

Aus der
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Schick

**Die Rolle der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit
spannungsgesteuerter Calciumkanäle (*Cacna2d2*)
bei genetisch bedingter Schwerhörigkeit von Mäusen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Iris A. Stehle
geb. am: 10.01.1987 in Offenbach am Main

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / summary	4
2. Einleitung	7
2.1 Das auditorische System	7
2.1.1 Cochlea	7
2.1.2 Corti-Organ	9
2.1.3 Hörnerv und zentrale Hörbahn	14
2.2 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle	16
2.2.1 Überblick	16
2.2.2 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle in inneren Haarsinneszellen	17
2.2.3 Mutationen des <i>Cacna2d2</i> - / <i>CACNA2D2</i> -Gens	18
2.3 Ziele der vorliegenden Arbeit	20
3. Material und Methodik	21
3.1 Tiere	21
3.2 Genotypisierung	21
3.3 Hörmessungen	23
3.3.1 Narkose	24
3.3.2 Hirnstammaudiometrie	25
3.3.2.1 Definition	25
3.3.2.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Messung	25
3.3.2.3 Auswertung	27
3.3.3 Otoakustische Emissionen	28
3.3.3.1 Definition	28
3.3.3.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Messung	30
3.3.3.3 Auswertung	31
3.4 Statistische Auswertung	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Click-Hirnstammaudiometrie	32
4.1.1 Hörschwelle	32
4.1.2 Wachstumsfunktionen der Welle-I-Amplitude	32
4.2 Frequenzspezifische Hirnstammaudiometrie	33
4.3 Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen	34

5. Diskussion	36
5.1 Hörschwellen	36
5.2 ABR-Wachstumsfunktion	37
5.3 Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen	39
5.4 Klinische Bezüge	40
5.5 Schlussfolgerungen	42
6. Literaturverzeichnis	43
7. Anhang	47
7.1 Tabellen	47
7.2 Abkürzungsverzeichnis	55
7.3 Publikationen	56
7.4 Danksagung	57
8. Lebenslauf	58

1. Zusammenfassung / summary

Einleitung

Die inneren Haarzellen in der Cochlea des Innenohres wandeln die mechanische Energie einer Schallwelle in ein neuronales Signal um, welches über den Hörnerven und die zentrale Hörbahn an den auditorischen Kortex weitergeleitet wird. An der Ribbon-Synapse zwischen innerer Haarzelle und Hörnerv sind spannungsabhängige Calciumkanäle essentiell für die Exozytose des Neurotransmitters Glutamat. Die sog. „*ducky*“ (*du*)-Mutation im murinen *Cacna2d2*-Gen führt zur Bildung eines verkürzten Proteins der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle. In elektrophysiologischen Ableitungen an inneren Haarzellen von *Cacna2d2*^{*du/du*}-Mäusen zeigten sich im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Geschwistertieren (*Cacna2d2*^{*wt/wt*}) ein um ca. 30% reduzierter Calciumeinstrom in die Zelle, eine zu positiven Werten hin verschobene Strom-Spannungskurve für Calciumionen sowie eine verminderte Exozytoserate. Die Auswirkungen dieser Befunde auf den auditorischen Phänotyp der „*ducky*“-Mäuse waren bislang nicht bekannt. Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation war es daher, die Rolle der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit im spannungsabhängigen Calciumkanal für das Hörvermögen bei Mäusen zu klären.

Material und Methoden

Hierzu wurde der auditorische Phänotyp von *Cacna2d2*^{*du/du*}-Mäusen (n = 8 Tiere) mit dem gesunden Wildtyp-Geschwistertiere (*Cacna2d2*^{*wt/wt*}; n = 9 Tiere) anhand von folgenden Untersuchungen in Narkose verglichen: (i.) Hirnstammaudiometrie (ABR = auditory brainstem response) für click- (click-ABR) und frequenzspezifische Reize von 2 bis 45,25 kHz (f-ABR) und (ii.) Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen (DPOAEs) von 10 bis 18 kHz.

Ergebnisse

Die click-ABR-Hörschwelle der *Cacna2d2*^{*du/du*}-Mäuse (n = 15 Ohren / 8 Tiere) war im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (n = 16 Ohren / 8 Tiere) signifikant erhöht: 33,00 ± 12,93 dB SPL vs. 14,69 ± 2,78 dB Schalldruckpegel (SPL; zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben: p < 0,0001). In der Wachstumsfunktion der click-ABR-Welle I, einem Maß für die Integrität der Synapse zwischen innerer Haarzelle und Hörnerv, zeigten sich für die „*ducky*“-Mäuse niedrigere Amplituden (zweiseitige ANOVA: p = 0,0032). Bei der frequenzspezifischen Hirnstammaudiometrie (f-ABR) wurde ebenfalls eine schlechtere Hörschwelle für die *ducky*-Tiere (n = 14 Ohren / 7 Tiere) im Vergleich zu den Wildtyp-

Geschwistertieren (n = 16 Ohren / 8 Tiere) ermittelt (zweiseitige ANOVA: $p < 0,0001$). Der Effekt war mit ca. 15 dB Unterschied am stärksten zwischen 11,3 und 22,6 kHz ausgeprägt (zweiseitige ANOVA mit Bonferroni-post-hoc-Korrektur hier jeweils mit $p \leq 0,01$). Der DPOAE-Pegel im Bereich zwischen 10 und 18 kHz war bei den *ducky*-Tieren (n = 8 Ohren / 4 Tiere) im Durchschnitt um 7 dB erhöht als bei den Wildtypen (n = 6 Ohren / 3 Tiere): $28,93 \pm 2,83$ dB über dem Hintergrundrauschen (SNR) vs. $21,9 \pm 3,66$ dB SNR (zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben: $p = 0,0016$).

Diskussion und Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine modulierende Rolle der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit für die Funktion spannungsgesteuerter Calciumkanäle in der Cochlea. Die schlechteren Hörschwellen und die reduzierten Amplituden der ABR-Welle I bei den *ducky*-Tieren lassen sich durch den geringeren Ca^{2+} -Einstrom und die Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurve zu positiven Potentialen in Ca^{2+} -Kanälen mit der mutierten $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit erklären. Die höheren DPOAE-Pegel weisen hingegen auf eine erhöhte Aktivität der äußeren Haarzellen bei den *ducky*-Mäusen hin, möglicherweise durch eine geringere Aktivierung des olivocochleären Bündels, welches über einen inhibitorischen Feedbackmechanismus die Aktivität der äußeren Haarzellen hemmt.

Summary

Introduction

The inner hair cells of the cochlea transform mechanical energy of a sound wave into a neuronal signal, which is transmitted to the auditory cortex via the auditory nerve and the central auditory pathways. Voltage-gated calcium channels at the ribbon synapse between the inner hair cell and the auditory nerve are essential for the exocytosis of the neurotransmitter glutamate. The “*ducky*” (*du*) mutation of the *Cacna2d2* gene results in translation of a truncated $\alpha_2\delta_2$ subunit protein of voltage-gated calcium channels. Patch-clamp recordings from inner hair cells of *Cacna2d2*^{*du/du*} mice resulted in a 30% reduction of calcium currents, a rightward shift of voltage-current (I-V) curves for Ca^{2+} and reduced exocytosis rates as compared to inner hair cells from their wildtype littermates (*Cacna2d2*^{*w^t/w^t*}). The significance of these findings for the auditory phenotype of *ducky* mice has been elusive so far. Therefore, the aim of the present study was to identify the role of the $\alpha_2\delta_2$ subunit of voltage-gated calcium channels in hearing function of mice.

Materials and methods

The auditory phenotypes of *Cacna2d2*^{du/du} (n = 8 animals) and *Cacna2d2*^{wt/wt} mice (n = 9 animals) were compared to each other by (i.) auditory brainstem responses (ABR) for click and frequency-specific stimuli from 2 to 45.25 kHz (click- and f-ABR) and (ii.) distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) from 10 to 18 kHz.

Results

Click-ABR thresholds of *Cacna2d2*^{du/du} mice (n = 15 ears / 8 animals) were significantly elevated compared to those of wildtype animals (n = 16 ears / 8 animals): 33.00 ± 12.93 dB SPL (sound pressure level) vs. 14.69 ± 2.78 dB SPL (two-sided t-test for independent samples: p < 0.0001). Growth functions of click-ABR wave I, which reflects functional integrity of the inner hair cell synapse, showed reduced amplitudes for *duky* animals (two-sided ANOVA: p = 0.0032). Frequency-specific ABR thresholds were increased for *Cacna2d2*^{du/du} mice (n = 14 ears / 7 animals) as compared to *Cacna2d2*^{wt/wt} mice (two-sided ANOVA: p < 0.0001). This effect was particularly pronounced for frequencies between 11.3 and 22.6 kHz (max. 15 dB; two-sided ANOVA with Bonferroni post hoc test: p ≤ 0.01 for these frequencies). Finally, DPOAE amplitudes were on average 7 dB larger for *duky* animals (n = 8 ears / 4 animals) than for wildtype mice (n = 6 ears / 3 animals): 28.93 ± 2.83 dB SNR (signal-to-noise ratio) vs. 21.9 ± 3.66 dB SNR (two-sided t-test for independent samples: p = 0.0016).

Discussion and conclusion

The results of the present study advocate a modulatory role of the $\alpha_2\delta_2$ subunit in the function of cochlear voltage-gated calcium channels. Reduced Ca^{2+} currents and the rightward shift of Ca^{2+} I-V curves in the inner hair cells of *duky* mice are able to account for increased hearing thresholds and reduced ABR wave I amplitudes in these animals. On the contrary, enlarged DPOAE amplitudes in *Cacna2d2*^{du/du} mice point to an increased activity of outer hair cells in the mutant mice, which might be due to a reduced activation of the inhibitory feedback loop of the medial olivocochlear bundle.

2. Einleitung

2.1 Das auditorische System

2.1.1 Cochlea

Die **Cochlea** ist das eigentliche Sinnesorgan des Gehörs. Ihre Aufgabe ist es, ankommende Schallereignisse frequenzspezifisch mit möglichst hoher Geschwindigkeit und zeitlicher Präzision in ein neuronales Signal umzuwandeln.

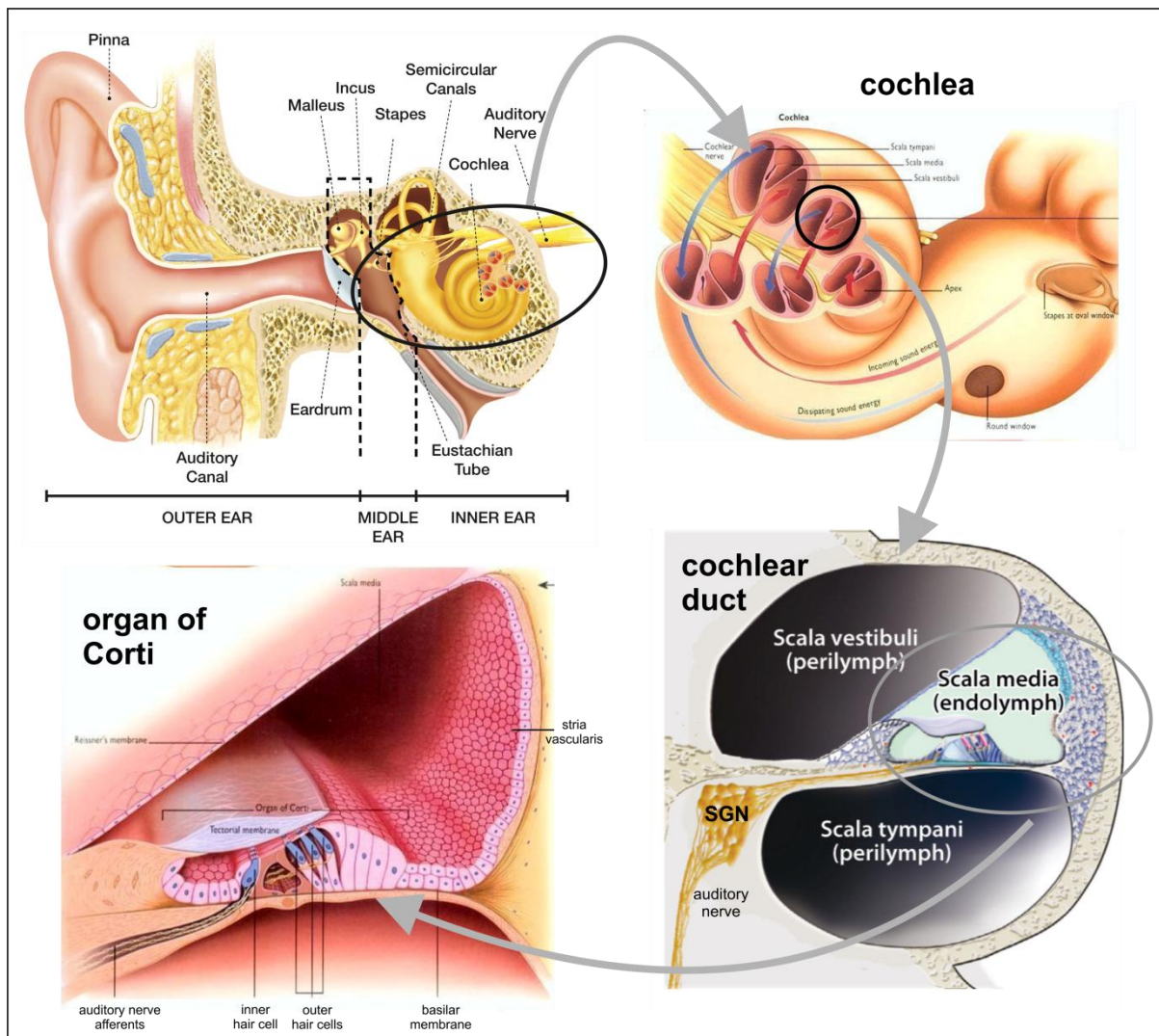


Abb. 1: Anatomischer Aufbau des menschlichen Ohres (oben links), der Cochlea (oben rechts), des Ductus cochlearis (unten rechts) und des Corti-Organ (unten links). SGN = Spiralganglienneuron. Quellen: http://wikis.lib.ncsu.edu/images/e/e2/Cochlea_cross_section.jpg; http://www.hearforlife.ca/resources/article/hearingloss_facts; Safieddine et al., 2012.

Der knöcherne Schneckenkanal (*Canalis spiralis cochleae*) ist spiralförmig und hat eine Länge von 3 bis 3,5 cm. Er dreht sich um die Schneckenachse, den *Modiolus*, zur Schneckenspitze und beinhaltet drei separate Hohlräume. Diese heißen *Scala media*, *Scala vestibuli* und *Scala tympani* (Abb. 1).

