschrieben (Kujawa & Liberman, 2009; Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). An Mäusen fielen Ribbons auf, die keiner Nervenfasern zugeordnet werden konnten (Kujawa & Liberman, 2009). Bei Meerschweinchen konnten etwa 4 % der Ribbons keinem postsynaptischen Glutamatrezeptor zugeordnet werden, die deshalb als Orphan Ribbons (OR) beschrieben wurden. Dies entsprach zwar nur einem geringen Anteil der Ribbons, war jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe, die etwa 2 % OR aufwies, signifikant erhöht (Furman, Kujawa & Liberman, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten Orphan Ribbons jedoch nicht beobachtet werden, ihre Anzahl lag im Median bei den stärkeren Traumata ebenso wie bei der Kontrollgruppe immer unter 1 OR pro IHz (Abbildung 21).

Im Gegensatz zu den Ribbons war die Postsynapsenzahl kaum vermindert, mit Ausnahme des midbasalen Bereichs, wo das Trauma eine signifikante Verringerung von 17,3 auf 14 Postsynapsen pro IHz bewirkte (vgl. Abbildung 18). Das führte zum Auftreten von ungepaarten Postsynapsen. Waren es in der Kontrollgruppe nur etwa eine ungepaarte Postsynapse pro IHz, so waren es 4 Wochen nach dem Schalltrauma medial durchschnittlich 3,5, midbasal 4,5 und basal 5,1 pro IHz (Abbildung 22). Die fehlenden Ribbons hinterließen also ihre zugehörige Postsynapse. Diese Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Zahl der Postsynapsen kaum verändert war und diese vermehrt ohne zugehörige Präsynapse vorzufinden waren, stehen im Gegensatz zur Beobachtung Libermans und Kujawas, dass sich das Neurofilament betroffener Nervenenden nach dem Schalltrauma bis zum 1. Ranvierschen Schnürring zurückzog (Kujawa & Liberman, 2009).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der OR könnte eine zeitlich begrenzte Internalisierung und damit Verringerung der Glutamat-Rezeptoren an den Postsynapsen sein (Chen *et al.*, 2009). Zwei Stunden nach dem Schalltrauma konnte mit einer Färbung des GluA2-Rezeptors in Frequenzbereichen von 32 und 45 kHz ein Verlust von 40 % der Glutamat-Rezeptoren und ein Anstieg an OR um 40 % gezeigt werden. Die GluA2-Rezeptoren waren bereits eine Woche nach dem Trauma wieder normal exprimiert und die OR nun kaum noch vorhanden (Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Da in der vorliegenden Arbeit die Postsynapse mit einem Antikörper gegen das Postsynapsen-Scaffold-Protein Homer1 gefärbt wurde, kann trotz eines potentiellen Verlustes von Glutamat-Rezeptoren weiterhin eine Aussage zum Vorhandensein der Postsynapsen-Struktur und der Existenz der Nervenfasern getroffen werden.

Die Ursache des Verschwindens der Glutamat-Rezeptoren wird durch die Hypothese der Exzitotoxizität des Glutamats im Rahmen des Schalltraumas erklärt und wird in Abschnitt 5.5.1 näher besprochen.

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse der 100 dB SPL-Versuchsgruppe sagen, dass das Phänomen der cochleären Synaptopathie (Kujawa & Liberman, 2009) bei C57BL/6N-Mäusen reproduziert werden konnte: in den apikalen, niederfrequenten Regionen kam es kaum zu Veränderungen der Synapsen, aber vom medialen Bereich (etwa 6,8-17 kHz) hin zum midbasalen und basalen traten ein erhöhter Verlust an Ribbons, eine Erhöhung der ungepaarten Postsynapsen und eine Vergrößerung der Fläche der verbleibenden Ribbons auf. Die permanente Erhöhung der Hörschwelle bei 45 kHz zeigt im Vergleich zu den CBA/CaJ-Mäusen zusätzlich einen Hörschaden im hochfrequenten Bereich.

### **5.3 Synaptischer Phänotyp bei Steigerung des Schalltraumas auf 106 und 112 dB SPL**

Die Ergebnisse des Traumas mit einer Schallintensität von 106 dB SPL waren denen des 100 dB SPL-Traumas sehr ähnlich. Die Verringerung der Ribbons/IHZ war weder im apikalen noch im medialen Bereich signifikant. Midbasal gab es einen signifikanten Verlust von 41 % der Ribbons und basal von 62 % der Ribbons/IHZ (Abbildung 15). Eine signifikante Flächenvergrößerung der Präsynapsen fand sich in allen Regionen außer apikal (Abbildung 16). Erstmals war in medialen Bereichen eine signifikante Flächenzunahme der Postsynapse von 0,239 auf 0,272  $\mu\text{m}^2$  nachweisbar (Abbildung 19).

Vergleicht man die 106 dB SPL-Versuchsgruppe mit der 100 dB SPL-Gruppe, um eine mögliche stärkere Ausprägung bei höheren Schallintensitäten nachzuweisen, gab es zwei Veränderungen: nach dem 106 dB SPL-Trauma war die Flächenvergrößerung der Ribbons nun schon im medialen Bereich nachweisbar. Zudem gab es eine Tendenz der Abnahme der Ribbons von 47 % auf 62 % in den basalen Regionen. Zu diesem Befund passt die permanente Hörschwellenerhöhung bei den höheren Frequenzen, die deutlich ausgeprägter als nach dem 100 dB SPL-Trauma war. Oberhalb von 16 kHz blieb nach 28 Tagen eine PTS von bis zu 20 dB zurück.

Durch eine Erhöhung der Schallintensität ließ sich also auch bei bisher nicht betroffenen, niedrigeren Frequenzbereichen ein Schaden auslösen, sowohl auf funktionaler als auch auf histologischer Ebene. Überraschenderweise wurde in den bereits betroffenen Frequenzregionen das Ausmaß der Synaptopathie nicht verstärkt. ABR-Messungen geben jedoch einen Hinweis auf eine stärkere Hörschwellenerhöhung. Vermutlich waren dort die ÄHZ während des Traumas funktionell so beeinträchtigt, dass die IHZ dieser Bereiche nicht stärker als beim 100 dB SPL-Trauma angeregt wurden, weswegen der synaptische Schaden nicht mit der Traumastärke skalierte.

Nach dem 112 dB SPL-Trauma erweiterte sich die TTS tendenziell sogar in den niedrigfrequenten Bereich und die PTS war nach 28 Tagen im mittel- bis hochfrequenten Bereich ausgeprägter als

nach dem 106 dB SPL-Trauma (Abbildungen 23 und 24). Man würde erwarten, dass auch die Ribbonanzahl nach dem 112 dB SPL-Trauma stärker absank. Überraschenderweise war der Verlust an Präsynapsen jedoch bei den hohen Frequenzen tendenziell geringer als nach dem 106 dB SPL-Trauma. Der permanente Hörschaden ist daher eher auf andere Strukturen und Funktionen als funktionelle Ribbonsynapsen zurückzuführen, wie funktionelle Schäden der ÄHZ oder der lateralen Wand (Wang, Hirose & Liberman, 2002; Natarajan, Batts & Stankovic, 2023). Eine Zunahme der Postsynapsenfläche in allen cochleären Regionen mit Ausnahme der basalen Region war im Vergleich zu den Ergebnissen nach dem 106 dB SPL-Trauma die einzige signifikante Veränderung (Abbildung 19). Die Flächenvergrößerung der Homer1-Signale könnte möglicherweise durch die stärkere Exzitotoxizität ausgelöst worden sein (vgl. Abschnitt 5.5.1). Interessant ist, dass die Vergrößerung der Postsynapsen im verwendeten Frequenzbereich des Schalltraumas (8 – 16 kHz) am ausgeprägtesten war und nicht in den hochfrequenten Cochlea-Regionen, in denen der Schaden zu erwarten wäre (Kujawa & Liberman, 2009; Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Shi *et al.*, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Dies könnte ein Zeichen sein, dass die maximale Ausprägung der cochleären Synaptopathie mit 106 dB SPL erreicht ist und nun mit 112 dB SPL andere, stärker die Postsynapse betreffende Mechanismen ausgelöst werden (Wang, Hirose & Liberman, 2002).

## 5.4 Mögliche methodische Fehlerquellen

Eine erste mögliche und zukünftig vermeidbare Fehlerquelle liegt in der Auswahl der Versuchstiere. Unterschiede in der Geschlechter-Zusammensetzung der Versuchgruppen sowie Altersunterschiede von maximal 10 Tagen sollten nach Möglichkeit vermieden werden, um eine bessere Homogenität der Gruppen und somit eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Dies war leider nicht immer möglich, weshalb bei kommenden Versuchen ein flexiblerer Versuchsplan vorzuziehen wäre, um die unvorhersehbaren Zusammensetzungen und Termine der Würfe der Mausezucht besser abzufangen. Unsere Versuchstiere hatten eine Altersspanne von 46 bis 56 Tagen und somit zum Teil mehr als eine Woche Altersunterschied. Bei CBA/CAJ-Mäusen im Alter von 4-8 Wochen wurde eine signifikant höhere Anfälligkeit gegenüber Schalltrauma im Vergleich zu Tieren älter als 8 Wochen nachgewiesen (Kujawa & Liberman, 2006). Unsere Tiere befinden sich somit im Übergangsbereich der zwei untersuchten Altersgruppen.