Die Basilarmembran bildet gemeinsam mit dem auf ihr liegenden Corti-Organ den Boden der *Scala media (Ductus cochlearis)*, die mit kaliumreicher Endolymphe gefüllt ist. Oberhalb des *Ductus cochlearis* liegt die *Scala vestibuli*. Sie enthält natriumreiche Perilymphe, und nur die dünne *Reissner-Membran* trennt sie vom Endolymphraum der *Scala media*. Da die Zusammensetzung der Perilymphe dem Extrazellulärraum entspricht (also natriumreich und kaliumarm ist mit einem Potential von 0 mV), entsteht an dieser Membran eine Potenzialdifferenz von ca. 85 mV (endocochleäres Potential).

Die *Scala vestibuli* startet an der Basis der Gehörschnecke im Gebiet des ovalen Fensters. Das *Helicotrema*, das an der Schneckenspitze liegt, verbindet die *Scala vestibuli* dann mit der *Scala tympani*. Vom *Helicotrema* bis zum runden Fenster und unterhalb der Basilarmembran verläuft die *Scala tympani*, die auch mit natriumreicher Perilymphe gefüllt ist (Zusammenfassung bei *Probst et al., 2008*).

Das breite Frequenzspektrum des Schalls wird von der Cochlea in schmale Frequenzbänder aufgeteilt, die der neuralen Verarbeitungskapazität angepasst sind, d.h. die verschiedenen Töne unterschiedlicher Frequenzen werden an je einer bestimmten Stelle in der Cochlea verarbeitet (Abb. 2). Diese ortsspezifische Frequenzabbildung in der Cochlea wird als **Tonotopie** bezeichnet.

Die **Basilarmembran** (*Lamina basilaris*) ist zwischen der *Lamina spiralis ossea*, einer Knochenleiste des *Modiolus*, und dem *Ligamentum spirale* der Cochleaaußenwand gespannt. Die Membran ist an der Cochleabasis schmal (0,1 mm) und relativ dick, während sie zur Schneckenspitze hin wesentlich breiter (0,5 mm) und dünner wird. Entlang der longitudinalen Achse der Cochlea verändern sich die mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran. An der Schneckenspitze ist die Basilarmembran deutlich elastischer als an der Schneckenbasis. Diese passiv-mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran sind die Grundlage für die Ausbreitung der Schallwelle als Wanderwelle mit einer frequenzspezifischen maximalen Auslenkung an einem definierten Punkt der Basilarmembran. Im Bereich der Basis werden hohe Frequenzen abgebildet, tiefe Frequenzen dagegen an der Spitze. Diese sog. Wanderwellentheorie geht auf G. von Békésy zurück (Zusammenfassung bei *Probst et al. 2008*).

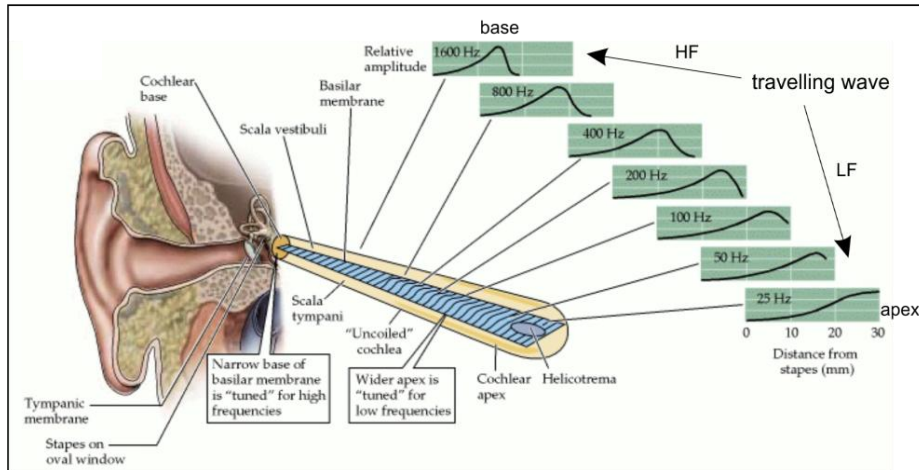


Abb. 2: Die Wanderwelle (travelling wave) eines Schallereignisses an der Basilarmembran. Für hochfrequente (HF = high frequency) Töne liegt das Maximum der Wanderwelle am basalen Ende der Cochlea, für tieffrequente Töne (LF = low frequency) am apikalen Ende (modifiziert nach *Purves et al., 2001*).

2.1.2 Corti-Organ

Das **Corti-Organ** (*Organum spirale*) enthält Stütz- und Sinneszellen und liegt auf dem inneren Anteil der Basilarmembran, der dem *Modiolus* zugewandt ist (Abb. 3a). Die Tektorialmembran (*Membrana tectoria*) besteht aus Fibrillen und amorpher Substanz, ist zellfrei und bedeckt den Sinneszellbereich des Corti-Organs ab der *Lamina spiralis ossea*.

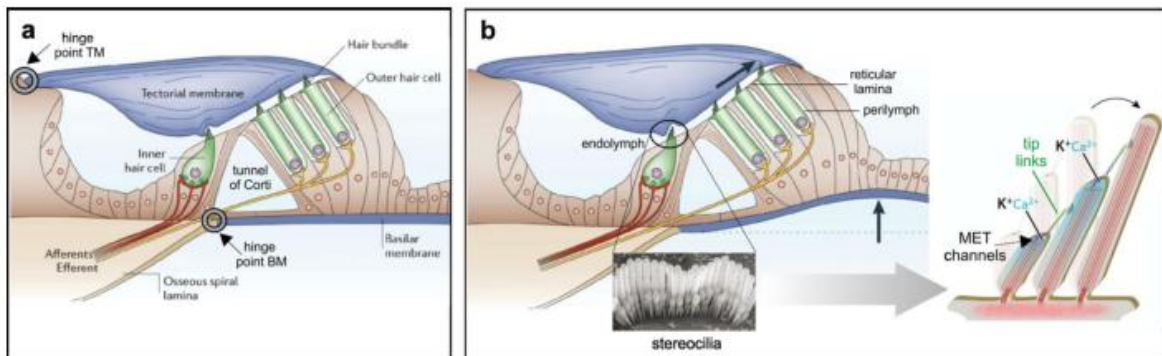


Abb. 3: Corti-Organ und mechanoelektrische Signaltransduktion an der inneren Haarzelle (modifiziert nach *Fettiplace und Hackney, 2006* und *Safieddine et al., 2012*). **a.)** Das Corti-Organ im Detail. Innere und äußere Haarzellen sind in Stützzellen eingebettet und werden von der Tektorialmembran bedeckt. **b.)** Auslenkung der Stereozilien in Richtung des längsten Stereoziliums führt zu einer Öffnung der mechanoelektrischen Transduktionskanäle (MET channels) mit nachfolgender Depolarisation der inneren Haarzelle.

Die Sinneszellen der Cochlea, die sog. Haarzellen, sind Mechanorezeptoren. Sie tragen auf einer spezialisierten Oberfläche an ihrem apikalen Ende ein Bündel von Stereozilien, die der Länge nach angeordnet sind. Die Stereozilien selbst kann man als starre Stäbchen mit Querverbindungen untereinander (*tip links*) beschreiben (Abb. 3b).

Es gibt zwei unterschiedliche Haarzell-Typen in der Hörschnecke mit unterschiedlichen Funktionen: Die inneren Haarzellen (IHZ) sind die eigentlichen Sinneszellen, die äußeren Haarzellen (ÄHZ) wirken als cochleärer Verstärker (Details s. unten). Für die Funktion der Haarzellen ist es entscheidend, dass sie an ihrem apikalen Ende von Endolymphe und an ihrem basolateralen Ende von Perilymphe umgeben sind. Beide Kompartimente werden durch die *Lamina reticularis* voneinander getrennt (Abb. 3b), wodurch eine Potentialgrenze entsteht. Während die Stereozilien der IHZ frei in der Endolymphe schwimmen, sind die Stereozilien der ÄHZ an der Tektorialmembran fest verankert (Abb. 3; Zusammenfassung bei *Probst et al., 2008*).

Innere Haarzellen:

Die gesunde, normale Cochlea beherbergt ca. 3000 flaschenförmige innere Haarzellen (IHZ) umgeben von Stützzellen und angeordnet in einer einzelnen, durchgehenden Reihe. Jede innere Haarzelle ist mit mehreren aufsteigenden (afferenten) Fasern des *N. cochlearis* verbunden (Abb. 3). Die Aufgabe der inneren Haarzellen besteht darin, die ankommende akustische Information in neuronale Signale umzuwandeln. Damit sind sie die eigentlichen Hörsinneszellen (Zusammenfassung bei *Probst et al. 2008*).

Ein ankommender Sinuston bringt die Basilarmembran in wellenförmige Schwingung. Die Membran schwingt dabei frequenzsynchron mit dem Sinuston auf und ab (Abb. 3b). So entsteht ein Flüssigkeitsstrom der Endolymphe, in der die einzelnen Zilien frei schwingen können. Mit Bewegung der Basilarmembran nach oben kommt es zur Auslenkung des Stereozilienbündels und Fluss der Endolymphe in Richtung des längsten Stereoziliums. Diese Scherbewegung stellt den adäquaten Reiz für die Öffnung mechanosensitiver Kationenkanäle an der Spitze der Stereozilien dar, wodurch es zu einem Einstrom von Kationen (hauptsächlich K^+) aus der Endolymphe in die IHZ kommt (**mechanoelektrische Transduktion**). Der Kationeneinstrom ist getriggert durch das endocochleäre Potential und die hohe K^+ -Konzentration in der Endolymphe und führt zu einer Depolarisation der IHZ (Abb. 3b). Umgekehrt führt eine Bewegung der Basilarmembran nach unten zu einer Abscherung der Stereozilien weg vom längsten Stereozilium. Dadurch wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der mechanosensitiven Kationenkanäle reduziert, und es kommt zu einer Hyperpolarisation der IHZ (Zusammenfassung bei *Fettiplace und Hackney, 2006* und *Safieddine et al., 2012*).

Die **Ribbon-Synapse** vermittelt die synaptische Signalübertragung von der inneren Haarzelle auf den Hörnerven. Sie liegt zwischen der basolateralen inneren Haarzelle und dem angrenzenden afferenten Dendriten. Diese hoch spezialisierte synaptische Struktur bietet eine schnelle multivesikuläre phasengekoppelte Neurotransmitter-Freisetzung. Jede präsynaptische „Ribbon“-Struktur ist nur mit einer afferenten Hörnervenfasern verbunden. Der Signalmechanismus an der Ribbon-Synapse ist bei weitem nicht vollständig geklärt, aber einige wichtige Komponenten sind in den letzten Jahren identifiziert worden (Abb. 4).

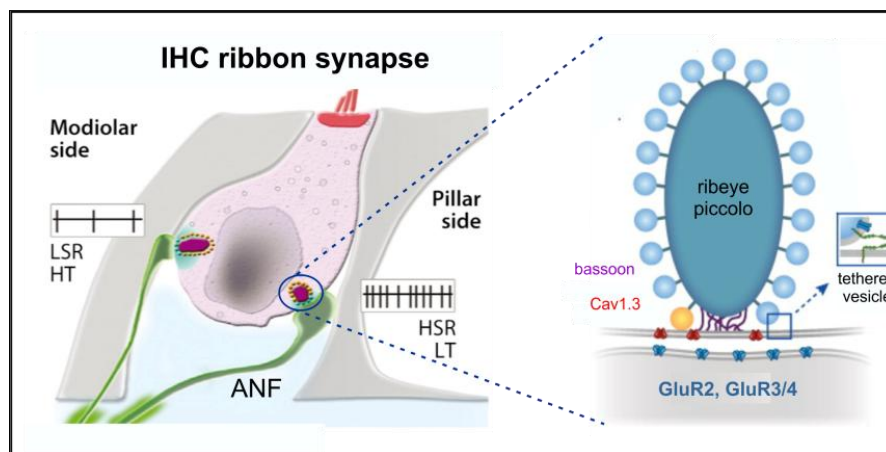


Abb. 4: Aufbau einer Ribbon-Synapse an der inneren Haarzelle (aus *Safieddine et al., 2012* und *Pangršič et al., 2012*). *Links*: zwei exemplarische Ribbon-Synapsen einer IHC und ihre anliegenden afferenten Nervenfasern, die sich in Anatomie und physiologischen Eigenschaften unterscheiden. *Rechts*: Die Komponenten der präsynaptischen Ribbon-Synapse einer IHC. $Ca_v1.3 = Ca_v1.3 \alpha$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals, GluR = AMPA-Typ-Glutamat-Rezeptor.

Durch die Depolarisation der IHC öffnen sich spannungsgesteuerte schnelle Ca^{2+} -Kanäle (sog. $Ca_v1.3$ -Kanäle) an der Ribbon-Synapse, woraufhin Calcium in die innere Haarzelle einströmt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Ca^{2+} -Kanäle findet sich in Kapitel 2.3. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird die Exozytose des Transmitters **Glutamat** in den synaptischen Spalt zwischen Haarzelle und afferenter Hörnervenfasern ausgelöst (Abb. 4). Glutamat bindet an Glutamatrezeptoren vom AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Typ (GluR2, GluR3/4) an der angrenzenden afferenten Hörnervenfasern. Hierdurch wird ein exzitatorisches postsynaptisches Potential im afferenten Dendriten ausgelöst, was zur Entstehung eines Aktionspotentials im dazugehörigen Neuron (SGN = Spiralganglionneuron, vgl. Abb. 1 rechts unten) führt (Zusammenfassung bei *Glowatzki et al., 2008* und *Safieddine et al., 2012*).

Das Aktionspotential wird über den N. cochlearis an das zentrale auditorische System weitergeleitet. Jede innere Haarzelle ist an mehrere afferente Fasern des N. cochlearis

angeschlossen (synaptische Divergenz). Die verschiedenen afferenten Fasern kodieren in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation an der inneren Haarzelle unterschiedliche Eigenschaften der Schallwelle (Abb. 4; *Safieddine et al., 2012*).

Äußere Haarzellen:

In der Hörschnecke findet man ungefähr drei- bis viermal so viele äußere wie innere Haarzellen (ca. 12.000). Äußere Haarzellen sind seitlich der inneren Haarzellenreihe in drei Reihen angeordnet und zylinderförmig. Im Allgemeinen sind sie, geschützt von einem Netz aus Stützzellen, nur kranial und kaudal, nicht aber medial befestigt. Das apikale stereozilientragende Ende liegt im Bereich der Endolymphe, der restliche Teil ist von Perilymphe umgeben. Im Gegensatz zu den inneren Haarzellen besteht eine feste Verbindung ihrer Stereozilien mit der Tektorialmembran (Abb. 3).

Äußere Haarzellen werden als „Motor“ des cochleären Verstärkers angesehen, weil sie sich bei akustischer Stimulation aktiv rhythmisch kontrahieren können (Zusammenfassung bei *Ashmore, 2008*). Die Kontraktionen der äußeren Haarzellen, ausgelöst durch elektrische Reizung, bezeichnet man als **Elektromotilität**. Das Motorprotein hierfür ist **Prestin** aus der 80 kD-Anionentransporter-Familie (Abb. 5; Zusammenfassung bei *Dallos, 2008*). Durch Auslenkung der Basilarmembran nach oben beim Eintreffen einer Schallwelle kommt es auch bei den Stereozilien der äußeren Haarzellen zu einer Auslenkung zum längsten Zilium hin. Der darauf folgende K^+ -Einstrom depolarisiert die äußere Haarzelle, wodurch die Prestinmoleküle ihre Konformation verändern und sich die ÄHZ verkürzt (Abb. 5a). Da die ÄHZ sowohl am apikalen als auch am basalen Ende fest mit der Umgebung verbunden ist, wird durch die Kontraktion der Zelle die Basilarmembran weiter nach oben „gezogen“ (Abb. 5b). Daraus resultiert eine Verstärkung der Basilarmembranauslenkung um den Faktor 100 bis 1000, was einer Verbesserung der Hörschwelle um 40 bis 60 dB entspricht. Neben der Verbesserung der Hörschwelle führt die umschriebene aktive Verstärkung der Basilarmembranauslenkung auch zu einem verbesserten Frequenzauflösungsvermögen der Cochlea im Vergleich zum rein passiven Wanderwellenmechanismus (*Oxenham und Bacon, 2003*).

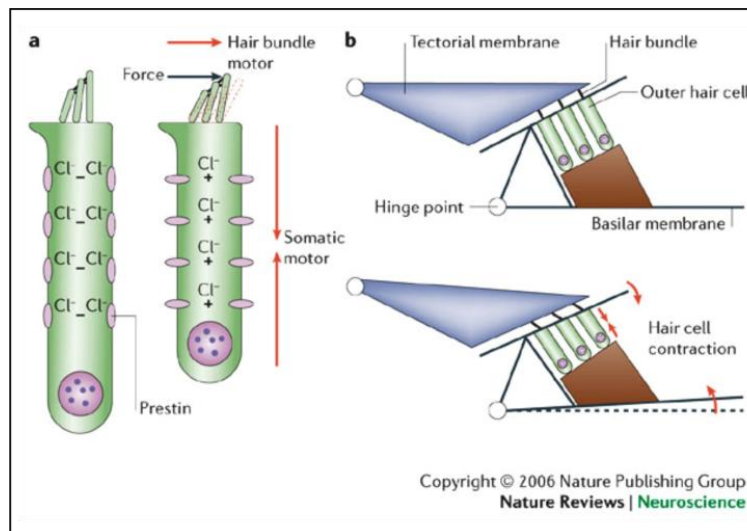


Abb. 5: Die Elektromotilität der äußeren Haarzellen (Fettiplace und Hackney, 2006). **a)** Depolarisation der äußeren Haarzellen führt über eine Konformationsänderung des Prestin zu einer Verkürzung der Zelle. **b)** Schwingung der Basilarmembran nach oben führt über eine Depolarisation zu einer Verkürzung der ÄHZ. Dadurch wird die Auslenkung der Basilarmembran nach oben verstärkt.

Die Verstärkung der Basilarmembranschwingung durch die äußeren Haarzellen ist für verschiedene Lautstärkepegel unterschiedlich groß. Dies bedeutet, dass den leisen Tönen eine große Verstärkung durch die äußeren Haarzellen folgt, laute Töne dagegen nur gering verstärkt werden (Abb. 6, linke Kurve). Durch diese Nicht-Linearität der Basilarmembranauslenkung kommt der große Dynamikbereich des menschlichen Ohres von über 100 dB zustande. Sind die äußeren Haarzellen defekt, besteht dagegen ein linearer Zusammenhang zwischen Zunahme des Schalldruckpegels und Zunahme der Basilarmembranauslenkung (Abb. 6, rechte Kurve). Dadurch führt die gleiche Erhöhung des Schalldruckpegels zu einer größeren Zunahme der BM-Auslenkung im Vergleich zur gesunden Cochlea (Steigungsdreiecke ΔBM in Abb. 6) und damit zu einer größeren Zunahme der empfundenen Lautheit. Dieser pathologische Lautheitsausgleich wird auch als **Recruitment** bezeichnet (Oxenham und Bacon, 2003).

Ein Schaden der ÄHZ führt damit durch die Erhöhung der Hörschwelle und den pathologischen Lautheitsausgleich zu einem reduzierten Dynamikbereich der Cochlea. Im Alltag bedeutet dies, dass Leises als „zu leise“ und Lautes als „zu laut“ empfunden wird, ein Phänomen, das auch im Rahmen der Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis) beobachtet wird.

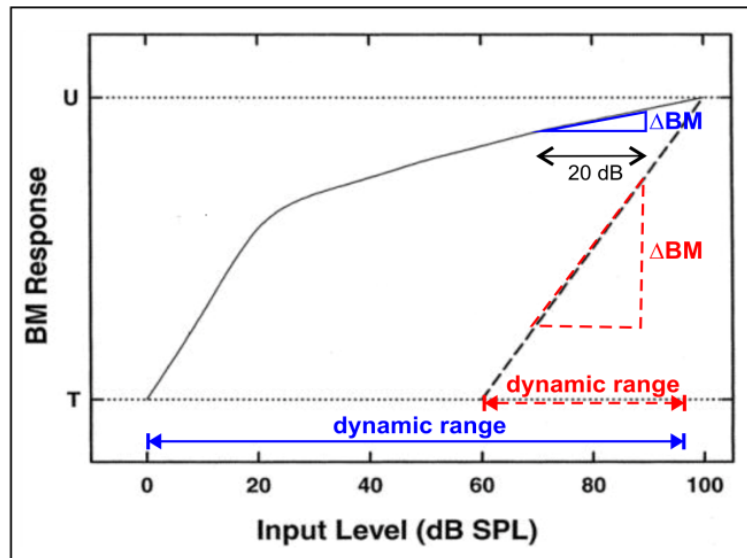


Abb. 6: Nicht-Linearität des cochleären Verstärkers (aus *Dlugaiczky, 2014* modifiziert nach *Oxenham und Bacon, 2003*). Linke Kurve: bei intakten ÄHZ führt eine Zunahme des Schalldruckpegels (input level, x-Achse) bei leisen Tönen zu einer größeren Zunahme der Basilarmembranauslenkung (BM response, y-Achse) als bei lauten Tönen (Nicht-Linearität). Sind die ÄHZ defekt (rechte Kurve), besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Zunahme des Schalldruckpegels und Auslenkung der Basilarmembran. Dies führt zu einem pathologischen Lautheitsausgleich (rotes und blaues Steigungsdreieck, „Recruitment“) und zu einem eingeschränkten Dynamikbereich der Cochlea. Details s. Text.

Die äußeren Haarzellen werden zum größten Teil von efferenten Fasern des *N. cochlearis* aus der medialen superioren Olive innerviert (mediales olivocochleäres Bündel). Kontakt zu den afferenten, aufsteigenden Fasern besteht fast nicht (Abb. 3). Bei dem medialen olivocochleären Bündel (MOC) handelt es sich um einen inhibitorischen Feedbackmechanismus, welcher die Aktivität der ÄHZ reguliert. Der efferenten Innervation der ÄHZ werden u.a. eine lärmprotective Wirkung und eine Verbesserung des Sprachverstehens im Störschall zugeschrieben (Zusammenfassung bei *Guinan, 2011* und *Dlugaiczky et al., 2016*).

2.1.3 Hörnerv und zentrale Hörbahn

Der **Hörnerv** besteht aus zwei unterschiedlichen Fasertypen. Diese sind zum einen die efferenten Fasern, die vom ZNS zur Cochlea führen, und zum anderen die afferenten Fasern, die in umgekehrter Richtung verlaufen. Der *N.cochlearis* enthält ungefähr 80% afferente und 20% efferente Fasern (*Dannhof und Bruns, 1993*).

Die **zentrale Hörbahn** beginnt im Hirnstamm mit der Einmündung des *N. cochlearis* in den *Nucleus cochlearis* (Abb. 7). Dieser erhält Afferenzen der ipsilateralen Cochlea. Die Kreuzung der Hörbahn findet auf Höhe der beiden oberen Olivenkomplexe statt. Ab dort werden die auditorischen Informationen beidseits verarbeitet. Der obere Olivenkomplex ist über den *Lemniscus lateralis* mit dem *Colliculus inferior* des Mittelhirns verbunden. Von dort werden die auditorischen Signale über den Thalamus an den auditorischen Kortex des Temporallappens geleitet (Zusammenfassung bei *Probst et al., 2008* und *Purves et al., 2001*).

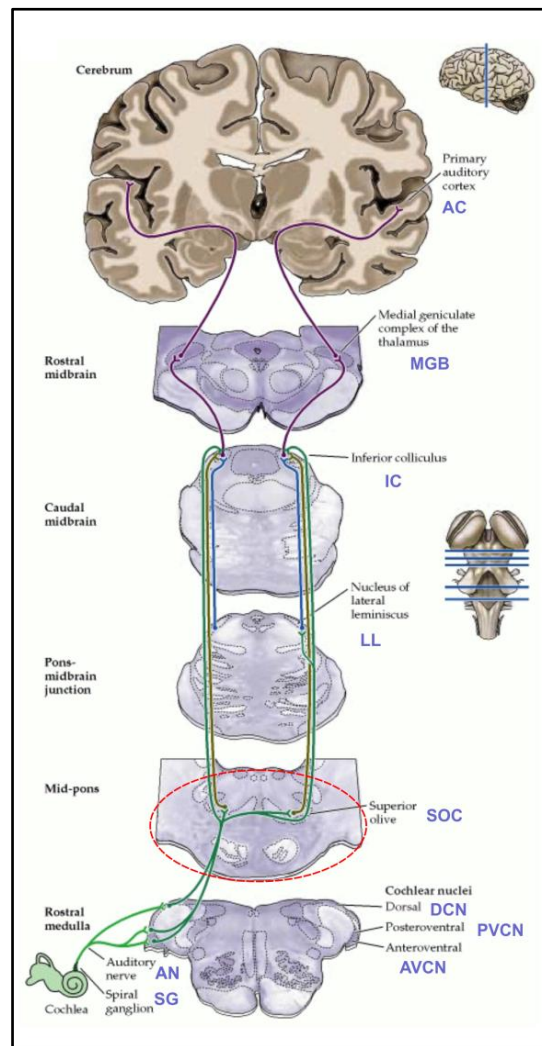


Abb. 7: Die periphere und zentrale Hörbahn (*Purves et al., 2001*). Der Weg der Schallwelle von der Cochlea zur Hörrinde im Temporallappen. Details s. Text.

2.2 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

2.2.1 Überblick

Eine häufig verwendete Abkürzung für spannungsgesteuerte Calciumkanäle ist **VGCCs**, was im Englischen für „voltage gated calcium channels“ steht (*Fuchs et al., 2002*). Depolarisation der Zelle aktiviert VGCCs und bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom. Dieser leitet viele Schlüsselfunktionen in erregbaren Zellen ein, wie z.B. Muskelkontraktion, Sekretion, Enzymregulation, Gentranskription, Phosphorylierung / Dephosphorylierung von Proteinen und synaptische Transmitterfreisetzung (Zusammenfassung bei *Catterall, 2011* und *Dolphin, 2013*). Die Einteilung der VGCCs erfolgt nach Ihren pharmakologischen Eigenschaften. Durch Dihydropyridin (DHP) werden Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ spezifisch blockiert. Zu dieser Gruppe gehören VGCCs mit den α_1 -Untereinheiten $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ und $\text{Ca}_v1.4$ (*Catterall 2011*).

VGCCs sind komplexe Proteine, die aus vier oder fünf verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. (*Ertel et al. 2000*). Diese umfassen die zentrale porenbildende α_1 -Untereinheit, die überwiegend extrazelluläre $\alpha_2\delta$ -Untereinheit (Glykoproteindimer mit Disulfidbrücke), eine intrazelluläre β -Untereinheit und in manchen Ca^{2+} -Kanaluntertypen eine transmembranöse γ -Untereinheit (Glykoprotein) (Abb. 8; Zusammenfassung bei *Catterall, 2011*).

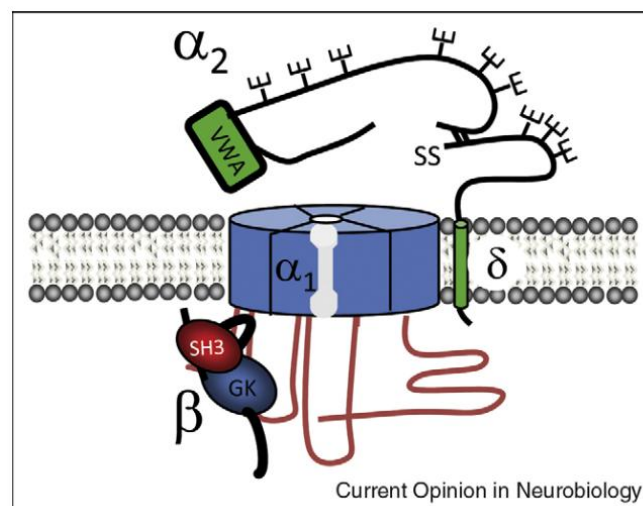


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals (VGCC) (aus *Dolphin, 2009*). VWA = von-Willebrand-Faktor-A-Domäne. Die α_1 -Untereinheit bildet die Kanalpore, die β -Untereinheit befindet sich intrazellulär. Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit besteht aus zwei stark glykosilierten Proteinen („E“), welche über Disulfidbrücken („SS“) miteinander verbunden sind. Die Verankerung in der Zellmembran erfolgt über das δ -Protein. Details s. Text.

Die Untereinheiten sind jeweils durch mehrere Gene verschlüsselt. Die pharmakologische und elektrophysiologische Vielfalt von Calciumkanälen entsteht hauptsächlich aus der Existenz von multiplen Isoformen der α_1 -Untereinheit (mindestens zehn bei Säugetieren). Des Weiteren wurden jeweils vier Gene für die β -Untereinheit und die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit identifiziert. Dabei können die individuellen α_1 -Untereinheiten Verbindungen mit verschiedenen β - und $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten eingehen (Zusammenfassung bei *Ertel et al. 2000; Catterall, 2011*).