Sowohl bei Mäusen (Shuster *et al.*, 2021), als auch beim Menschen (Aloufi *et al.*, 2023) konnte ein protektiver Effekt des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen auf die Hörschwellen nachgewiesen werden. Andererseits konnte bei Frauen ein erhöhter Anteil an schnell leitenden AMPA-Rezeptoren an Synapsen der SGN festgestellt werden (Lozier *et al.*, 2023). Für diese AMPA-Rezeptoren mit fehlender GluA2-Untereinheit konnte eine höhere Exzitotoxizitäts-

Anfälligkeit nachgewiesen werden (Guo & Ma, 2021). Da die 112 dB SPL-Versuchsgruppe als einzige ausschließlich aus männlichen Tieren bestand, kann das Geschlecht als möglicher Einflussfaktor nicht ausgeschlossen werden.

Die Gewinnung von Daten im hochfrequenten (basalen) Bereich der Cochlea ist erschwert. Einerseits zeigen die Ergebnisse der ABR-Messungen bei 32 kHz eine große Variabilität, da bei dieser Frequenz häufig Messartefakte auftraten. Zudem ist die Präparation der basalen Cochlea-regionen äußerst schwierig: die fragilen hochfrequenten Windungen sitzen tief im Felsenbein und sind somit nur schwer unbeschadet herauszulösen. Zusätzlich können die basalen Pole der IZH partiell unterhalb der Knochenspange in der Cochlea liegen, was im betroffenen Gebiet zu einer Streuung des Lichts führt und eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale unmöglich macht, was in der Summe zu einer geringeren Datenmenge im basalen Bereich führt. Durch eine Erhöhung der Versuchstierzahlen könnte diese Problematik zumindest zum Teil behoben werden.

Ein weiteres Problem bei der Auswertung der Signale ist, dass vor allem der Homer1-Antikörper an unspezifische Proteine bindet und somit eine schwache Hintergrundfärbung an der Kutikularplatte – also fern der Synapsen - verursachen kann. Bereiche mit Hintergrundfärbung wurden vor der Quantifizierung manuell aus der MIP ausgeschnitten, was jedoch nicht immer vollständig möglich war. In diesem Fall musste dann ein höherer Schwellenwert zur Signalanalyse gewählt werden, mit dem Risiko, dass dabei auch schwächere, aber spezifische Homer1-Signale unter die Schwelle fielen. Andererseits können bei zu niedriger Schwelle sich überlagernde Signale nicht mehr voneinander getrennt werden. Es ist generell nicht einfach, ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu finden. Dennoch ist die automatisierte Quantifizierung durch FIJI einer manuellen Zählung aller Einzelsignale vorzuziehen. Gründe hierfür sind unter anderem eine Gewährleistung der Objektivität und standardisierten Zählweise, da der Experimentator so nicht jedes Signal einzeln und subjektiv bewerten muss. Auch der zeitliche Aspekt ist zu berücksichtigen, da die manuelle Auswertung ein Vielfaches an Zeit benötigt und zu einer raschen Ermüdung und Unachtsamkeit des Zählenden führt, die wiederum vermehrt Fehler mit sich bringen.

Für die Zählung der ungepaarten Prä- und Postsynapsen ist eine automatisierte Quantifizierung leider nicht möglich, weshalb die Gefahr der Subjektivität der Auswertung gegeben ist. Um subjektive Fehler zu minimieren, wurden alle 461 MIP-Datensätze zunächst verblindet und erst danach bearbeitet. Bei der Zählung wurden regelmäßige Pausen eingelegt, um Flüchtigkeitsfehler zu verhindern.

## 5.5 Das Phänomen des Hidden Hearing Loss und der cochleären Synaptopathie

### 5.5.1 Pathomechanismus des milden Schalltraumas

Wie eingangs bereits erwähnt, gibt es eine Vielzahl möglicher Mechanismen, die durch ein mildes Schalltrauma zum Phänomen der cochleären Synaptopathie führen können.

Die Exzitotoxizität des Glutamats spielt eine wichtige Rolle (Pujol & Puel, 1999; Kujawa & Liberman, 2009), da nach Schalltrauma initial die Postsynapsen anschwellen (Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Dieser Vorgang wird einer toxischen Glutamat-Wirkung zugeschrieben, wie anhand einer intracochleären Glutamatapplikation am narkotisierten Meerschweinchen gezeigt wurde (Pujol *et al.*, 1993). Ein Teil der Glutamatrezeptoren (GluA2) an der Postsynapse der IZH ist  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel. Wurden diese speziellen GluA2-Rezeptoren pharmakologisch blockiert, war der synaptopathische Schaden weniger ausgeprägt (Hu, Rutherford & Green, 2020). Daraus kann man schließen, dass der postsynaptische Schaden letztlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Toxizität verursacht wurde. Nach dem 100 dB SPL-Trauma bildet sich die Schwellung der Postsynapse rasch zurück (Pujol & Puel, 1999; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015) und kann somit in dieser Studie mit einem Beobachtungszeitpunkt von 28 Tagen nach Schallexposition nicht überprüft werden.

Für die Rolle des Glutamats als Verursacher des postsynaptischen Schadens spricht außerdem der reversible Rückgang der GluA2-Rezeptoren an der IZH-Synapse unmittelbar nach erfolgreichem Schalltrauma um bis zu 40 %, was als eine protektive Verringerung der Rezeptorenzahl zum Schutz der SGN vor übermäßiger Erregung gewertet wird (Chen *et al.*, 2009; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Außerdem konnte bei Knock-Out Mäusen für den vesikulären Glutamat-Transporter-3 (Vglut3) und somit fehlender synaptischer Glutamat-Freisetzung durch die IZH ein Ausbleiben synaptischer Schäden nach Schalltrauma gezeigt werden (Kim *et al.*, 2019).

Nach der Schallexposition kommt es mutmaßlich zu einem Ablösen der beschädigten Synapsen (Pujol & Puel, 1999). Die Nervenfasern der SGN ziehen sich von der IZH zurück, sind aber noch vorhanden (Kujawa & Liberman, 2009), weshalb durch eine Färbung mit PSD95 (Shi *et al.*, 2013), oder Homer1 noch postsynaptische Anteile der zerstörten Synapse nachweisbar waren. Möglich ist, dass bei Loslösung der Synapsenpartner die Ribbons von der IZH abgebaut werden. Dies könnte eine Erklärung für den Verlust der Ribbons in CBA/CaJ-Mäusen nach Schallexposition sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht beobachtet, dass sich Postsynapsen von der IZH zurückzogen. Tatsächlich hätte man für eine solche Analyse Nervenfasern ko-färben, zeitlich und räumlich verfolgen und quantifizieren müssen. In großem Umfang kann es jedoch nicht zu einem Rückgang der Nervenfasern gekommen sein, weil die Abnahme der Postsynapsen im mittel- bis

hochfrequenten Bereich deutlich geringer als die Abnahme der Ribbons war (Abbildungen 15 und 18), was zu der erhöhten Anzahl von ungepaarten Postsynapsen an der IHZ führte (Abbildung 22). In der vorliegenden Arbeit konnte bei höheren Trauma-Intensitäten im medialen und midbasalen Bereich eine Größenzunahme der Homer1-Cluster festgestellt werden. Dies könnte auf eine kompensatorische Vergrößerung/Verstärkung der Postsynapse hinweisen, weil der gegenüberliegende präsynaptische Teil zerstört wurde oder beschädigt war. Andererseits könnte die Vergrößerung eine Stabilisierung von gepaarten Synapsen erklären; sie würde eher zum niedrigen Frequenzbereich passen, da hier der Schaden geringer ausgeprägt war. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, müssten die Größen der gepaarten gegenüber den ungepaarten Postsynapsen getrennt bestimmt werden.

Für die Trauma-induzierte Übererregung der präsynaptischen Seite spielen der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle, Mechanismen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung, des Herauspumpens von  $\text{Ca}^{2+}$  und die Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Durch die Depolarisation der IHZ kommt es zum Öffnen der spannungsgesteuerten  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Ribbonsynapsen befinden, und zur Exozytose (Wong *et al.*, 2014). Ein Schalltrauma würde die  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle stark aktivieren und könnte präsynaptisch exzitotoxisch wirken. Es zeigte sich aber, dass der präsynaptische Schaden nicht allein vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, sondern auch von der Glutamatfreisetzung abhängig ist. (Kim *et al.*, 2019) In Versuchen mit Schalltrauma an Vglut3-Knock-Out-Mäusen blieben bei fehlender vesikulärer Glutamatfreisetzung nicht nur postsynaptische, sondern auch präsynaptische Schäden aus, was den Schluss nahelegt, dass die großen depolarisationsbedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme während des Traumas allein nicht ausreichen, um Ribbons zu zerstören (Kim *et al.*, 2019). Der Mechanismus einer vermuteten retrograden Glutamatwirkung auf die IHZ ist jedoch unbekannt.