Jede der Untereinheiten der spannungsabhängigen Calciumkanäle hat bestimmte Aufgaben: Die α_1 -Untereinheit als die größte Untereinheit enthält die Pore des Ionenkanals und die Bindungsstellen für *second messenger*, Drogen und Giftstoffe (*Ertel et al. 2000*). Die β -Untereinheit vermittelt den Transport der VGCCs an die Zelloberfläche und moduliert deren Kanaleigenschaften. Eine Koexpression der α_1 - mit der β -Untereinheit erhöht zudem den Calciumeinstrom in die Zelle (*Hidalgo und Neely, 2007*). Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit vergrößert ebenfalls die Stromamplitude von VGCCs, verschiebt die Strom-Spannungskurve des Kanals hin zu negativen Potentialen, erhöht die Expressionsrate von Ca^{2+} -Kanälen in der Zellmembran und beeinflusst die Morphologie der Prä- und Postsynapse (Zusammenfassung bei *Fell, 2013*). Die sog. VWA-Domäne (VWA = von-Willebrand-Faktor-A) der $\alpha_2\delta_1$ - und $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheiten enthält die Bindungsstelle für Gabapentin. Diese als Antikonvulsivum verwendete Substanz reduziert die Expression von $\alpha_2\delta_1$ - und $\alpha_2\delta_2$ -Protein sowie den assoziierten α -Untereinheiten an der Zelloberfläche und reduziert den Calciumeinstrom in die Zelle (s. auch Kapitel 5.4; Zusammenfassung bei *Zamponi, 2015*).

2.2.2 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle in inneren Haarsinneszellen

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle finden sich in der inneren Haarzelle an der Ribbon-Synapse, wo sie bei der Depolarisation der Haarzelle den schnellen Ca^{2+} -Einstrom bewirken, welcher für die Transmitter-Exozytose essentiell ist (Abb. 4; *Fuchs et al., 2002; Glowatzki et al., 2008*). In der adulten IHZ wurden bislang hauptsächlich die Untereinheiten $\text{Ca}_v1.3$ ($\alpha_1\text{D}$), $\text{Ca}_v\beta_2$ und $\alpha_2\delta_2$ nachgewiesen (*Fell, 2013*). Hör- und elektrophysiologische Untersuchungen an Mäusen mit Mutationen der o.g. Gene erlaubten in den letzten Jahren Einblicke in die Rolle der einzelnen VGCC-Untereinheiten für den Hörvorgang.

Das Fehlen der **$\text{Ca}_v1.3$ (= $\alpha_1\text{D}$)-Untereinheit** bei sog. $\alpha_1\text{D}^{-/-}$ -Mäusen hat Folgen für das Hörvermögen und die kardiale Funktion. In den IHZ sind Ca^{2+} -Ströme vom L-Typ um >90% reduziert. Daher ist keine Exozytose von Glutamat an der Ribbon-Synapse der IHZ möglich, und die Tiere sind taub (*Platzer et al., 2000; Dou et al., 2004*). Da die $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit auch für die Schrittmacherfunktion des Sinus- und AV-Knotens im Herzen essentiell ist, zeigen $\alpha_1\text{D}^{-/-}$ -Mäuse eine kardiale Bradyarrhythmie (*Platzer et al., 2000*). Beim Menschen

wurde erstmals 2011 eine Mutation im Gen der $Ca_v1.3$ -Untereinheit beschrieben, welche bei homozygoten Trägern einen vergleichbaren Phänotyp mit hochgradiger sensorineuraler Schwerhörigkeit (Hörschwellen zwischen 80 und 100 dB nHL (normal hearing level) im Tonaudiogramm) und Bradyarrhythmie erzeugt, das sog. SANDD-Syndrom (sinuatrial node dysfunction and deafness) (Baig et al., 2011).

Als die Rolle der Calciumkanaluntereinheit $Ca_v\beta$ beim Hören untersucht wurde, zeigte sich, dass die spannungsgesteuerten Calciumkanäle in den inneren Haarzellen überwiegend die **$Ca_v\beta_2$ -Untereinheit** enthalten (Neef et al., 2009). Bei $Ca_v\beta_2^{-/-}$ -Mäusen fehlt das entsprechende Protein in allen extrakardialen Geweben (der Verlust des $Ca_v\beta_2$ -Proteins im Herzen wäre letal). Diese Tiere zeigen stark erhöhte Hörschwellen: die durchschnittliche Hörschwelle von $Ca_v\beta_2^{-/-}$ -Mäusen beträgt 90 dB Schalldruckpegel (SPL = sound pressure level) für click-Stimuli und überschreitet 90 dB SPL für Frequenzen von 4 bis 32 kHz. (Neef et al., 2009). Ca^{2+} -Ströme und Exozytoserate an der Ribbon-Synapse der IHZ sind im Vergleich zum Wildtyp jeweils um ca. 70% reduziert. Die Anzahl der Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran ist in gleichem Ausmaß vermindert, während die Leitfähigkeit der einzelnen Ca^{2+} -Kanäle unverändert im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren ist. Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, dass die Hörminderung bei den Knockout-Tieren durch eine reduzierte Expression von Ca^{2+} -Kanälen in der Zellmembran der IHZ bedingt ist. Diese Befunde belegen die essentielle Rolle der $Ca_v\beta$ -Untereinheit für den Transport der Ca^{2+} -Kanäle zur Zellmembran und der Vermittlung der Transmitter-Exozytose (Neef et al., 2009). $Ca_v\beta_3$ und $Ca_v\beta_4$ haben einen kleineren Anteil an den Ca^{2+} -Strömen in inneren und äußeren Haarzellen (Kuhn et al., 2009).

Von den **$\alpha_2\delta$ -Untereinheiten** konnten in reifen inneren Haarzellen der adulten Maus hauptsächlich Transkripte der $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit nachgewiesen werden, jedoch nur in geringen Mengen. Da aktuell kein zuverlässiger Antikörper gegen die $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit verfügbar ist, ist aktuell nicht bekannt, wo das Protein in der IHZ lokalisiert ist (Fell et al., 2016).

2.2.3 Mutationen des *Cacna2d2*- / *CACNA2D2*-Gens

Die ducky-Maus

Über die Rolle der $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit für den Hörvorgang lagen bis vor kurzem keine Informationen vor. Als Mausmodell eignet sich hier der Mausstamm *ducky* (*du/du*), welcher eine spontan auftretende Mutation im *Cacna2d2*-Gen auf Chromosom 9 zeigt, was zur Expression eines verkürzten $\alpha_2\delta 2$ -Proteins führt (Barclay et al., 2001).

Die $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit wird hauptsächlich im ZNS, und dort überwiegend in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert. Entsprechend zeigen die homozygot betroffenen Tiere (*du/du*) einen Phänotyp mit zerebellären Funktionsstörungen (ataktisches Gangbild und spike-wave-Epilepsie). Insgesamt liegt eine Gedeihstörung vor, und die Lebenserwartung ist verkürzt (*Barclay et al., 2001*).

Elektrophysiologische Ableitungen an Purkinje-Zellen von *du/du*-Tieren ergaben einen um 30% reduzierten Ca^{2+} -Strom im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren bei unveränderter Leitfähigkeit der einzelnen Ca^{2+} -Kanäle. Dies spricht dafür, dass die reduzierte Stromstärke durch eine geringere Anzahl von Ca^{2+} -Kanälen und/oder eine verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit der einzelnen Kanäle zustande kommt (*Barclay et al., 2001*). Des Weiteren ist die Morphologie der Purkinje-Zellen bei *du/du*-Mäusen verändert: insbesondere zeigen die Verzweigungen der Dendriten eine veränderte Architektur, was die Rolle der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit für die Struktur der Prä- und Postsynapse unterstreicht (*Brodbeck et al., 2002*).

Elektrophysiologischen Untersuchungen an isolierten adulten IHZ von *ducky*-Mäusen zeigten ebenfalls um 30% reduzierte maximale Amplituden für Ca^{2+} - und Ba^{2+} -Ströme im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Des Weiteren waren die Strom-Spannungskurven um 5 mV für Ca^{2+} bzw. 7 mV für Ba^{2+} zu positiven Spannungswerten hin verschoben (*Fell, 2013*). Entsprechend dem verminderten Calciumeinstrom zeigten die inneren Haarzellen der *ducky*-Mäuse auch eine geringere Exozytoserate im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern (*Fell et al., 2016*).

In Immunfluoreszenzfärbungen ließen sich die $\text{Ca}_v1.3$ - und $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheiten unverändert an den Ribbon-Synapsen der IHZ von *ducky*-Mäusen nachweisen. Jedoch zeigten *ducky*-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren eine veränderte Morphologie der Postsynapse an der IHZ mit verbreiterten postsynaptischen Strukturen sowie postsynaptischen Strukturen ohne gegenüberliegende präsynaptische Ribbons. Diese Beobachtung deckt sich mit der vorbeschriebenen Bedeutung der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit für die strukturelle Organisation von Synapsen (*Fell et al., 2016*).

Über das Hörvermögen der *du/du*-Mäuse lagen bislang keine Informationen vor.

Mutationen des CACNA2D2-Gens beim Menschen

Auch beim Menschen ergeben sich durch die Mutation im *CACNA2D2*-Gen neurologische Probleme. Bislang wurden zwei verschiedene Mutationen beschrieben (*Edvardson et al., 2013; Pippucci et al., 2013*). Homozygot betroffene Patienten beider Mutationen zeigen eine Enzephalopathie mit schwerer globaler Entwicklungsverzögerung und epileptischen Anfällen. In der Magnetresonanztomographie (MRT) fällt eine Atrophie des Kleinhirnwurmes (Vermis)

auf. In Fallberichten wurde angegeben, dass die stark entwicklungsverzögerten Patienten zwar auf Geräusche reagieren, audiometrische Befunde wurden jedoch bislang nicht publiziert (*Edvardson et al., 2013*).

2.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Basierend auf diesen Erkenntnissen hatte die vorliegende Dissertation das Ziel, den Einfluss der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit auf das Gehör von Mäusen zu untersuchen. Hierzu wurden in vergleichenden Hörmessungen an Wildtyp- und homozygoten *duky*-Mäusen (*du/du*) folgende Teilziele verfolgt:

- Bestimmung der Hörschwellen in der Hirnstammaudiometrie (ABR = auditory brainstem response) für click- und frequenzspezifische Stimuli ($f = 2$ bis $45,25$ kHz)
- Untersuchung des Einflusses der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit auf die überschwellige Hörnervenaktivität anhand der Wachstumsfunktion der click-ABR-Welle I in Wildtyp- und *du/du*-Mäusen.
- Analyse der Aktivität der äußeren Haarzellen durch Messung der Distorsionsproduktotoakustischen Emissionen (DPOAEs).

3. Material und Methodik

3.1 Tiere

Die Versuchsdurchführung an lebenden Wirbeltieren wurde nach Genehmigung gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes (Versuch Nr. 43/2011: „Calciumkanäle und genetisch bedingte Schwerhörigkeit“) durchgeführt. Haltung der Tiere und Versuche an Tieren erfolgten gemäß Tierschutzgesetz in Verbindung mit dem Saarländischen Gesetz über das öffentliche Veterinärwesen und die amtliche Lebensmittelüberwachung (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden C57BL/6-Mäuse mit einer Mutation des *Cacna2d2*-Gens (*Cacna2d2^{du/du}*, „*ducky*“) sowie deren Wildtyp-Geschwistertiere (*Cacna2d2^{w^t/w^t}*) verwendet. Bei den *du/du*-Mäusen liegt ein verkürztes Protein der akzessorischen Calciumkanal-Untereinheit $\alpha_2\delta_2$ vor (Barclay et al., 2001). Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall des Instituts für Biophysik an der Universität des Saarlandes in Homburg / Saar. Zur Förderung der Gewichtszunahme bei allgemeiner Gedeihstörung wurden die *ducky*-Mäuse mit Erdnussbutter oder Nutella® Creme gefüttert. Aufgrund der reduzierten Lebenserwartung der *ducky*-Mäuse (ca. 30 Tage) erfolgten die Hörmessungen zwischen dem postnatalen Tag (P) 20 und 25. Bei den Wildtyp-Tieren wurden die Messungen zwischen P21 und P30 durchgeführt. Die Abholung der Tiere aus dem Tierstall erfolgte stets am Tag der Messung, weil die Mäuse erst kurz vorher von der Mutter getrennt werden sollten. Die Tiere wurden mit einem Wärmekissen und einer Verdunklungsdecke in die Hörmesskabine für Kleintiere (*Camera silenta*) an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde transportiert.

Für die Hörmessungen wurden insgesamt $n = 9$ Wildtyp- und $n = 8$ *ducky*-Mäuse verwendet (siehe Kapitel 7.1, Tab. 1). Eine detaillierte Aufstellung der Messungen an den einzelnen Tieren findet sich im Anhang in Tab. 2 bis 5 (Kapitel 7.1). Die Unterscheidung der Tiere erfolgte anhand Genotyp (vgl. Kapitel 3.2) und Phänotyp. Die *ducky*-Mäuse waren zum Zeitpunkt der Hörmessung generell leichter und kleiner als ihre Wildtyp-Geschwistertiere ($4,6 \pm 0,7$ g vs. $12,2 \pm 2,3$ g).

3.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte zusammen mit Frau Dr. rer. nat. Barbara Fell im Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes nach einem Protokoll von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerald Obermair, Innsbruck (Fell, 2013).

Kurz zusammengefasst wurde zunächst die Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid = DNA) aus 1 bis 2 mm großen Gewebestücken (Schwanzspitze oder Ohr) mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kits (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren) gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert. Anschließend erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) mit dem Thermocycler TGradient (Biometra, Göttingen) nach folgendem Ansatz:

- 2 µl DNA
- 0,5 µl Vorwärts-Primer (5'-ACCTATCAGGCAAAGGACG-3'; Biomers.net GmbH, Ulm)
- 0,5 µl Rückwärts-Primer (5'-AGGGATGGTGATTGGGA-3')
- 7 µl destilliertes Wasser (ddH₂O)
- 10 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega GmbH, Mannheim).

Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Zunächst 3 min bei 95 °C zur Aktivierung der DNA-Polymerase, danach 35 Zyklen mit jeweils

- 95 °C für 40 sec: Denaturierung
- 56 °C für 30 sec: Verbindung von DNA-Einzelsträngen und Primern („annealing“)
- 72 °C für 35 sec: Elongation

sowie ein letzter Elongationsschritt von 5 min bei 72 °C.

Durch die gewählten Primer wurde bei Wildtyp- und *ducky*-Mäusen ein DNA-Fragment mit 541 Basenpaaren (bp) amplifiziert, welches außerhalb des *Cacna2d2*-Gens liegt. Bei der *ducky*-Maus ist dieses Fragment dupliziert und gleichzeitig mutiert, so dass es mit dem Restriktionsenzym *BspHI* in zwei Teile mit jeweils ca. 280 bp geschnitten werden kann.