An Ribbonsynapsen des Seitenlinienorgans von Zebrafischen wurde die präsynaptische  $\text{Ca}^{2+}$ -Toxizität eingehend untersucht. Nach einer Stimulation der Haarzellen konnte eine Zunahme der intramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen werden. Wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Mitochondrien verhindert, kam es unter anderem zu einer Reduktion der Ribbonzahl, sowie zu einer Vergrößerung der übrigen Ribbons (Wong *et al.*, 2019). Dies zeigte die protektive Rolle der Mitochondrien bei hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Präsynapse. Dieser protektive Effekt der Mitochondrien könnte daher bei starker Depolarisation in Bereichen mit wenigen Mitochondrien nicht genügen, um die Synapsen vor Schaden zu bewahren (vgl. Abschnitt 5.5.2). Die Größenzunahme der Ribbons konnte unter anderem auf eine erhöhte  $\text{NAD}^+$ -Konzentration zurückgeführt werden. Ribbons besitzen einen  $\text{NAD}^+$  bindenden Bereich (Wong *et al.*, 2019), der maßgeblich für die Größenregulation verantwortlich ist, wie die Größenzunahme nach exogener Zugabe von  $\text{NAD}^+$  vermuten lässt. Allerdings war dieser Mechanismus nur in Haarzellen von Zebrafischen nachweisbar, die sich noch in ihrer Entwicklung befanden (Wong *et al.*, 2019).

Man kann vermuten, dass die Veränderungen der Präsynapsen in der vorliegenden Arbeit auf ähnlichen Mechanismen beruhen: eine erhöhte präsynaptische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die nicht vollständig von den Mitochondrien herausgepumpt bzw. gepuffert werden kann, verursachte sowohl ein Ablösen als auch den Verlust von Ribbons. Die Vergrößerung der noch intakten oder teilweise regenerierten Ribbons könnte durch eine hohe intrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentration verursacht worden sein.

Neben dem primären Schaden mit einem Verlust von Präsynapsen konnte an CBA/CAJ-Mäusen 64 Wochen nach dem Trauma ein sekundäres Verschwinden von bis zu 50 % der afferenten SGN nachgewiesen werden (Kujawa & Liberman, 2009). Die beschädigten SGN-Fasern waren noch eine Zeit lang vorhanden, bevor die SGN-Zellkörper gänzlich zugrunde gingen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein so später Zeitpunkt nicht untersucht werden. Zudem ist das Mausmodell C57BL/6N wegen der früh einsetzenden Altersschwerhörigkeit (Kane *et al.*, 2012) für eine längere Verlaufsstudie ungeeignet.

### **5.5.1 Selektiver Verlust von Nervenfasern mit niedriger Spontanaktivität?**

Frühere Studien zeigten einen selektiven Verlust der LSR-Fasern nach Schalltrauma (Kujawa & Liberman, 2009; Furman, Kujawa & Liberman, 2013). Aktuellere Arbeiten bestätigen zwar eine Vulnerabilität und überwiegenden Verlust von LSR(lc)-Fasern, allerdings konnte ein geringer, zusätzlicher Verlust von HSR(la)-Fasern gezeigt werden, der jedoch noch keine Auswirkung auf die Hörschwelle zu haben scheint (Suthakar & Liberman, 2021).

Die mit der modiularen Seite der IHZ verbundenen LSR-Fasern sind vermutlich besonders vulnerabel, weil wegen des geringeren Vorkommens des GLAST-Glutamat-Rücktransporters in den modiularen Stützzellen die toxische Wirkung einer erhöhten Glutamat-Konzentration verstärkt werden würde (Hakuba *et al.*, 2000; Furness & Lawton, 2003). Eine geringere Mitochondrienzahl in LSR-Fasern gegenüber den HSR-Fasern (Liberman, 1980) führt einerseits zu einem schnelleren Energiedefizit, andererseits dazu, dass die bei der Depolarisation in die SGN einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht durch Mitochondrien gepuffert bzw. unter ATP-Verbrauch herausgepumpt werden können (Liberman, 1980; Szydlowska & Tymianski, 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in den HSR (la)-Fasern gegenüber den anderen Fasertypen eine stärker ausgeprägte zelluläre Reparatur durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ATF3/ATF4-Signalkaskade nach Lärmexposition induziert wurde (Milon *et al.*, 2021).

Sowohl das höhere GLAST-Transporter-Vorkommen in den Stützzellen an der pillären IHZ-Seite (Furness & Lawton, 2003), als auch die höhere Anzahl an Mitochondrien in den HSR-Fasern

(Liberman, 1980) könnten bei höheren Schallintensitäten nicht mehr ausreichen, um die Exzitotoxizität abzufangen, weshalb ein zunehmender Schaden auch bei den robusteren HSR-Fasern zu erklären wäre.

Da in dieser Studie eine PTS vorliegt, könnte es sein, dass bereits nach 100 dB SPL nicht mehr nur die vulnerablen LSR-Fasern, die nicht für die Hörschwelle zuständig sind, betroffen sind, sondern ebenfalls ein Teil der HSR-Fasern mit niedriger Erregungsschwelle beschädigt werden, weshalb die Erholung der Hörschwelle nicht vollständig ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass ein funktioneller Schaden der ÄHZ im Hochfrequenzbereich für die PTS verantwortlich ist (Blum *et al.*, 2024), siehe 5.5.2.

### **5.5.2 Ursachen der permanenten Hörschwellenerhöhung**

Die für die cochleäre Synaptopathie typische temporäre Erhöhung der Hörschwelle kurz nach dem Trauma kann auf einen Funktionsverlust der ÄHZ durch Beschädigung der Tip-links und der Stereozilien zurückgeführt werden (Kujawa & Liberman, 2009; Lin *et al.*, 2011; Furman, Kujawa & Liberman, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015; Natarajan, Batts & Stankovic, 2023). Für die permanente Erhöhung, die in der vorliegenden Arbeit im hochfrequenten Bereich bereits nach 100 dB SPL Schalltrauma nachzuweisen ist, können mehrere mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden.

Auch hier könnten die ÄHZ betroffen sein, wobei der Zelltod von ÄHZ 4 Wochen nach den Schalltraumata von 100 – 112 dB SPL ausgeschlossen werden kann. An denselben Cochleapräparaten, an denen ich die Prä- und Postsynapsen analysiert habe, hat Kerstin Blum das Vorhandensein der ÄHZ mittels DAPI-Färbung der Zellkerne untersucht. Der zelluläre Verlust der ÄHZ entlang der Cochlea lag im geringen Prozentbereich und nirgendwo über dem der nichtexponierten Kontrolltiere (Blum *et al.*, 2024). Interessanterweise wurde an CBA/CaJ-Mäusen im Rahmen der cochleären Synaptopathie ein erheblicher Verlust an ÄHZ in Bereichen  $\geq 45$  kHz beschrieben (Liberman, Suzuki & Liberman, 2015), was an unseren Präparaten nicht der Fall war. Für funktionelle Analysen der ÄHZ wäre die prä- und posttraumatische Messung von otoakustischen Emissionen erforderlich gewesen, die jedoch nicht zur Verfügung stand. Eine Trauma-bedingte Einschränkung der Funktion der ÄHZ im hochfrequenten Bereich kann in der vorliegenden Arbeit folglich nicht ausgeschlossen werden und ist sogar wahrscheinlich (Rüttiger, Zimmermann & Knipper, 2017).

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass ein Verlust von HSR-Synapsen für die PTS verantwortlich ist. Tatsächlich war die Amplitude der Welle I bei 22 kHz um 60 % reduziert. Diese Reduktion resultiert vermutlich aus dem Verlust funktionaler Ribbonsynapsen, aber auch aus der schwächeren Anregung durch die ÄHZ. Die Beteiligung von Synapsen mit HSR-Fasern könnte nur mit Fasertyp-

spezifischen Antikörpern oder genetisch kodierten Fluoreszenzmarkern (Shrestha *et al.*, 2018) und 3D-Bildgebung geklärt werden.

Da unsere Experimente an C57BL/6N-Mäusen nach 100 dB SPL eine PTS bei 45 kHz ergaben, sollte künftig mit niedrigerer Schallintensität nach der Auslösungsschwelle der cochleären Synaptopathie, bei der nur ein TTS besteht, gesucht werden.

Die unterschiedliche Ausprägung der Synaptopathie bei CBA/CaJ- und C57BL/6N-Mäusen zeigt, dass es erhebliche Unterschiede bezüglich der Anfälligkeit der verschiedenen Mauslinien gegenüber Schalltrauma gibt, was vor kurzem systematisch untersucht und bestätigt wurde (Lavinsky, Kasperbauer, *et al.*, 2021; Lavinsky, Mendonça, *et al.*, 2021; Early *et al.*, 2022). Sowohl genetische Unterschiede zwischen den Mausstämmen oder aber Schutzmechanismen, die durch die Narkose der Tiere beeinflusst werden könnten, könnten eine wichtige Rolle spielen und werden im folgenden Abschnitt weiter ausgeführt.

### **5.5.3 Regenerations- und Schutzmechanismen der Cochlea**

Der auditive Apparat der Säugetiere besitzt mehrere Schutz- und Reparaturmechanismen, die bei unterschiedlichen Schäden zum Einsatz kommen. Bei zu lauten und schmerzhaften Schalleindrücken kann zum Beispiel die Impedanzanpassung des Mittelohres durch den Stapediusreflex (Brask, 1979) oder den Musculus tensor tympani (Wickens, Floyd & Bance, 2017) vermindert werden. Diese Reflexe können bereits einige Schäden verhindern, ermüden jedoch schnell. Die in dieser Studie verwendeten Versuchstiere befanden sich während des Schalltraumas in tiefer Narkose, weshalb diese Reflexe vermindert oder ausgeschaltet waren, im Gegensatz zu den CBA/CaJ Mäusen in den Liberman-Studien, die ohne Narkose dem Schall ausgesetzt waren (Kujawa & Liberman, 2009). Dies könnte ein möglicher Grund für den ausgeprägteren Schaden, die PTS im Hochfrequenzbereich, sein.

Eine Schallexposition ohne Narkose ist für das Tier mit einer zusätzlichen Stressreaktion verbunden, die mit einer Cortisol-Ausschüttung einhergeht (Pouryaghoub, Mehrdad & Valipouri, 2016). In einer Vergleichsstudie wurden anästhesierte und wache FVB-Mäuse dem gleichen Schallpegel ausgesetzt. Die narkotisierten Tieren wiesen zwar eine höhere TTS auf, die PTS war jedoch nach 1 – 2 Wochen bei beiden Gruppen gleich (Jongkamonwiwat *et al.*, 2020). Ob dies auch für den synaptischen Schaden gilt und ob eine Cortisol-Ausschüttung hierfür ursächlich ist, ist unklar und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Ein weiterer Schutzmechanismus ist die variable Verstärkung der Schallübertragung durch die ÄHZ. Fallen die ÄHZ aus, so ist die Hörschwelle um etwa 40 bis 60 dB SPL erhöht (Liberman *et al.*, 2002; Weddell *et al.*, 2011). Da zu vermuten ist, dass die ÄHZ im Laufe der in dieser Studie applizierten Schalltraumata ihre Funktion temporär verlieren, kann dies zu einer Verminderung der

auf die IHZ treffende Schallintensität führen und so einen vielleicht deutlich stärkeren Schaden verhindern.

Ist der Schaden eingetreten, können verschiedene Regenerationsmechanismen einen Wiederaufbau der Synapsen begünstigen. Es konnte gezeigt werden, dass wenige Stunden nach dem Schalltrauma der Verlust an Synapsen deutlich ausgeprägter ist und sich im Laufe der nächsten Wochen zurückbildet bis der 40%ige Verlust der cochleären Synaptopathie erreicht ist (Shi *et al.*, 2013; Liberman, Suzuki & Liberman, 2015). Es findet also eine teilweise Regeneration statt, die eventuell beeinflusst werden könnte. Mehrere physiologische Prozesse werden nach einem Trauma aktiviert, unter anderem eine Immunreaktion. Es kommt zur Infiltration der Cochlea, vor allem der Spiralganglien, mit Makrophagen. Diese werden insbesondere durch Fractalkin aktiviert, dass von beschädigten Nervenzellen ausgeschüttet wird und deren Regeneration begünstigt. In Fractalkin-Rezeptor-Knock-Out-Mäusen war die posttraumatische Regeneration deutlich vermindert und der dauerhafte Schaden deutlich ausgeprägter (Kaur *et al.*, 2019).

Ein weiterer wichtiger Faktor der Regeneration ist Neutrophin-3 (NT3). In vitro konnte durch eine Gabe von Glutamat-Rezeptor-Agonisten eine Exzitotoxizität simuliert werden und durch Zugabe von exogenem Neutrophin-3 gezeigt werden, dass deutlich mehr Synapsen regenerierten. Umgekehrt konnte eine Blockade des endogenen Neutrophin-3 die Regeneration verschlechtern (Wang & Green, 2011). Auch in vivo konnte mithilfe von Versuchen an NT3-Knock-Out-Mäusen die Notwendigkeit des Neutrophin-3 bei der Regeneration von Synapsen nach einem Schalltrauma gezeigt werden (Wan *et al.*, 2014).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass nicht nur der synaptische Schaden Glutamat-abhängig ist, sondern auch die posttraumatische Regeneration von einer Glutamatfreisetzung abhängt. In Schalltrauma-Versuchen mit heterozygoten Vglut3-Knock-Out-Mäusen erfolgte die Regeneration beschädigter Synapsen schlechter als beim Wildtyp (Kim *et al.*, 2019).

Die in HSR(Ia)-Fasern ausgeprägtere ATF3/ATF4-Signalkaskade nach Lärmexposition scheint ebenfalls ein weiterer Mechanismus zur Schadensbegrenzung zu sein. Im Allgemeinen konnten in unterschiedlichen Zellen des Innenohrs als Reaktion auf ein Schalltrauma eine veränderte Expression einer Vielzahl von Genen beobachtet werden, was auf mögliche Schutz- und Reparaturmechanismen hindeutet (Milon *et al.*, 2021).

#### **5.5.4 Vulnerabilität der basalen Cochlea**

Eines der auffälligsten Merkmale des Phänomens des Hidden Hearing Loss ist, dass Hörschaden und Synaptopathie ihre stärkste Ausprägung oberhalb des Frequenzbereich des Schalltraumas haben, also in der midbasalen und basalen Region der Cochlea. Hochtenschwerhörigkeit tritt analog dazu bei der Altersschwerhörigkeit, der Presbyakusis auf, bei der mit zunehmendem Alter

bei Menschen und anderen Säugetieren die Hörschwelle insbesondere bei höheren Frequenzen ansteigt. In Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen ließ sich ein mit zunehmendem Alter ansteigender Verlust von bis zu 50 % der Synapsen nachweisen, ohne dass die Tiere einem Trauma ausgesetzt waren (Sergeyenko *et al.*, 2013; Kujawa & Liberman, 2019). In *post mortem* untersuchten Felsenbein-Präparaten von Menschen zeigte sich histologisch ein Verlust von ÄHZ und IHZ, und zwar besonders im basalen Bereich (Wu *et al.*, 2019, 2021). Hörnervenfasern bzw. SGN nahmen altersabhängig ebenfalls ab. In Bereichen ab 10 kHz wurde in einer anderen Studie ein Verlust von Ribbons an den verbliebenen IHZ festgestellt, und 20 % bis 80 % der verbliebenen Ribbons konnten als ungepaarte Orphan Ribbons identifiziert werden (Viana *et al.*, 2015). Auch ototoxische Substanzen wie Aminoglykoside verursachen Schäden überwiegend in den hohen Frequenzbereichen (Oishi, Talaska & Schacht, 2012). Die IHZ, ÄHZ und die Synapsen der basalen Cochlea sind also besonders anfällig für altersbedingte, lärminduzierte und pharmakologische Schäden. Dies ist vermutlich auf schlechtere Reparaturmechanismen im basalen Bereich, bedingt durch das kleinere Volumen der Sinneszellen, zurückzuführen. ÄHZ regeln z.B. nach Schalltrauma insbesondere Gene für Kaliumtransport und RNA-Metabolismus herunter (Milon *et al.*, 2021). Aufgrund der tonotopen Anpassungen sind die Zellvolumina der basalen Haarzellen deutlich kleiner als die in anderen Frequenzbereichen, und es sind daher wahrscheinlich weniger Proteine für Reparaturmechanismen vorhanden (Fettiplace, 2017). Die biochemische Kapazität, eine  $Ca^{2+}$ -Überladung zu eliminieren, ist in basalen Haarzellen tatsächlich geringer ausgeprägt (Fettiplace & Nam, 2019).