Für den Enzymverdau wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl NEB4-Puffer, 0,2 µl *BspHI* (NEB = New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) und 7,8 µl ddH₂O gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 60-80 min bei 37 °C wurden die DNA-Fragmente in 10 µl des Enzymverdaus mittels Gelelektrophorese (1,8%iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel und TAE-Puffer) bei 120 V aufgetrennt.

Der 50-fach konzentrierte TAE-Puffer (50x TAE) enthielt folgende Bestandteile:

- 2 M Tris
- 50 mM EDTA (Sigma, Taufkirchen)

- 5,7% (v/v) Eisessig (VWR International GmbH, Radnor, PA, USA).

Die Ethidiumbromid-gefärbten Banden wurden in einer EBox-VX2 (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) sichtbar gemacht.

Abb. 9 zeigt ein typisches Beispiel des Bandenmusters für *wt/wt*-, *du/wt*- und *du/du*-Tiere nach Enzymverdau. Das Fragment mit 541 bp konnte bei allen Genotypen nachgewiesen werden. Da die Schnittstelle für *BspHI* erst durch die *ducky*-Mutation eingeführt wird, fand sich eine 280 bp-Bande nur bei den Tieren, die mindestens ein *ducky*-Allel besitzen (also *du/du* und *du/wt*). Bei den homozygoten *du/du*-Tieren zeigte sich eine intensiver gefärbte 280 bp-Bande als bei den heterozygoten *du/wt*-Mäusen.

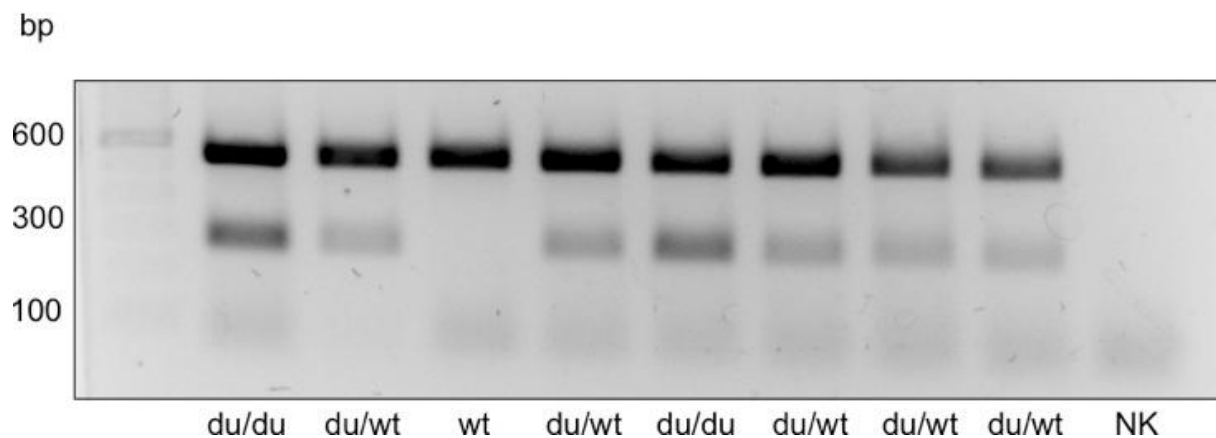


Abb. 9: Beispiel einer *ducky*-Genotypisierung (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Barbara Fell aus *Fell, 2013*). Die 541bp-Bande ist unabhängig vom Genotyp vorhanden. Bei Vorhandensein des *du*-Allels tritt zusätzlich eine Bande bei ca. 280 bp auf, welche für *du/du*-Mäuse eine intensivere Färbung als für *wt/du*-Tiere aufweist. NK = Negativkontrolle.

3.3 Hörmessungen

Die Hörmessungen wurden in einem schallisolierten Raum (*Camera silenta*) der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes an Mäusen im Alter von 21 bis 30 Tagen (*wt/wt*) bzw. 20 bis 25 Tagen (*du/du*) durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1). Voruntersuchungen zeigten eine hervorragende Schallabschirmung der Kammer, wobei sich bei einem Lärmpegel von 90 dB SPL unmittelbar vor der Kammer drinnen kein nennenswerter Schallpegel nachweisen ließ (*Schick, 2002*).

3.3.1 Narkose

Alle Messungen wurden in tiefer Narkose durchgeführt. Die intraperitoneale Injektionsnarkose bestand aus Ketaminhydrochlorid 100mg/kg Körpergewicht (KG) (Ketavet 100mg/ml, Pharmacia/Pfizer, Karlsruhe) und Xylazinhydrochlorid 10mg/kg KG (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen).

Zur Ermittlung der Medikamentendosierung wurde die Maus gewogen. Zunächst wurden 50% des Narkotikums mit einer Insulinspritze intraperitoneal appliziert. Hierzu wurde die Maus am Nackenfell gegriffen, umgedreht, um einen Biss zu vermeiden, und ohne arterielle Verletzung intraperitoneal gestochen. Die Tiere wurden zum Einschlafen in ihren Käfig zurückgesetzt und zur Beruhigung mit einem Tuch abgedeckt. Der schlafenden Maus wurde die zweite Hälfte des Narkotikums intraperitoneal gespritzt. Um eine Austrocknung der Cornea zu verhindern, wurde dexpanthenolhaltige Augensalbe (Bepanthen Augensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen. Nach zehn Minuten wurde die Narkosetiefe durch leichtes Kneifen mit einer stumpfen Pinzette in die mittlere Zehe eines Hinterbeins überprüft. War der Rückziehreflex nicht mehr feststellbar, wurde das Tier in der schallisolierten Audiometrikabine auf ein Wärmekissen gelegt. Somit wurde sichergestellt, dass die Körpertemperatur während der Messung in Narkose nicht zu stark absank. Das Kissen wurde konstant bei 37 °C warm gehalten. Sehr kleine Tiere wurden zusätzlich von oben abgedeckt, um einer Auskühlung vorzubeugen.

Die Narkosetiefe wurde unter Sicht und durch Ableitung eines Elektrokardiogramms kontrolliert. Bei Abflachen der Narkosetiefe wurde je nach Bedarf nochmals Narkosemittel (ca. ein Viertel bis ein Drittel der Initialdosis) intraperitoneal nachgespritzt. Ab der doppelten Initialdosis wurde nur Ketaminhydrochlorid ohne Xylazinhydrochlorid verabreicht.

Bei Durchführung der Höruntersuchungen wurde insbesondere darauf geachtet, dass eine Gesamtdauer von zwei Stunden für die Narkose nicht überschritten wurde. Nach den Messungen wurden die Tiere zurück in den Käfig gelegt, wo sie unter Überwachung wieder erwachten. Eine konstante Umgebungs- und Körpertemperatur wurde mittels der Wärmedecke am Käfigboden gewährleistet. Im Normalfall erwachten die Tiere ungefähr zwei Stunden nach Start der Narkose, maximal nach vier Stunden. In diesem Fall wurde wiederholt Augensalbe aufgetragen, und die Vitalparameter wurden überprüft. Die Injektionsnarkose wirkte ein wenig nach, so dass die Tiere noch einige Stunden schläfrig waren.

3.3.2 Hirnstammaudiometrie

3.3.2.1 Definition

Bei der Hirnstammaudiometrie („auditory brainstem response = ABR“ oder „brainstem evoked response audiometry = BERA“) handelt es sich um eine objektive Hörprüfungsmethode, welche eine Beurteilung des Hörvermögens ohne Angaben des Probanden allein durch Registrierung auditorischer reizkorrelierter Parameter erlaubt. Hierbei werden nach akustischer Stimulation die frühen akustisch evozierten Potentiale aus Hörnerv und Hirnstamm über Elektroden am Vertex und Mastoid abgeleitet.

In der klinischen Audiometrie wird die ABR-Messung insbesondere zur Bestimmung der Hörschwelle bei Neugeborenen und Kleinkindern im Schlaf oder in Sedierung verwendet, des Weiteren zur Abklärung einer retrocochleären Hörstörung (*Boenninghaus und Lenarz, 2007*).

3.3.2.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Messung

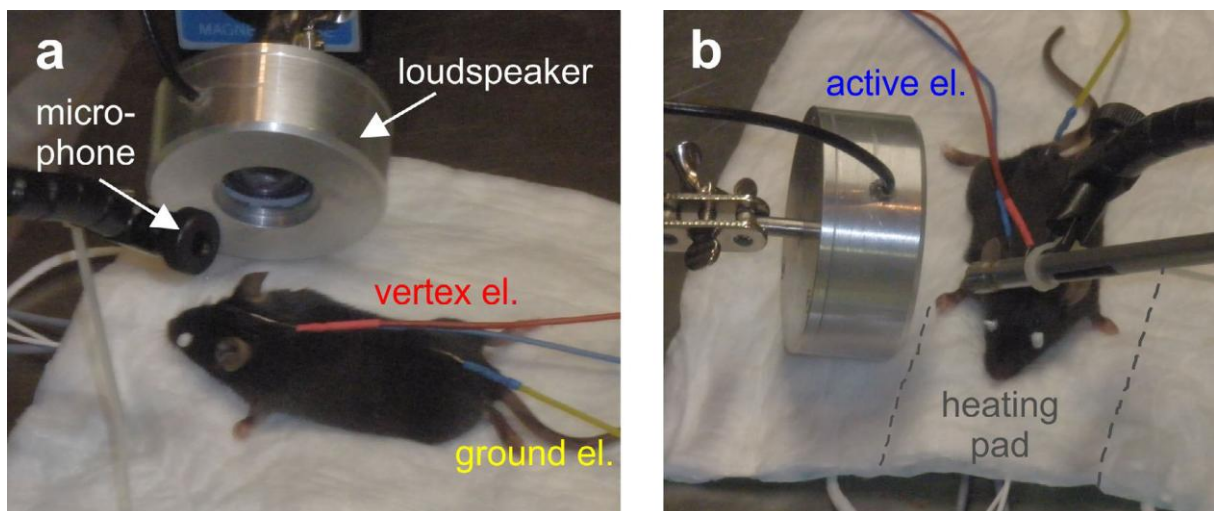


Abb. 10: Versuchsaufbau der ABR-Messung bei der Maus (aus *Dlugaiczky, 2014*). **a)** von der linken Seite und **b)** von vorne. „vertex el.“: Referenzelektrode, „ground el.“: Neutralelektrode, „active el.“: Messelektrode. Details siehe Text.

Zur Ableitung der akustisch evozierten Hirnstammpotentiale wurden mittels Injektionskanülen dünne Silberdrähte (Durchmesser 0,25 mm) subkutan am Rücken (Neutralelektrode: gelb), am Vertex (Referenzelektrode: rot) und hinter dem stimulierten Ohr (Messelektrode: blau) des narkotisierten Versuchstieres appliziert (Abb. 10). Dabei wurde die Haut in einer Falte angehoben und die Injektionskanüle durch die Haut gestochen,

vergleichbar mit einer subkutanen Injektion, nur eben als Durchstich. Über die Injektionskanüle wurde anschließend der Silberdraht platziert. Beim Anlegen des Drahtes wurde darauf geachtet, dass sich die Drahtenden nicht berührten, um einen Kurzschluss zu vermeiden. Nach Platzierung der Elektroden wurde eine Impedanz-Kontrolle durchgeführt (Kanal 1: < 4 bis 4,5 k Ω ; Kanal 2: < 8 k Ω). Der Silberdraht verblieb bis zum Ende der Messung unter der Haut.

Für die Generierung der akustischen Stimuli und die Aufzeichnung der ABR-Signale wurden eine Multi-IO-Karte (National Instruments E-6052, Austin, Texas, USA) sowie das Programm „Audiology lab“ (entwickelt von PD Dr. rer. nat. Marcus Müller, Universitätsklinikum Tübingen) verwendet. Die akustischen Stimuli wurden über einen Lautsprecher (Beyerdynamic DT-911, Heilbronn) in 3 cm Entfernung von dem zu messenden Ohr präsentiert. Ein Mikrofon (Brüel & Kjaer 4191, Naerum, Dänemark) mit Messverstärker (Brüel & Kjaer 2610) diente zur Kalibration und Kontrolle der applizierten akustischen Reize (Abb. 10). Zur Stimulation der Hörbahn wurden zwei verschiedene Reizparameter mit alternierender Polarität verwendet:

Für die **click-ABR-Messung** wurden Clicks durch einen 100 μ s dauernden Rechteckimpuls erzeugt. Die Abtastrate betrug 20 kHz, für eine Messung wurden 256 Einzelmessungen gemittelt. Die Präsentation der Clickreize erfolgte in aufsteigender Lautstärke mit 5-dB-Schritten. Da sich in Voruntersuchungen bereits eine höhere Hörschwelle für *Cacna2d2^{du/du}*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen gezeigt hatte, wurden unterschiedliche Stimulationsamplituden für die beiden Genotypen verwendet (*Cacna2d2^{du/du}*: 20 bis 100 dB SPL; *Cacna2d2^{wt/wt}*: 0 bis 80 dB SPL). Eine click-ABR-Messung dauerte pro Ohr ca. fünf Minuten.

Click-ABR-Messungen wurden erfolgreich an 16 Ohren von acht *Cacna2d2^{wt/wt}*-Mäusen und 15 Ohren von acht *Cacna2d2^{du/du}*-Mäusen durchgeführt (Kapitel 7.1, Tab. 2). Das linke Ohr der *ducky*-Maus ko 176-0179 (ko 176-0179 L) wurde wegen nicht-verwertbarer Ergebnisse nicht in die Auswertung eingeschlossen. Die zwei Ohren des Wildtyp-Tieres wt 176-0267 (wt 176-0267 R und wt 176-0267 L) konnten aufgrund von Problemen bei der Narkose nicht gemessen werden.

Für die **frequenzspezifische f-ABR-Messung** wurden Reintöne von der Form einer Kosinuswelle (Dauer: 3 ms + 1 ms Anstiegsflanke + 1 ms Abstiegsflanke) in Halboktav-Schritten von 2 bis 45,25 kHz verwendet. Die Abtastrate betrug 20 kHz, für eine Messung werden 128 Einzelmessungen gemittelt. Auch hier erfolgte eine Anpassung der Stimulationsamplituden an den Genotyp (*Cacna2d2^{du/du}*: 20 bis 80 dB SPL; *Cacna2d2^{wt/wt}*: 40 bis 100 dB SPL). Eine f-ABR-Messung (2 bis 45,25 kHz) dauert pro Ohr ca. 25 Minuten. Die

Messdauer nach Beginn des Stimulus betrug in beiden Fällen 10 ms. Nach der Registrierung wurden alle ABR-Signale gefiltert (Hochpassfilter: 150 Hz, Tiefpassfilter: 2500 Hz).