### **5.5.5 Cochleäre Synaptopathie beim Menschen**

Es stellt sich die Frage, ob es cochleäre Synaptopathie auch beim Menschen gibt. Da der Schaden überwiegend die LSR-Fasern betrifft, die erst bei höheren Pegeln aktiviert werden, vermutet man eine Manifestation vor allem bei lauten Hintergrundgeräuschen. Das Sprachverständnis im Störgeräusch könnte also bei einer cochleären Synaptopathie eingeschränkt sein. Einem Menschen mit normaler Hörschwelle würde es bei lauter Musik oder mehreren Gesprächen im Hintergrund schwerer fallen, das vom Gesprächspartner Gesprochene herauszufiltern („Cocktailpartyeffekt“). Dieses Phänomen betrifft Menschen fast aller Altersgruppen, wobei es vermehrt bei älteren Menschen zu finden ist und oftmals eine große Belastung in der täglichen Kommunikation darstellt (Grant *et al.*, 2022). In einer Studie von Bharadwaj *et al.* aus dem Jahr 2015 wurden erwachsenen Menschen unterschiedlichen Alters mit normaler Hörschwelle und normaler Funktion der ÄHZ einfache Aufgaben gestellt, die ein selektives Hören erforderten. Die Ergebnisse wurden mit potentiellen Risikofaktoren mit lauter und häufiger Schallexposition, z.B. häufigem Konzert- oder Discobesuch korreliert. Das Ergebnis war eindeutig: Menschen, die

häufiger hohen Schallintensitäten ausgesetzt waren, schnitten deutlich schlechter ab und wiesen ein Defizit in ihrer Fähigkeit des Sprachverständnisses im Störgeräusch auf (Bharadwaj *et al.*, 2015). Auch in anderen Studien konnte der Zusammenhang zwischen einer Schallexposition und einem Verlust dieser Fähigkeit ohne Hörschwellenerhöhung nachgewiesen werden (Kumar, Ameenudin & Sangamanatha, 2012; Hope, Luxon & Bamiou, 2013).

In einer anderen Studie wurde in einer Gruppe von 2783 Probanden eine Prävalenz für die subjektive Beeinträchtigung des Sprachverständnisses im Störgeräusch bei intakter Hörschwelle von 2,9 % festgestellt (Tremblay *et al.*, 2015).

Es ist allerdings schwierig, diese klinischen Befunde mit einem histologischen Befund der cochleären Synaptopathie in Verbindung zu bringen. Hirnstammableitungen mit Analyse der kleinen Welle I sind beim Menschen aufgrund der Schädeldicke wenig aussagekräftig. Um einen Verlust von Nervenfasern trotz intakter Hörschwelle nachzuweisen, wäre eine Planung und Durchführung von immunhistochemischen Studien zeitaufwendig und ethisch sowie methodisch schwierig. Um mithilfe von *post mortem* gewonnen Cochlea-Präparaten Untersuchungen durchzuführen, müsste man im voraus Fall-Kontroll-Gruppen bezüglich einer Schallexposition und einer Einschränkung des Sprachverständnisses erstellen, um dann auf den Tod der Probanden zu warten. Zusätzlich ist es fast unmöglich, einen Menschen ein Leben lang vor Schallexpositionen zu bewahren, weshalb keine idealen Kontrollbedingungen vorliegen würden. In einer *post mortem* Studie wurde mit zunehmendem Alter der Körperspender ein bis zu 60%iger Verlust von peripheren Nervenfasern gegenüber einem 15%igen Verlust von IZH gezeigt, was für einen deutlichen Verlust von Synapsen sprach (Wu *et al.*, 2019). Dies erlaubt jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf die Ursache oder die physiologische Konsequenz des Verlusts, da auch bei Mäusen ein mit zunehmendem Alter physiologischer Verlust der Ribbonsynapsen ohne hohe Schallexposition nachgewiesen werden konnte (Sergeyenko *et al.*, 2013). In einer größer angelegten *post mortem* Untersuchung am Menschen wurden 52 Fälle mit einer Vorgeschichte von Lärmbelastung mit einer Kontrollgruppe ohne vergleichbare Vergangenheit verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Verlust von IZH als auch ÄHZ mit dem Alter zunahm, vor allem in Frequenzbereichen über 2 kHz, allerdings unabhängig von vorheriger Lärmbelastung. Lediglich der höhere Verlust der ÄHZ im Hochfrequenzbereich konnte einer Lärmbelastung zugeschrieben werden. Demgegenüber war der Verlust von Hörnervenfasern eindeutig in allen Frequenzbereichen auf eine Lärmbelastung zurückzuführen (Wu *et al.*, 2021).

Da im hohen Alter die Altersschwerhörigkeit immer stärker ausgeprägt ist, wird sich der Verlust der LSR-Fasern und somit die cochleäre Synaptopathie beim Menschen also nur schwer belegen lassen. Da wir Menschen im Laufe unseres Lebens zahlreichen Schallereignissen ausgesetzt sind, stellt sich die Frage, ob der Synapsenverlust der cochleären Synaptopathie eine übliche Begleiterscheinung der Presbyakusis im Alter ist.

Ein vielversprechender Ansatz in der Forschung am Menschen ist die Funktion des Stapedius-Reflexes. Valero konnte einen Zusammenhang zwischen einer cochleären Synaptopathie und einem eingeschränkten Reflex an CBA/CaJ-Mäusen nachweisen, dass LSR-Fasern für die Feedback-Innervation des Muskelreflexes verantwortlich sind. In den von der cochleären Synaptopathie betroffenen Bereichen war der Reflex deutlich abgeschwächt (Valero *et al.*, 2018). Beim Menschen wäre dies eine nicht-invasive Methode, eine Funktionsstörung der LSR-Fasern zu untersuchen und somit ein wichtiges diagnostisches Instrument.

Vor allem weil die cochleäre Synaptopathie beim Menschen nicht ausreichend erforscht ist, müssen die möglichen Langzeitfolgen eines moderaten Schalltraumas für den Menschen stärker berücksichtigt werden. Die zurzeit geltenden Arbeitsschutzgesetze umfassen bisher lediglich Schallexpositionen, die auch zu einer Erhöhung der Hörschwelle und Verschlechterung des Hörempfindens führen. Geht man nun davon aus, dass auch geringere Schallintensitäten, zumindest nach längerer Expositionsdauer, einen nicht direkt messbaren Schaden verursachen, so müssten die Grenzwerte bzw. die maximalen Expositionszeiten diesen neuen Erkenntnissen angepasst werden. Zurzeit gelten als Grenzwerte 85 dB SPL (A-Bewertet) für maximal 8 h. Wenn am Mausmodell 100 dB SPL nach 2 h bereits irreparablen Schaden verursachen, ist es möglich, dass nach 8 h 85 dB SPL-Exposition bereits ein ähnlicher Schaden auftritt. An Meerschweinchen konnte nach einer Woche mit 85 dB SPL ein Schaden nachgewiesen werden (Maison, Usubuchi & Liberman, 2013). Aus diesem Grund sollten für diese Schallintensität weitere Studien mit kürzerer Exposition durchgeführt werden. Dies würde zwar nicht direkt auf den Menschen übertragbar sein, wäre aber dennoch sehr aufschlussreich. Es würde sich anbieten, die Studie Bharadwajs (Bharadwaj *et al.*, 2015) im größeren Stil in Unternehmen mit Arbeitsplätzen mit einer solchen Lautstärkenbelastung und in vergleichbaren Kontrollunternehmen zu reproduzieren und eventuell langfristig *post mortem* Cochlea-Präparationen wie in den Studien Wus (Wu *et al.*, 2019, 2021) durchzuführen.

Auch breiter angelegte Screening-Untersuchungen im Stile Bharadwajs (Bharadwaj *et al.*, 2015) oder wie die einer neueren Studie des National Institute of Health, NIH (Grant *et al.*, 2022), könnten helfen, Risikogruppen und -Faktoren sowie protektive Faktoren zu identifizieren und die Grenzwerte für den Lärmschutz nicht nur beim Arbeitsschutz, sondern auch im öffentlichen Leben auf den Prüfstand zu stellen.

Neben dem Vermeiden von schädlichen Schallexpositionen kann auch eine pharmakologische Prävention für Risikogruppen in Betracht gezogen werden. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt könnten Glutamat-Rezeptor-Antagonisten eine Möglichkeit darstellen (Puel *et al.*, 1998). Man könnte beispielsweise bei Personen vor einer geplanten beruflichen Schallexposition eine medikamentöse Prophylaxe mit zugelassenen Antagonisten in Betracht ziehen. Das Problem ist allerdings die lokale Applikation ins Innenohr.

Auch die Regeneration bereits beschädigter Synapsen mit Neurotrophin-3 könnte bei Schalltraumatisierten versucht werden (Wang & Green, 2011; Wan *et al.*, 2014), allerdings müsste eine therapeutische Intervention kurze Zeit nach einem Trauma stattfinden, da der sekundäre, vollständige Verlust der SGN wahrscheinlich ist (Kujawa & Liberman, 2009).