Frequenzspezifische ABR-Messungen konnten erfolgreich an 16 Ohren von acht *Cacna2d2*^{wt/wt}-Mäusen und 14 Ohren von sieben *Cacna2d2*^{du/du}-Mäusen durchgeführt werden. Die beiden Ohren der *ducky*-Maus ko 176-0179 (ko 176-0179 R und ko 176-0179 L) wurden wegen nicht auswertbarer Kurven ausgeschlossen, die zwei Ohren des Wildtyp-Tieres wt 176-0267 (wt 176-0267 R und wt 176-0267 L) wurden aufgrund von Problemen bei der Narkose nicht in die Auswertung aufgenommen (Kapitel 7.1, Tab. 3).

3.3.2.3 Auswertung

Die Auswertung der click- und f-ABR-Daten erfolgte über eine MATLAB-basierte (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) Software, welche von Herrn Dr. rer. nat. (Dipl. Ing.) Dietmar Hecker (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde. Nach der Dateneingabe über die interaktive Benutzeroberfläche (Abb. 11) wurde eine mehrdimensionale Matrize in MATLAB („MATLAB structure array“) für weitere Analysen erstellt. Diese enthält neben den ABR-Daten auch den Genotyp des betreffenden Tieres.

Die Zuordnung der ABR-Wellen (Abb. 11) zu den entsprechenden Stationen der Hörbahn (Abb. 7) erfolgte nach *Knipper et al., 2013*: Welle I, Spiralganglion / Hörnerv; Welle II, *Nucleus cochlearis*; Welle III, oberer Olivenkomplex; Welle IV, *Lemniscus lateralis*; Welle V, *Colliculus inferior*. Jede der fünf Wellen wird durch einen negativen (z.B. I_n) und einen positiven (z.B. I_p) Gipfel („peak“) definiert.

Die Markierung der einzelnen Gipfel des ABR-Signals wurde in halbautomatischer Weise durchgeführt: nach automatischer Detektion durch die o.g. Software erfolgte eine visuelle Kontrolle (ggf. mit Modifikation) durch zwei unabhängige Auswerter (Iris Stehle und Dietmar Hecker). Als Hörschwelle wurde bei click- und f-ABR-Messungen der niedrigste Lautstärkepegel definiert, bei dem gerade noch ein auditorisch evoziertes Potential identifiziert werden kann. Die Hörschwellen, die von den zwei Auswertern ermittelt wurden, zeigten durchwegs Abweichungen von ≤ 5 dB.

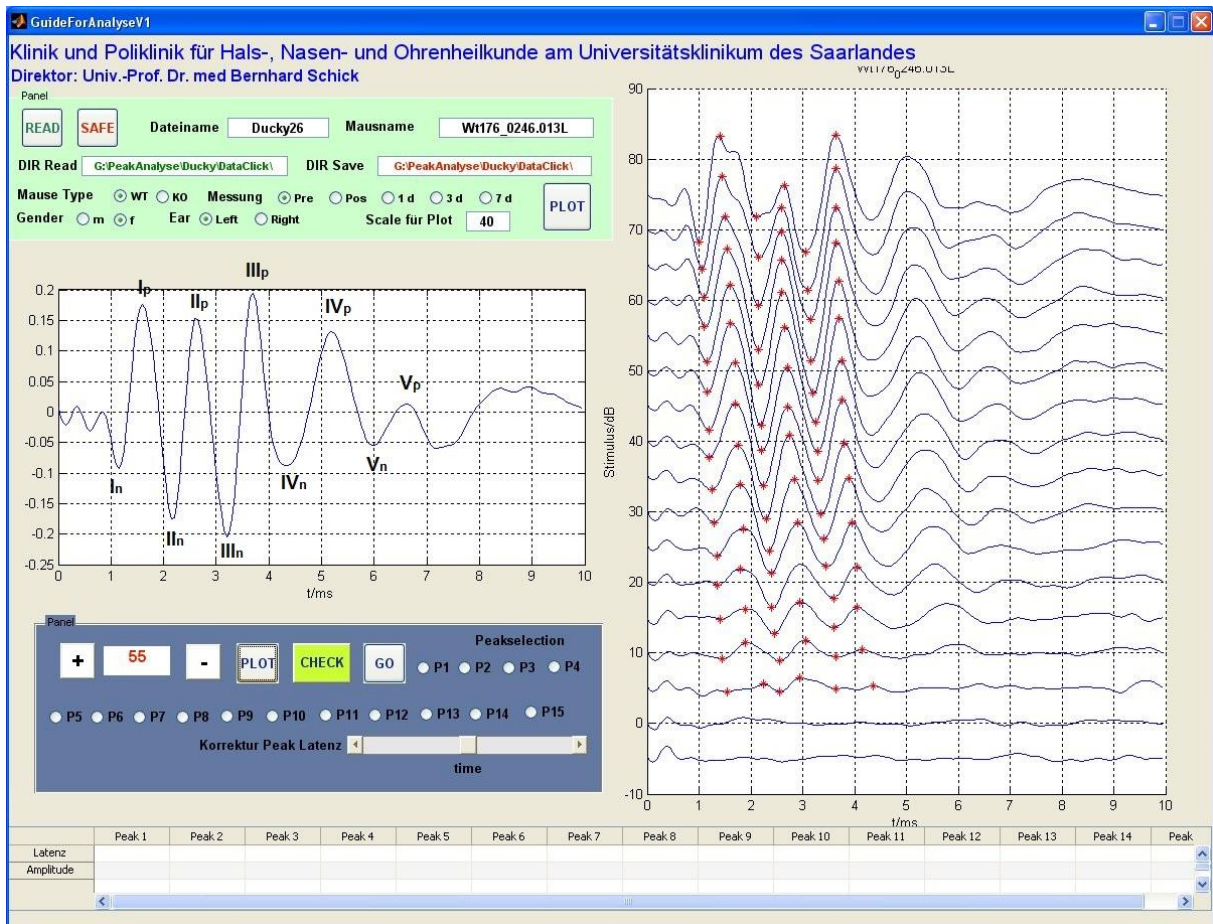


Abb. 11: Screenshot der Benutzeroberfläche des ABR-Analyseprogramms. Die einzelnen negativen (n) und positiven (p) Gipfel der ABR-Wellen sind mit $I_{n/p}$ bis $V_{n/p}$ markiert.

Das individuell programmierte ABR-Analyseprogramm ermöglichte außerdem eine automatische Bestimmung der Wachstumsfunktionen für die einzelnen click-ABR-Amplituden und –Latenzen (Kapitel 7.1, Tab. 4). Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Wildtyp- und *ducky*-Mäusen erfolgte eine schwelkenkorrigierte Darstellung der Wachstumsfunktionen (SL = sensation level = „dB über Hörschwelle“), wie bei *Dlugaiczky et al., 2016* beschrieben.

3.3.3 Otoakustische Emissionen

3.3.3.1 Definition

Otoakustische Emissionen (OAEs) sind sehr leise Schallemissionen der Cochlea, welche hauptsächlich durch die Elektromotilität der äußeren Haarzellen entstehen. Sie werden über das Mittelohr an den äußeren Gehörgang geleitet, wo sie mit einem empfindlichen Mikrophon gemessen werden können. OAEs gelten als Maß für die Integrität der äußeren Haarzellen und werden in der Klinik häufig als objektive Funktionsprüfung des Innenohres verwendet, z.B. beim Neugeborenen-Hörscreening (*Kemp, 2002*). Man unterscheidet dabei spontane

otoakustische Emissionen und evozierte, d.h. nach akustischer Stimulation der Cochlea gemessene Emissionen. Zur Messung wird eine Sonde in den Gehörgang gesteckt, welche einen Lautsprecher zur akustischen Stimulation sowie ein sensibles Mikrofon zur Aufzeichnung der OAEs enthält (Abb. 12).

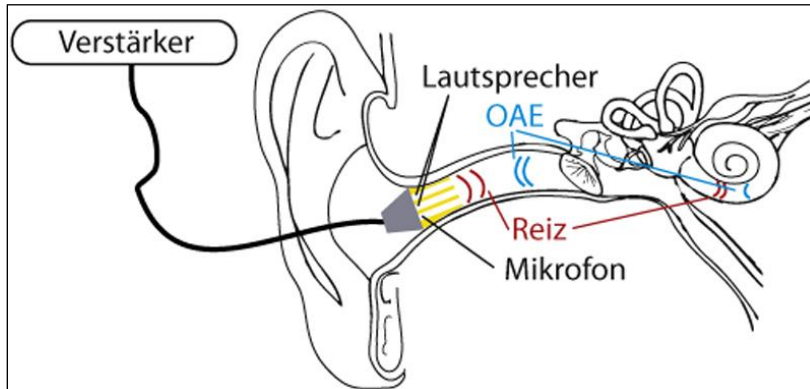


Abb. 12: Messaufbau zur Registrierung otoakustischer Emissionen (aus Rahne und Plontke, 2012). Details s. Text.

Als Stimulus wird im Falle der transitorisch evozierten otoakustischen Emissionen (TEOAEs) ein Clickreiz verwendet, während Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen (DPOAEs) durch eine Kombination aus zwei Reintönen mit dem Frequenzverhältnis $f_2 / f_1 = 1,2$ ausgelöst werden (Abb. 13). Durch die Überlagerung der Wanderwellen der zwei Stimuli f_1 und f_2 entstehen mehrere Distorsionsprodukte, von denen in der Regel das mit der Frequenz $2f_1 - f_2$ am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 14).

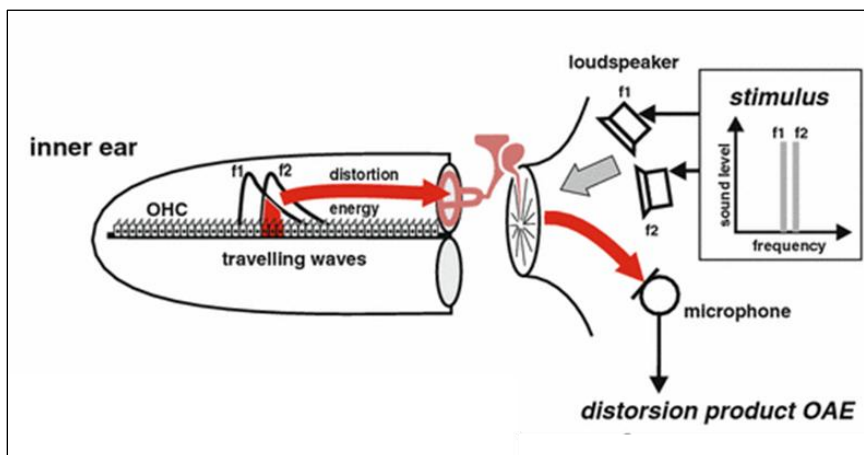


Abb. 13: Entstehung der DPOAEs in der Cochlea (aus Kössl et al., 2008). Durch die Stimulation der Cochlea mit zwei Reintönen (f_1 , f_2) im Frequenzverhältnis $f_2 / f_1 = 1,2$ bilden sich zwei überlappende Wanderwellen entlang der Basilarmembran. Im Überlappungsbereich entsteht eine dritte Wanderwelle als Distorsionsprodukt, welches mit dem Mikrofon im Gehörgang gemessen werden kann.

Durch Veränderung der Stimulationsfrequenzen ist es möglich, mittels DPOAE-Messung eine frequenzspezifische Funktionsprüfung der äußeren Haarzellen vorzunehmen, welche im sog. „DP-gramm“ aufgetragen wird (Abb. 14). Positive DPOAEs liegen vor, wenn der Signal-Rausch-Abstand (SNR = signal-to-noise ratio) mindestens 6 dB beträgt (Zusammenfassung bei *Rahne und Plontke, 2012*).

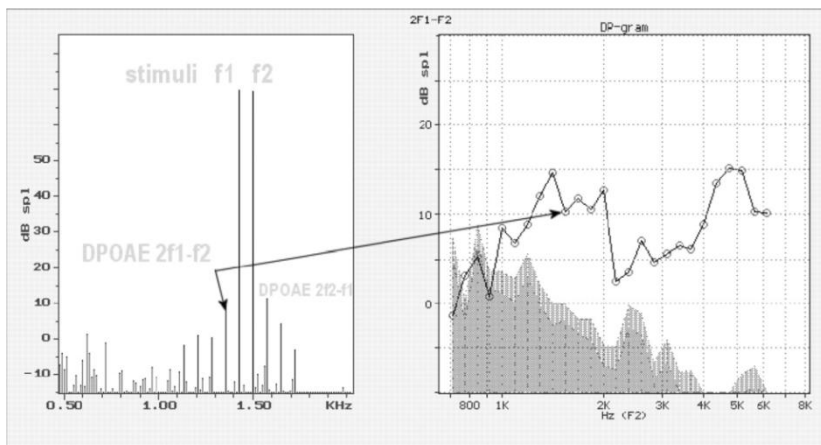


Abb. 14: Distorsionsprodukte und DP-gramm (aus *Kemp, 2002*). *Links:* Stimulation der Cochlea mit den beiden Frequenzen f_1 und f_2 im Verhältnis $f_2/f_1 = 1,2$ führt zu verschiedenen Distorsionsprodukten. *Rechts:* DP-gramm für Frequenzen von 0,8 bis 6 kHz. Die Kreise entsprechen der Amplitude des Distorsionsproduktes $2f_1-f_2$ für die einzelnen Frequenzen. Das Hintergrundrauschen ist grau hinterlegt. Im vorliegenden Beispiel sind die DPOAEs ab einer Frequenz von 1 kHz nachweisbar.

3.3.3.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Messung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Ableitung der DPOAEs im Anschluss an die ABR-Messung in der gleichen Narkosesitzung mit der von *Hecker et al., 2011* beschriebenen Methode zur Messung von Hochton-DPOAEs. Für die Platzierung der DPOAE-Sonde im Gehörgang der Maus wurde ein spezielles Anpaßstück verwendet, welches in der klinischen Messung von DPOAEs bei Säuglingen zum Einsatz kommt (UGD Probe ILO 292, Otodynamics, Hatfield, U.K). DPOAE-Antworten wurden von 10 bis 18 kHz in 0,5-kHz-Schritten gemessen. Dabei wurden Stimulationspegel von $L_1 = 55$ dB SPL und $L_2 = 45$ dB SPL verwendet. Pro Ohr dauerte diese Messung ca. 20 Minuten. DPOAE-Pegel wurden an sechs Ohren von drei Wildtyp-Tieren und acht Ohren von vier *ducky*-Mäusen gemessen (Kapitel 7.1, Tab. 5).