Zurzeit befinden sich einige vielversprechende Substanzen in der Entwicklung, eine detaillierte Übersicht bietet der Review von Cousins (Cousins, 2022). Von einer medikamentöse Prophylaxe oder Therapie von Schallempfindungsschäden sind wir zum aktuellen Zeitpunkt allerdings weit entfernt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aloufi, N., Heinrich, A., Marshall, K. & Kluk, K. (2023) 'Sex differences and the effect of female sex hormones on auditory function: a systematic review', *Frontiers in Human Neuroscience*, 17, p. 1077409. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1077409>.
- Bakay, W.M.H., Anderson, L.A., Garcia-Lazaro, J.A., McAlpine, D. & Schaette, R. (2018) 'Hidden hearing loss selectively impairs neural adaptation to loud sound environments', *Nature Communications*, 9(1), p. 4298. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06777-y>.
- Bharadwaj, H.M., Masud, S., Mehraei, G., Verhulst, S. & Shinn-Cunningham, B.G. (2015) 'Individual Differences Reveal Correlates of Hidden Hearing Deficits', *The Journal of Neuroscience*, 35(5), pp. 2161–2172. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3915-14.2015>.
- Blum, K., Schepsky, P., Derleder, P., Schätzle, P., Nasri, F., Fischer, P., Engel, J. & Kurt, S. (2024) 'Noise-induced cochlear synaptopathy in C57BL/6 N mice as a function of trauma strength: ribbons are more vulnerable than postsynapses', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, p. 1465216. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1465216>.
- 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', *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 21(4), pp. 323–336. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10162-020-00762-3>.
- Brandt, A., Striessnig, J. & Moser, T. (2003) 'CaV1.3 Channels Are Essential for Development and Presynaptic Activity of Cochlear Inner Hair Cells', *The Journal of Neuroscience*, 23(34), pp. 10832–10840. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10832.2003>.
- Brask, T. (1979) 'The noise protection effect of the stapedius reflex', *Acta Oto-Laryngologica Supplementum*, 360, pp. 116–117. Available at: <https://doi.org/10.3109/00016487809123490>.
- Buettner, Stöhr, Dichgans & Hess (2005) *Evozierte Potenziale*. 4th edn. Springer.
- Chen, Z., Peppi, M., Kujawa, S.G. & Sewell, W.F. (2009) 'Regulated Expression of Surface AMPA Receptors Reduces Excitotoxicity in Auditory Neurons', *Journal of Neurophysiology*, 102(2), pp. 1152–1159. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.00288.2009>.
- Coate, T. & Conant, K. (2018) 'Brevican "nets" voltage-gated calcium channels at the hair cell ribbon synapse', *BMC Biology*, 16. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0575-7>.
- Costalupes, J.A., Young, E.D. & Gibson, D.J. (1984) 'Effects of continuous noise backgrounds on rate response of auditory nerve fibers in cat', *Journal of Neurophysiology*, 51(6), pp. 1326–1344. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.1984.51.6.1326>.
- Cousins, R. (2022) 'Hearing loss drug discovery and medicinal chemistry: Current status, challenges, and opportunities', *Progress in Medicinal Chemistry*, 61, pp. 1–91. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2022.05.001>.
- Derleder, P. (eingereicht) Effects of noise traumata of different strengths on hearing functions of C57BL/6N mice. Dissertation. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes.
- Early, S., Du, E., Boussaty, E. & Friedman, R. (2022) 'Genetics of noise-induced hearing loss in the mouse model', *Hearing Research*, 425, p. 108505. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2022.108505>.

- Ehrengruber, M.U., Kato, A., Inokuchi, K. & Hennou, S. (2004) 'Homer/Ves1 Proteins and Their Roles in CNS Neurons', *Molecular Neurobiology*, 29(3), pp. 213–228. Available at: <https://doi.org/10.1385/MN:29:3:213>.
- 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), pp. 837–849. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.060>.
- Fell, B., Eckrich, S., Blum, K., Eckrich, T., Hecker, D., Obermair, G.J., Münkner, S., Flockerzi, V., Schick, B. & Engel, J. (2016) ' $\alpha\delta\delta 2$  Controls the Function and Trans-Synaptic Coupling of Cav1.3 Channels in Mouse Inner Hair Cells and Is Essential for Normal Hearing', *The Journal of Neuroscience*, 36(43), pp. 11024–11036. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3468-14.2016>.
- Fettiplace, R. (2017) 'Hair cell transduction, tuning and synaptic transmission in the mammalian cochlea', *Comprehensive Physiology*, 7(4), pp. 1197–1227. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>.
- Fettiplace, R. & Nam, J.-H. (2019) 'Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells', *Hearing research*, 376, pp. 11–21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.002>.
- 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), pp. 577–586. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.00164.2013>.
- Furness, D.N. & Lawton, D.M. (2003) 'Comparative Distribution of Glutamate Transporters and Receptors in Relation to Afferent Innervation Density in the Mammalian Cochlea', *The Journal of Neuroscience*, 23(36), pp. 11296–11304. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-36-11296.2003>.
- Geisler (1998) *From sound to synapse: physiology of the mammalian ear*. Oxford University Press, New York.
- Grant, K.J., Parthasarathy, A., Vasilkov, V., Caswell-Midwinter, B., Freitas, M.E., de Gruttola, V., Polley, D.B., Liberman, M.C. & Maison, S.F. (2022) 'Predicting neural deficits in sensorineural hearing loss from word recognition scores', *Scientific Reports*, 12(1), p. 8929. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13023-5>.
- Guo, C. & Ma, Y.-Y. (2021) 'Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders', *Frontiers in Neural Circuits*, 15, p. 711564. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.711564>.
- Hakuba, N., Koga, K., Gyo, K., Usami, S. & Tanaka, K. (2000) 'Exacerbation of Noise-Induced Hearing Loss in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLAST', *The Journal of Neuroscience*, 20(23), pp. 8750–8753. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08750.2000>.
- Hickox, A.E., Larsen, E., Heinz, M.G., Shinobu, L. & Whitton, J.P. (2017) 'Translational issues in cochlear synaptopathy', *Hearing Research*, 349, pp. 164–171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.12.010>.
- Hope, A.J., Luxon, L.M. & Bamiou, D.-E. (2013) 'Effects of chronic noise exposure on speech-in-noise perception in the presence of normal audiometry', *The Journal of Laryngology and Otology*, 127(3), pp. 233–238. Available at: <https://doi.org/10.1017/S002221511200299X>.

- Hu, N., Rutherford, M.A. & Green, S.H. (2020) 'Protection of cochlear synapses from noise-induced excitotoxic trauma by blockade of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), pp. 3828–3838. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1914247117>.
- Iasevoli, F., Tomasetti, C., Buonaguro, E.F. & de Bartolomeis, A. (2014) 'The Glutamatergic Aspects of Schizophrenia Molecular Pathophysiology: Role of the Postsynaptic Density, and Implications for Treatment', *Current Neuropharmacology*, 12(3), pp. 219–238. Available at: <https://doi.org/10.2174/1570159X12666140324183406>.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M.F.P. & Yong, W.H. (2019) 'An introduction to Performing Immunofluorescence Staining', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, pp. 299–311. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26).
- Jean, P., Lopez de la Morena, D., Michanski, S., Jaime Tobón, L.M., Chakrabarti, R., Picher, M.M., Neef, J., Jung, S., Gültas, M., Maxeiner, S., Neef, A., Wichmann, C., Strenzke, N., Grabner, C. & Moser, T. (2018) 'The synaptic ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision', *eLife*, 7, p. e29275. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.29275>.
- Jeng, J.-Y., Johnson, S.L., Carlton, A.J., DeTomasi, L., Goodyear, R., DeFaveri, F., Furness, D.N., Wells, S., Brown, S.D.M., Holley, M.C., Richardson, G.P., Mustapha, M., Bowl, M.R. & Marcotti, W. (2020) 'Age-related changes in the biophysical and morphological characteristics of mouse cochlear outer hair cells', *The Journal of physiology*, 598(18), pp. 3891–3910. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP279795>.
- 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), p. 108431. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108431>.
- 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), pp. 80–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.11.007>.
- Kaur, T., Clayman, A.C., Nash, A.J., Schrader, A.D., Warchol, M.E. & Ohlemiller, K.K. (2019) 'Lack of Fractalkine Receptor on Macrophages Impairs Spontaneous Recovery of Ribbon Synapses After Moderate Noise Trauma in C57BL/6 Mice', *Frontiers in Neuroscience*, 13, p. 620. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00620>.
- Kim, K.X., Payne, S., Yang-Hood, A., Li, S.-Z., Davis, B., Carlquist, J., V-Ghaffari, B., Gantz, J.A., Kallogjeri, 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', *The Journal of Neuroscience*, 39(23), pp. 4434–4447. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2228-18.2019>.
- Klinke, R., Silbernaagl, S. & Pape, H. (eds) (2010) *Physiologie*. 6., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2006) 'Acceleration of Age-Related Hearing Loss by Early Noise Exposure: Evidence of a Misspent Youth', *The Journal of Neuroscience*, 26(7), pp. 2115–2123. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4985-05.2006>.
- 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), pp. 14077–14085. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009>.

Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2019) 'Translating animal models to human therapeutics in noise-induced and age-related hearing loss', *Hearing research*, 377, pp. 44–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.03.003>.

Kumar, U.A., Ameenudin, S. & Sangamanatha, A.V. (2012) 'Temporal and speech processing skills in normal hearing individuals exposed to occupational noise', *Noise & Health*, 14(58), pp. 100–105. Available at: <https://doi.org/10.4103/1463-1741.97252>.

Kurtz, A., Pape, H.-C. & Silbernagl, S. (eds) (2014) *Physiologie*. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart New York, NY: Thieme.

Lavinsky, J., Kasperbauer, G., Bento, R.F., Mendonça, A., Wang, J., Crow, A.L., Allayee, H. & Friedman, R.A. (2021) 'Noise Exposure and Distortion Product Otoacoustic Emission Suprathreshold Amplitudes: A Genome-Wide Association Study', *Audiology & neuro-otology*, 26(6), pp. 445–453. Available at: <https://doi.org/10.1159/000514143>.

Lavinsky, J., Mendonça, A., Bressan, M., da Silva, V., Kasperbauer, G., Salehi, J., Salehi, P., Boussaty, E. & 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 : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 32(6). Available at: <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09913-0>.

Liberman, L.D., Suzuki, J. & Liberman, M.C. (2015) 'Dynamics of cochlear synaptopathy after acoustic overexposure', *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 16(2), pp. 205–219. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10162-015-0510-3>.

Liberman, L.D., Wang, H. & Liberman, M.C. (2011) 'Opposing Gradients of Ribbon Size and AMPA Receptor Expression Underlie Sensitivity Differences among Cochlear-Nerve/Hair-Cell Synapses', *The Journal of Neuroscience*, 31(3), pp. 801–808. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-10.2011>.

Liberman, M.C. (1980) 'Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections', *Hearing Research*, 3(1), pp. 45–63. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(80\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(80)90007-6).

Liberman, M.C. (1982) 'Single-neuron labeling in the cat auditory nerve', *Science (New York, N.Y.)*, 216(4551), pp. 1239–1241. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7079757>.

Liberman, M.C., Gao, J., He, D.Z.Z., Wu, X., Jia, S. & Zuo, J. (2002) 'Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier', *Nature*, 419(6904), pp. 300–304. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01059>.

Liberman, M.C. & Kujawa, S.G. (2017) 'Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms', *Hearing Research*, 349, pp. 138–147. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003>.

Lin, H.W., Furman, A.C., Kujawa, S.G. & Liberman, M.C. (2011) 'Primary Neural Degeneration in the Guinea Pig Cochlea After Reversible Noise-Induced Threshold Shift', *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 12(5), pp. 605–616. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10162-011-0277-0>.

Liu, J., Stohl, J. & Overath, T. (2024) 'Hidden hearing loss: Fifteen years at a glance', *Hearing Research*, 443, p. 108967. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2024.108967>.

- Lozier, N.R., Muscio, S., Pal, I., Cai, H.-M. & Rubio, M.E. (2023) 'Sex differences in glutamate AMPA receptor subunits mRNA with fast gating kinetics in the mouse cochlea', *Frontiers in Systems Neuroscience*, 17, p. 1100505. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnsys.2023.1100505>.
- Maison, S.F., Usubuchi, H. & Liberman, M.C. (2013) 'Efferent Feedback Minimizes Cochlear Neuropathy from Moderate Noise Exposure', *The Journal of Neuroscience*, 33(13), pp. 5542–5552. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5027-12.2013>.
- Martinez-Monedero, R., Liu, C., Weisz, C., Vyas, P., Fuchs, P.A. & Glowatzki, E. (2016) 'GluA2-Containing AMPA Receptors Distinguish Ribbon-Associated from Ribbonless Afferent Contacts on Rat Cochlear Hair Cells', *eNeuro*, 3(2), p. ENEURO.0078-16.2016. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0078-16.2016>.
- Maurer, K., Lang, N. & Eckert, J. (2005) *Praxis der evozierten Potentiale*. Darmstadt: Steinkopff-Verlag. Available at: <https://doi.org/10.1007/b138901>.
- Meyer, A.C. & Moser, T. (2010) 'Structure and function of cochlear afferent innervation', *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 18(5), pp. 441–446. Available at: <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e32833e0586>.
- Mianné, J., Chessum, L., Kumar, S., Aguilar, C., Codner, G., Hutchison, M., Parker, A., Mallon, A.-M., Wells, S., Simon, M.M., Teboul, L., Brown, S.D.M. & Bowl, M.R. (2016) 'Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair', *Genome Medicine*, 8, p. 16. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0273-4>.
- Michels, T.C., Duffy, M.T. & Rogers, D.J. (2019) 'Hearing Loss in Adults: Differential Diagnosis and Treatment', *American Family Physician*, 100(2), pp. 98–108.
- 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., Depireux, D.A., Palermo, A.T., Canlon, B., Burns, J., Elkon, R. & Hertzano, R. (2021) 'A cell-type-specific atlas of the inner ear transcriptional response to acoustic trauma', *Cell reports*, 36(13), p. 109758. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109758>.
- Moser, T., Karagulyan, N., Neef, J. & Jaime Tobón, L.M. (2023) 'Diversity matters — extending sound intensity coding by inner hair cells via heterogeneous synapses', *The EMBO Journal*, 42(23), p. e114587. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.2023114587>.
- Moser, T. & Starr, A. (2016) 'Auditory neuropathy - neural and synaptic mechanisms', 12(3), pp. 135–149. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.10>.
- Müller, M., von Hünerbein, K., Hoidis, S. & Smolders, J.W.T. (2005) 'A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse', *Hearing Research*, 202(1–2), pp. 63–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.011>.
- Murillo-Cuesta, S., Camarero, G., González-Rodríguez, Á., Rodríguez-de la Rosa, L., Burks, D.J., Avendaño, C., Valverde, Á.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*, 18(2), pp. 260–269. Available at: <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00328>.
- Natarajan, N., Batts, S. & Stankovic, K.M. (2023) 'Noise-Induced Hearing Loss', *Journal of Clinical Medicine*, 12(6), p. 2347. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm12062347>.
- Oestreicher, D., Malpede, A.M., Reitmeier, A., Bräuer, C.P., Schoch, L., Strenzke, N. & Pangrsic, T. (2025) 'Noise-induced ribbon synapse loss in the mouse basal cochlear region does not reduce

inner hair cell exocytosis', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, p. 1523978. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1523978>.

Oishi, N., Talaska, A.E. & Schacht, J. (2012) 'Ototoxicity in dogs and cats', *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice*, 42(6), pp. 1259–1271. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.08.005>.

Petitpré, C., Wu, H., Sharma, A., Tokarska, A., Fontanet, P., Wang, Y., Helmbacher, F., Yackle, K., Silberberg, G., Hadjab, S. & Lallemand, F. (2018) 'Neuronal heterogeneity and stereotyped connectivity in the auditory afferent system', *Nature Communications*, 9, p. 3691. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06033-3>.

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 Ca<sup>2+</sup> channels', *Cell*, 102(1), pp. 89–97. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00013-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00013-1).

Pouryaghoub, G., Mehrdad, R. & Valipouri, A. (2016) 'Effect of Acute Noise Exposure on Salivary Cortisol: A Randomized Controlled Trial', *Acta Medica Iranica*, pp. 657–661.

Puel, J.L., Ruel, J., Gervais d'Aldin, C. & Pujol, R. (1998) 'Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss', *Neuroreport*, 9(9), pp. 2109–2114. Available at: <https://doi.org/10.1097/00001756-199806220-00037>.

Pujol, R. & Puel, J.L. (1999) 'Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884, pp. 249–254. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08646.x>.

Pujol, R., Puel, J.L., Gervais d'Aldin, C. & Eybalin, M. (1993) 'Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea', *Acta Oto-Laryngologica*, 113(3), pp. 330–334. Available at: <https://doi.org/10.3109/00016489309135819>.

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, p. 107933. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107933>.

Rutherford, M.A., von Gersdorff, H. & Goutman, J.D. (2021) 'Encoding sound in the cochlea: from receptor potential to afferent discharge', *The Journal of physiology*, 599(10), pp. 2527–2557. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP279189>.

Rüttiger, L., Zimmermann, U. & Knipper, M. (2017) 'Biomarkers for Hearing Dysfunction: Facts and Outlook', *ORL*, 79(1–2), pp. 93–111. Available at: <https://doi.org/10.1159/000455705>.