3.3.3.3 Auswertung

Für die Auswertung der DPOAE-Messungen wurde eine individuell programmierte MATLAB-Software verwendet (Dr. rer. nat. Dipl. Ing. Dietmar Hecker; Abb. 15). Für jedes Ohr erfolgte die Mittelung der DPOAE-Pegel von 10 bis 18 kHz.

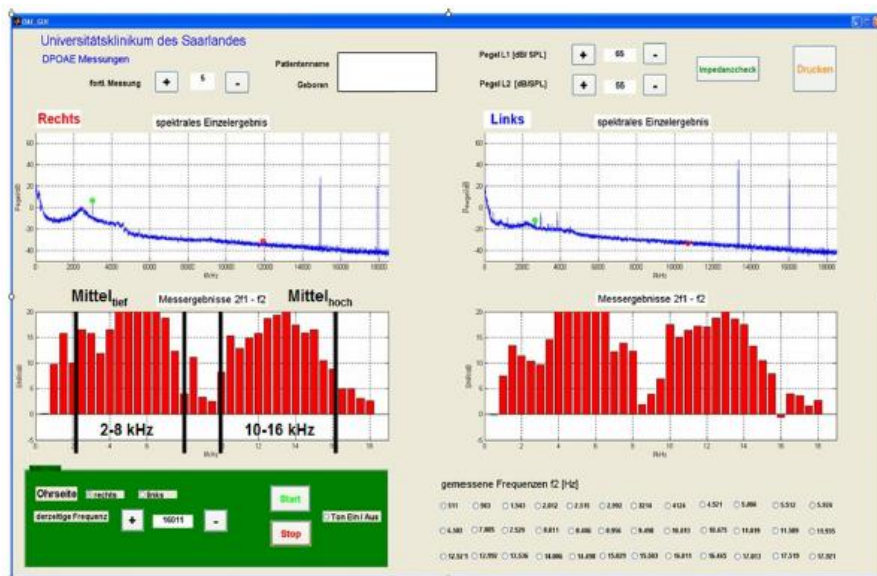


Abb. 15: Screenshot der Benutzeroberfläche des DPOAE-Analyseprogramms (aus Guthardt Torres, 2015). Details s. Text.

3.4 Statistische Auswertung

Click-ABR-Hörschwellen und DPOAE-Pegel wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben verglichen, für f-ABR-Schwellen und click-ABR-Wachstumsfunktionen kam die zweiseitige ANOVA („analysis of variance“) mit Bonferroni post-hoc-Analyse zum Einsatz (GraphPad Prism Version 6, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Für beide statistischen Verfahren wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Click-Hirnstammaudiometrie

4.1.1 Hörschwelle

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Hörschwelle mittels click-ABR-Messung bei $n = 8$ *Cacna2d2*^{wt/wt}-Mäusen ($n = 16$ Ohren) und $n = 8$ *Cacna2d2*^{du/du}-Mäusen ($n = 15$ Ohren). Für die Wildtyp-Tiere zeigte sich eine Hörschwelle von $14,69 \pm 2,78$ dB SPL, die Hörschwelle der *duky*-Tiere lag bei $33,00 \pm 12,93$ dB SPL. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben: $p < 0,0001$; Abb. 16). Damit ist die Hörschwelle der *Cacna2d2*^{du/du}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen um durchschnittlich $18,31$ dB erhöht. Die Hörschwellen der einzelnen Tiere sind Kapitel 7.1, Tab. 2 aufgeführt.

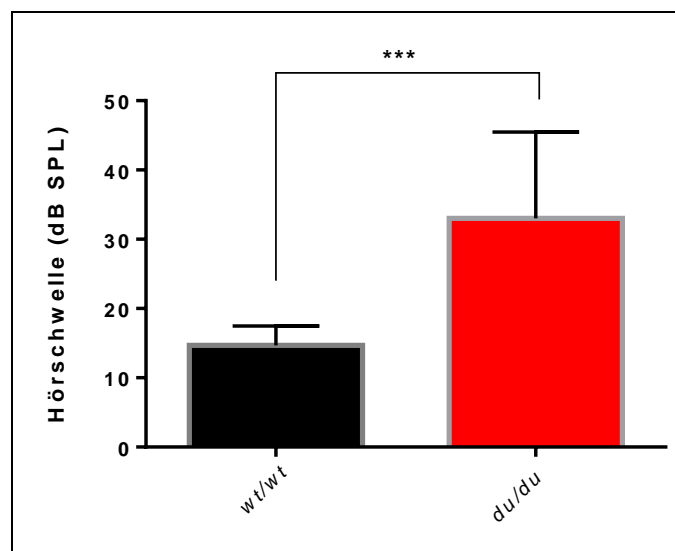


Abb. 16: Click-ABR-Hörschwellen (Mittelwert + SD) von *Cacna2d2*^{wt/wt} (schwarz) und *Cacna2d2*^{du/du}-Mäusen (rot). dB SPL = dB sound pressure level. Die Hörschwelle der *duky*-Tiere ($33 \pm 12,93$ dB SPL) ist im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ($14,69 \pm 2,87$ dB SPL) signifikant erhöht (** $p < 0,0001$).

4.1.2 Wachstumsfunktion der Welle-I-Amplitude

Im Folgenden wurde eine detaillierte Analyse der click-ABR-Welle I durchgeführt, welche generell als Maß für die Integrität der inneren Haarzellsynapse und der Hörnervenaktivität verwendet wird (Kujawa und Liberman, 2009; Maison et al., 2013). Aufgrund der unterschiedlichen Hörschwellen von Wildtyp- und *duky*-Mäusen erfolgte eine

schwellenangepasste Darstellung der Wachstumsfunktionen („dB über Hörschwelle“ = dB sensation level = dB SL).

Die ABR-Welle-I-Amplitude der Wildtyp-Tiere stieg von durchschnittlich 1,62 μV bei 10 dB über der Hörschwelle (dB SL) auf 10,16 μV bei 65 dB SL an. Für die *ducky*-Mäuse wurden ABR-Welle-I-Amplituden zwischen 2,75 μV (10 dB SL) und 7,65 μV (65 dB SL) gemessen (Abb. 17; Tab. 4). In der zweiseitigen ANOVA-Analyse zeigte sich insgesamt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Wachstumsfunktionen ($p = 0,0032$). Für einzelne Lautstärkepegel wurde im nachfolgenden Bonferroni-Test keine Signifikanz erreicht.

Von 10 bis 20 dB SL zeigten sich geringfügig höhere Amplituden für die *ducky*-Mäuse, ab 30 dB SL waren die Amplituden der Wildtyp-Tiere höher. Insgesamt zeigte sich ab diesem überschwelligen Lautstärkepegel eine Abflachung der Wachstumskurve für die *ducky*- im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Bei 65 dB SL betrug das Verhältnis der Welle I-Amplitude für *ducky*- und Wildtyp-Tiere 75%.

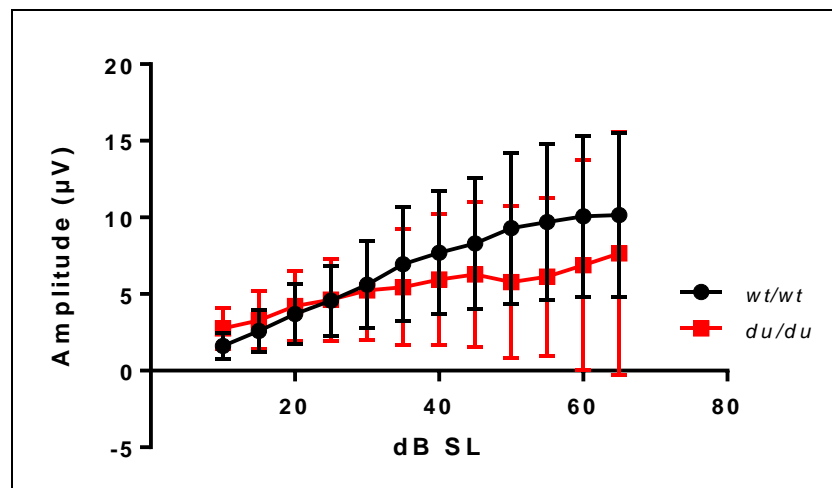


Abb. 17: Wachstumsfunktionen der click-ABR-Welle I (Mittelwert \pm SD) für *Cacna2d2*^{wt/wt}- (schwarz) und *Cacna2d2*^{du/du}-Mäuse (rot). dB SL = dB sensation level („dB über Hörschwelle“). Die Funktionen sind signifikant unterschiedlich ($p = 0,003$), bei 65 dB SL beträgt die Amplitude der *ducky*-Tiere 75% des Wertes für die Wildtyp-Mäuse.

4.2 Frequenzspezifische Hirnstammaudiometrie

Als nächstes folgte die Bestimmung der Hörschwelle mittels f-ABR-Messung bei $n = 8$ *Cacna2d2*^{wt/wt}-Mäusen (max. 16 Ohren) und $n = 7$ *Cacna2d2*^{du/du}-Mäusen (max. 14 Ohren). Die Messwerte für die einzelnen Tiere sowie die Mittelwerte sind in Kapitel 7.1, Tab. 3 aufgeführt.

Insgesamt zeigten die *ducky*-Tiere von 2 bis 45,25 kHz im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erhöhte Hörschwellen (Abb. 18), der Unterschied zwischen den beiden Kurven war statistisch signifikant (zweiseitige ANOVA: $p < 0,0001$). Am stärksten ausgeprägt waren die Unterschiede zwischen 11,3 und 22,6 kHz. Hier war die Hörschwelle der *ducky*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um ca. 15 dB erhöht, die Unterschiede waren in der Bonferroni post hoc-Analyse jeweils signifikant (11,3 kHz: $p = 0,01$; 16 kHz: $p < 0,0001$; 22 kHz: $p < 0,0001$). Im Bereich von 2 bis 8 kHz lagen die Schwellen der *ducky*-Mäuse zwischen 5 und 10 dB über denen der Wildtyp-Tiere, statistische Signifikanz wurde für die einzelnen Frequenzen hier nicht erreicht.

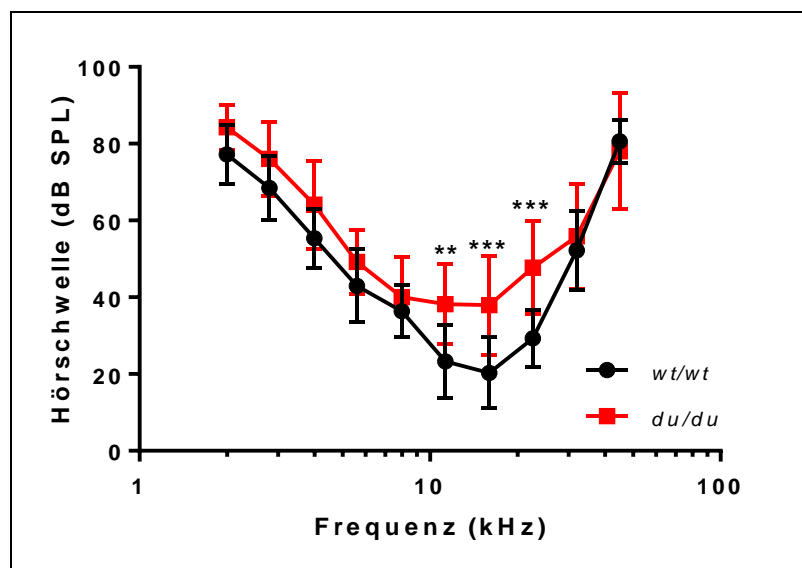


Abb.18: f-ABR-Hörschwellen (Mittelwert \pm SD) von *Cacna2d2^{wt/wt}*- (schwarz) und *Cacna2d2^{du/du}*-Mäusen (rot). dB SPL = dB sound pressure level. Die Hörschwellen der *ducky*-Tiere sind im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen insgesamt erhöht (zweiseitige ANOVA: $p < 0,0001$). Am stärksten ausgeprägt sind die Unterschiede von 11,3 bis 22,6 kHz (Bonferroni post-hoc-Test: ** $p < 0,001$; * $p < 0,0001$).**

4.3 Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen

Abschließend erfolgte die Messung der Distorsionsprodukt-otoakustischen Emissionen (DPOAEs) bei $n = 3$ *Cacna2d2^{wt/wt}*-Mäusen ($n = 6$ Ohren) und $n = 4$ *Cacna2d2^{du/du}*-Mäusen ($n = 8$ Ohren). Dabei wurden für jedes Ohr die Pegel der 2f1-f2-Amplitude von $f_2 = 10$ kHz bis 18 kHz gemittelt (Tab. 5 im Anhang) und anschließend der Mittelwert für alle Tiere eines Genotyps ermittelt.

Für die Wildtyp-Tiere zeigte sich ein mittlerer DPOAE-Pegel von $21,9 \pm 3,66$ dB oberhalb des Hintergrundrauschens (dB SNR), der gemittelte DPOAE-Pegel der *ducky*-Tiere lag bei $28,93 \pm 2,83$ dB SNR (Abb. 19). Im Durchschnitt lag der DPOAE-Pegel der *ducky*-Tiere 7 dB über dem der Wildtyp-Mäuse, der Unterschied war statistisch signifikant (zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben: $p = 0,0016$).

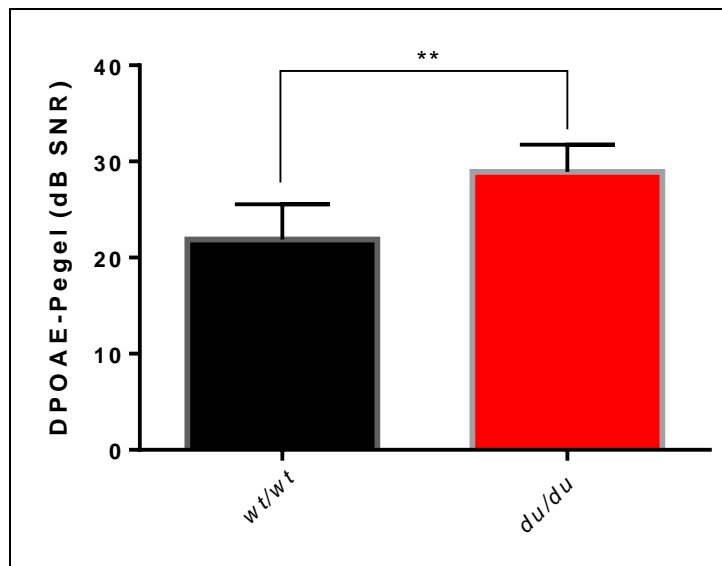


Abb. 19: DPOAE-Pegel der 2f1-f2-Amplitude gemittelt von f2 = 10 bis 18 kHz (Mittelwert + SD) für *Cacna2d2*^{wt/wt}- (schwarz) und *Cacna2d2*^{du/du}-Mäuse (rot). dB SNR = dB über Hintergrundrauschen (dB signal-to-noise ratio). Es zeigen sich signifikant erhöhte DPOAE-Pegel der *ducky*-Tiere ($28,93 \pm 2,83$ dB SNR) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen ($21,9 \pm 3,66$ dB SNR). **: $p = 0,0016$.