Schepsky, P. (2023) Rolle des Na<sup>+</sup>-aktivierten Kaliumkanals Slack für Hörvermögen, Hörnervsynapsen und die Vulnerabilität gegenüber Schalltrauma bei der Maus. Dissertation. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes.

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), p. 10.1038/nmeth.2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

Schmitz, F., Königstorfer, A. & Südhof, T.C. (2000) 'RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function', *Neuron*, 28(3), pp. 857–872. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00159-8).

- Sendin, G., Bulankina, A.V., Riedel, D. & Moser, T. (2007) 'Maturation of Ribbon Synapses in Hair Cells Is Driven by Thyroid Hormone', *Journal of Neuroscience*, 27(12), pp. 3163–3173. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3974-06.2007>.
- 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), pp. 13686–13694. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1783-13.2013>.
- Shi, L., Liu, L., He, T., Guo, X., Yu, Z., Yin, S. & Wang, J. (2013) 'Ribbon synapse plasticity in the cochleae of Guinea pigs after noise-induced silent damage', *PloS One*, 8(12), p. e81566. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081566>.
- 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), pp. 1229–1246.e17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.007>.
- 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), p. 12208. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222212208>.
- 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), pp. 1247–1263.e15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.008>.
- Suthakar, K. & Liberman, M.C. (2021) 'Auditory-nerve responses in mice with noise-induced cochlear synaptopathy', *Journal of Neurophysiology*, 126(6), pp. 2027–2038. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.00342.2021>.
- Szydlowska, K. & Tymianski, M. (2010) 'Calcium, ischemia and excitotoxicity', *Cell Calcium*, 47(2), pp. 122–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.003>.
- Tao-Cheng, J.-H., Thein, S., Yang, Y., Reese, T.S. & Gallant, P.E. (2014) 'Homer is concentrated at the postsynaptic density and does not redistribute after acute synaptic stimulation', *Neuroscience*, 266, pp. 80–90. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.066>.
- Tremblay, K.L., Pinto, A., Fischer, M.E., Klein, B.E.K., Klein, R., Levy, S., Tweed, T.S. & Cruickshanks, K.J. (2015) 'Self-Reported Hearing Difficulties Among Adults With Normal Audiograms: The Beaver Dam Offspring Study', *Ear and hearing*, 36(6), pp. e290–e299. Available at: <https://doi.org/10.1097/AUD.000000000000195>.
- Valero, M.D., Hancock, K.E., Maison, S.F. & Liberman, M.C. (2018) 'Effects of Cochlear Synaptopathy on Middle-Ear Muscle Reflexes in Unanesthetized Mice', *Hearing research*, 363, pp. 109–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.03.012>.
- Viana, L.M., O'Malley, J.T., Burgess, B.J., Jones, D.D., Oliveira, C.A.C.P., Santos, F., Merchant, S.N., Liberman, L.D. & Liberman, M.C. (2015) 'Cochlear neuropathy in human presbycusis: confocal analysis of hidden hearing loss in post-mortem tissue', *Hearing research*, 327, pp. 78–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.04.014>.

Wan, G., Gómez-Casati, M.E., Gigliello, A.R., Liberman, M.C. & Corfas, G. (2014) 'Neurotrophin-3 regulates ribbon synapse density in the cochlea and induces synapse regeneration after acoustic trauma', *eLife*, 3, p. e03564. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.03564>.

Wang, Q. & Green, S.H. (2011) 'Functional Role of Neurotrophin-3 in Synapse Regeneration by Spiral Ganglion Neurons on Inner Hair Cells after Excitotoxic Trauma In Vitro', *The Journal of Neuroscience*, 31(21), pp. 7938–7949. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1434-10.2011>.

Wang, Y., Hirose, K. & Liberman, M.C. (2002) 'Dynamics of Noise-Induced Cellular Injury and Repair in the Mouse Cochlea', *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 3(3), pp. 248–268. Available at: <https://doi.org/10.1007/s101620020028>.

Weddell, T.D., Mellado-Lagarde, M., Lukashkina, V.A., Lukashkin, A.N., Zuo, J. & Russell, I.J. (2011) 'Prestin links extrinsic tuning to neural excitation in the mammalian cochlea', *Current biology: CB*, 21(18), pp. R682–R683. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.001>.

Wickens, B., Floyd, D. & Bance, M. (2017) 'Audiometric findings with voluntary tensor tympani contraction', *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 46, p. 2. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40463-016-0182-y>.

Willott, J.F. (2006) 'Overview of methods for assessing the mouse auditory system', *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 8, p. Unit8.21A. Available at: <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0821as34>.

Wong, A.B., Rutherford, M.A., Gabrielaitis, M., Pangršič, T., Göttfert, F., Frank, T., Michanski, S., Hell, S., Wolf, F., Wichmann, C. & Moser, T. (2014) 'Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca<sup>2+</sup> influx to exocytosis', *The EMBO Journal*, 33(3), pp. 247–264. Available at: <https://doi.org/10.1002/embj.201387110>.

Wong, H.C., Zhang, Q., Beirl, A.J., Petralia, R.S., Wang, Y.-X. & Kindt, K. (2019) 'Synaptic mitochondria regulate hair-cell synapse size and function', *eLife*, 8, p. e48914. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.48914>.

Wu, P.-Z., Liberman, L., Bennett, K., de Gruttola, V., O'Malley, J. & Liberman, M. (2019) 'Primary neural degeneration in the human cochlea: evidence for hidden hearing loss in the aging ear', *Neuroscience*, 407, pp. 8–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.053>.

Wu, P.-Z., O'Malley, J.T., de Gruttola, V. & Liberman, M.C. (2021) 'Primary Neural Degeneration in Noise-Exposed Human Cochleas: Correlations with Outer Hair Cell Loss and Word-Discrimination Scores', *The Journal of Neuroscience*, 41(20), pp. 4439–4447. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3238-20.2021>.

Zenner, H.-P. (1994) *Physiologische und biochemische Grundlagen des normalen und gestörten Gehörs*. Thieme.

## 7 Danksagung/Publikation

Der naturwissenschaftliche Abschnitt meiner ärztlichen Ausbildung über die Grundlagen der menschlichen Physiologie, Molekularbiologie, Biophysik und Biochemie war für mich der Teil des Studiums der mich mit der größten Begeisterung erfüllte. Zu entdecken wie viel Wissen wir über die Funktionsweisen unseres Körpers bereits haben und wie viel mehr noch unerforscht ist hat mich früh davon überzeugt, dass meine Forschungsarbeit in der Grundlagenforschung stattfinden sollte.

In der AG von Frau Prof. Dr. Jutta Engel fand ich ein hilfsbereites und aufgeschlossenes Team, klar strukturierte Arbeitsabläufe und Aufgabenverteilungen und modernste wissenschaftliche Ausrüstung, was mir einen reibungslosen Ablauf meiner Versuchsreihen ermöglichte.

Die Hilfe einiger Mitarbeiter möchte ich besonders hervorheben und ihnen meinen Dank aussprechen:

an Prof. Dr. Jutta Engel für die Organisation der Versuche, das Ermöglichen dieser Promotion, ihre Supervision, Hilfestellung und Korrektur dieser Arbeit

an Kerstin Blum, die sich als meine Betreuerin viel Zeit für die Einarbeitung sowie für Hilfestellungen während der Versuche und beim Verfassen dieser Arbeit nahm.

an Dr. Stefan Münkner, ohne dessen Makro eine objektive und schnelle Auswertung der Daten nicht möglich gewesen wäre und der bei technischen Störungen und Fragen schnell helfen konnte

an Dr. Stephanie Eckrich, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung

an Philip Derleder, Philipp Fischer und Pauline Schepsky für die Zusammenarbeit und für ihre Bereitschaft, ausgewählte Forschungsergebnisse zur Verfügung zu stellen

an Kerstin Fischer für die Zuchtplanung der Versuchstiere und die Kommunikation mit der Versuchstierhaltung des CIPMM.

Durch die Pandemie, die uns alle im Ausüben unserer Tätigkeiten einschränkte, und durch meinen Studienabschluss und den Beginn meiner beruflichen Tätigkeit kam es zu unumgänglichen Verzögerungen, die eine raschere Vollendung der Arbeit erschwerten.

An diesem Punkt möchte ich meiner Familie danken, die mir durch ihre Unterstützung ein Verfassen dieser Promotionsarbeit neben dem Studium und später neben der Arbeit ermöglichte und mich immer wieder motivierte - trotz der langen Zeitspanne, die seit Beginn der Versuche im Herbst 2019 vergangen war.

Publikation:

Blum, K., Schepsky, P., Derleder, P., Schätzle, P., Nasri, F., Fischer, P., Engel, J. & Kurt, S. (2024) 'Noise-induced cochlear synaptopathy in C57BL/6 N mice as a function of trauma strength: ribbons are more vulnerable than postsynapses', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, p. 1465216. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1465216>.

## **8 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.