5. Diskussion

Zusammenfassend lieferte die vorliegende Studie folgende Ergebnisse:

- Die click-ABR-Hörschwelle von *du/du*-Mäusen war im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren im Mittel um 18 dB erhöht.
- Die Wachstumsfunktion der click-ABR-Welle I zeigte reduzierte Amplituden für die *du/du*-Mäuse.
- Frequenzspezifische Hörschwellen der *du/du*-Mäuse waren im Bereich von 2 bis 45,25 kHz erhöht, insbesondere von 11,3 bis 22,6 kHz (bis zu 15 dB).
- Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren waren bei den *du/du*-Mäusen im Mittel um 7 dB erhöhte DPOAE-Pegel für $f_2 = 10$ bis 18 kHz zu messen.

Diese Ergebnisse werden im Folgenden in Zusammenschau mit dem aktuellen Stand der Forschung diskutiert. Des Weiteren werden Fragestellungen für zukünftige Forschungsprojekte formuliert. Schließlich wird eine mögliche klinische Relevanz der vorliegenden Befunde dargelegt.

5.1 Hörschwellen

Während $\alpha 1D^{-/-}$ - und $Ca_v\beta_2^{-/-}$ -Mäuse sowohl für click- als auch für frequenzspezifische Stimuli funktionell taub sind, konnten in der vorliegenden Arbeit für die *du/du*-Mäuse f- und click-ABR-Hörschwellen nachgewiesen werden, welche im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um durchschnittlich 15 dB erhöht waren. Dies spricht dafür, dass die $Ca_v1.3 (= \alpha 1D)$ - und $Ca_v\beta_2$ -Untereinheiten essentiell für Funktion von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in inneren Haarzellen sind (Platzer *et al.*, 2000; Dou *et al.*, 2004; Neef *et al.*, 2009), während die $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit eine modulierende Rolle spielt.

Die erhöhte Hörschwelle der *ducky*-Mäuse lässt sich aus den elektrophysiologischen Ableitungen an den inneren Haarzellen dieser Tiere erklären. Die maximale Amplitude der Ca^{2+} -Ströme ist bei den *du/du*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um 30% reduziert. Außerdem sind die Strom-Spannungs-Kurven um 5 mV zu positiveren Werten hin verschoben (Fell, 2013; Fell *et al.*, 2016). Daher ist bei den *ducky*-Mäusen eine stärkere Depolarisation der IHZ als bei den Wildtyp-Tieren erforderlich, um die Ca^{2+} -Kanäle der Ribbon-Synapse zu aktivieren. Die stärkere Depolarisation wird durch eine vermehrte Auslenkung der Stereozilien erreicht, welche wiederum durch die Stimulation der

Basilarmembran mit einem höheren Schalldruckpegel erzielt wird (*Fettiplace und Hackney, 2006*).

Bereits aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die biophysikalischen Eigenschaften von Ca_v1.3-Kanälen entlang der longitudinalen Achse der Cochlea variieren (*Johnson und Marcotti, 2008; Engel, 2008*). Auch bei *ducky*-Mäusen zeigten sich entsprechende Unterschiede: während die durchschnittliche Stromstärke der Calciumkanäle in den IHZ der apikalen Windung (2 bis 8 kHz) um 30% im Vergleich zum Wildtyp reduziert war, betrug die Funktionseinschränkung in den IHZ des medialen Drittels (8 bis 17 kHz) durchschnittlich 47% (*Fell et al., 2016*). Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen der f-ABR-Messungen in der vorliegenden Arbeit, welche bei den *ducky*-Mäusen für die mittleren Frequenzen (11,3 bis 22,6 kHz) einen größeren Schwellenschwund als für die tiefen Frequenzen (2 bis 8 kHz) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zeigten (Abb. 18).

5.2 ABR-Wachstumsfunktion

Neben der Hörschwelle ist auch die Funktion der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit bei überschwelligen Lautstärkepegeln von Interesse, gerade im Hinblick auf eine mögliche Rolle bei der zeitlichen Auflösung von Schallreizen (*Pirone et al., 2014*). Dies spielt u.a. beim Sprachverstehen und bei der Detektion von akustischen Signalen im Störschall eine entscheidende Rolle.

Um den Aspekt des überschwelligen Hörens näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Wachstumsfunktionen der click-ABR-Welle I für Wildtyp- und *ducky*-Mäuse bestimmt. Die Höhe der ABR-Welle-I-Amplitude stellt ein Maß für die Anzahl der synchron feuernenden akustisch stimulierten Hörnervenzellen dar (*Maison et al., 2013*) und korreliert mit der Anzahl intakter Ribbon-Synapsen zwischen der IHZ und den angrenzenden afferenten Dendriten des Hörnerven. Umgekehrt ist eine reduzierte ABR-Welle-I-Amplitude mit einer erniedrigten Anzahl der präsynaptischen Ribbons ohne gegenüberliegende postsynaptische Densität („orphan ribbons“) assoziiert (*Kujawa und Liberman, 2009; Lin et al., 2011*).

Eine reduzierte Amplitude der ABR-Welle-I wurde mit Hyperakusis-assoziiertem Verhalten bei Mäusen (*Hickox und Liberman, 2014*) und Tinnitus bei Menschen assoziiert (*Gu et al., 2012; Schaette und McAlpine, 2011*). Bei der Mausmutante *Gla3^{-/-}*, welcher die α_3 -Untereinheit des inhibitorischen Glycinrezeptors an den efferenten Synapsen zwischen medialem olivocochleären Bündel und äußeren Haarzellen fehlt, findet sich ebenfalls eine reduzierte Welle-I-Amplitude (*Dlugaiczyk et al., 2016*). Außerdem ist die Signaldetektion im

Störgeräusch bei diesen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren eingeschränkt (Tziridis et al., 2017).

In der vorliegenden Studie zeigten *ducky*-Mäuse ab 30 dB über der Hörschwelle (SL = sensation level) eine reduzierte click-ABR-Welle-I-Amplitude im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Bei 65 dB SL (maximaler Stimulationspegel) war die Amplitude bei den *ducky*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um 25% reduziert. Diese Befunde passen zu den elektrophysiologischen Messungen an IHZ von *ducky*-Mäusen, welche eine um 30% reduzierte maximale Ca^{2+} -Strom-Amplitude im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zeigten (Fell, 2013). Des Weiteren spiegelt sich die reduzierte ABR-Welle-I-Amplitude bei den *ducky*-Mäusen als Zeichen der gestörten synaptischen Signalübertragung zwischen IHZ und Hörnerven auch in der erhöhten Anzahl an „orphan ribbons“ bei den *ducky*- im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren wider (Fell et al., 2016).

Eine ähnliche Korrelation zwischen Synapsenmorphologie, elektrophysiologischen Ableitungen und ABR-Messungen zeigte sich in einer Studie zur Rolle der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit von VGCCs für den Hörvorgang (Pirone et al., 2014). Die $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit findet sich hauptsächlich an der Synapse zwischen Hörnervenfasern und Zellen des ventralen *Nucleus cochlearis* (sog. „bushy cells“), während die Expression in inneren und äußeren Haarzellen vernachlässigbar gering ist. In den ABR-Messungen an $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren eine um 44% reduzierte Amplitude der ABR-Welle II, welche dem neuronalen Signal im *Nucleus cochlearis* entspricht. Des Weiteren wurde in extrazellulären Ableitungen an den „bushy cells“ eine in der gleichen Größenordnung reduzierte Aktionspotentialrate bei akustischer Stimulation gemessen. Beide Befunde zusammen sprechen für eine beeinträchtigte synaptische Signalübertragung an der Synapse zwischen Hörnervenfasern und „bushy cells“. Korrelierend dazu zeigte sich eine veränderte Synapsenmorphologie zwischen Hörnervenfasern und „bushy cells“ mit einer reduzierten Anzahl von prä- und postsynaptischen $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen und einem geringeren Durchmesser der Hörnervenfasern. Als funktionelle Konsequenz wurde in Verhaltensexperimenten eine verschlechterte zeitliche Auflösung von Schallsignalen bei den Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren gemessen (Pirone et al., 2014).

In Würdigung dieser Befunde sollte bei den *ducky*-Mäusen in zukünftigen Verhaltensexperimenten untersucht werden, ob diese Tiere auch eine verschlechterte zeitliche Diskrimination von Schallreizen und eine eingeschränkte Signaldetektion im Störschall aufweisen.

5.3 Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen

Die gemittelte DPOAE-Amplitude über die Frequenzen von 10 bis 18 kHz ist bei den *ducky*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um 7 dB erhöht (Abb. 19). Die folgenden beiden Mechanismen liefern mögliche Erklärungen für diese Beobachtung.

(i.) Verminderte Aktivierung des medialen olivocochleären Bündels: Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ist die Hörschwelle bei den *ducky*-Mäusen im Bereich von 10 bis 18 kHz um ca. 15 dB erhöht. Das bedeutet, dass bei gleichem Lautstärkepegel (SPL) bei den *ducky*-Mäusen eine geringere Aktivierung des Hörnerven stattfindet. Außerdem ist selbst nach Normalisierung der Hörschwellen (SL) die ABR-Welle-I-Amplitude der *ducky*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen vermindert (zumindest in den click-ABR-Messungen), was ebenfalls eine verminderte synchrone Aktivierung von einzelnen Hörnervenfaseren bedeutet. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass der negative Feedbackmechanismus des efferenten olivocochleären Bündels bei den *ducky*-Mäusen in geringerem Maße als bei den Wildtyp-Tieren aktiviert wird (Zusammenfassung bei *Guinan, 2011*). Eine verminderte efferente Inhibition der äußeren Haarzellen führt zu einer gesteigerten Aktivität dieser Zellen, welche sich in einer erhöhten DPOAE-Amplitude niederschlagen kann.

(ii.) Beeinträchtigte synaptische Signalübertragung an der Synapse zwischen MOC und ÄHZ: Die efferenten Präsynapsen des medialen olivocochleären Bündels (MOC) enthalten $Ca_v1.2$ -Kanäle (*Waka et al., 2003*). Bislang ist nicht bekannt, ob sich in der efferenten Präsynapse auch die $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit befindet. Falls ja, wäre denkbar, dass der Ca^{2+} -Einstrom in die efferente Präsynapse bei den *ducky*-Mäusen reduziert ist, was eine verminderte Transmitter-Freisetzung und damit eine verminderte Inhibition der äußeren Haarzellen zur Folge hätte (*Fell, 2013*).

Im Gegensatz zu den *ducky*-Mäusen fehlen bei $\alpha 1D^{-/-}$ - und $Ca_v\beta_2^{-/-}$ -Mäusen die DPOAEs bis 20 kHz und sind erst für höhere Frequenzen schwach nachweisbar (*Dou et al., 2004; Neef et al., 2009*). Ein möglicher Grund hierfür ist die Degeneration der äußeren Haarzellen bei $\alpha 1D^{-/-}$ Mäusen, beginnend an der apikalen Windung ab P14 (*Platzer et al., 2000*) bzw. die Degeneration der Stereozilien der ÄHZ (*Dou et al., 2004*). Bei den $Ca_v\beta_2^{-/-}$ -Mäusen ließen sich zwar keine strukturellen Veränderungen der ÄHZ nachweisen, jedoch fehlten auch hier die DPOAEs nahezu vollständig (*Neef et al., 2009*). In Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Cochlea von *ducky*-Mäusen zeigte sich bisher im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren keine Degeneration der ÄHZ bzw. ihrer Stereozilien (*Fell et al., 2016*).

Zusammenfassend sprechen auch die strukturellen und funktionellen Befunde an den äußeren Haarzellen dafür, dass die $Ca_v1.3$ - und $Ca_v\beta_2$ -Untereinheiten essentiell für deren Funktion sind, während die $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit eine modulierende Rolle einnimmt.

5.4 Klinische Bezüge

Gabapentin

Gabapentin wird als Antikonvulsivum und zur Behandlung neuropathischer Schmerzen (z.B. postherpetische Neuralgie, diabetische Neuropathie) eingesetzt. Es bindet an die $\alpha_2\delta_1$ - und $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Über eine Beeinflussung des intrazellulären Recyclings der o.g. $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten wird bei Applikation von Gabapentin in der Zellkultur über 40 Stunden der Transport von $\alpha_2\delta_1$ und $\alpha_2\delta_2$ sowie der assoziierten α -Untereinheiten $Ca_v2.1$ und $Ca_v2.2$ zur Zellmembran gehemmt. Dadurch resultiert letztendlich eine Reduktion des Calcium-Einstroms in die Zelle (Zusammenfassung bei *Zamponi et al., 2015*).

In einer Fallbeschreibung wird berichtet, dass eine Patientin, die Gabapentin wegen diabetischer Neuropathie einnahm, aus ungeklärten Gründen ein akutes Nierenversagen erlitt (*Pierce et al., 2008*). In diesem Zusammenhang entwickelte sie Myokloni und Verwirrheitszustände mit Halluzinationen. Des Weiteren beklagte sie verschwommenes Sehen und einen subjektiven Hörverlust. Ein Audiogramm wurde nicht angefertigt. Der Gabapentin-Spiegel im Serum war im Vergleich zu den Normwerten um das Vierfache erhöht. Nach Dialyse bildeten sich die o.g. Symptome schnell zurück. In der Fachinformation des Herstellers wird Hörminderung mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 1% als Nebenwirkung von Gabapentin angegeben (*Pierce et al., 2008*).

Die Expression der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit in der Cochlea sowie die oben beschriebene Verschlechterung der Hörschwelle bei *ducky*-Mäusen liefern mögliche Erklärungsansätze für die beschriebene Hörminderung nach Gabapentin-Intoxikation. Jedoch sollten an dieser Stelle auch mögliche zentrale Wirkungen von Gabapentin berücksichtigt werden. Aufgrund der weit verbreiteten Expression der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit im ZNS (*Barclay et al., 2001*) ist auch eine Modulation der zentralen Hörbahn durch Gabapentin möglich. Hierfür spricht auch die veränderte Morphologie der ABR-Welle III bei *ducky*-Mäusen (*Fell et al., 2016*), welche dem neuronalen Signal auf Höhe der superioren Olive entspricht (*Knipper et al., 2013*).

Auf der Basis dieser Beobachtungen sollte in weiteren morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen die Rolle der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit im zentral-auditorischen System weiter untersucht werden. Des Weiteren ist es in der klinischen Praxis von Bedeutung, das Bewußtsein für Hörminderung als mögliche Nebenwirkung von Medikamenten, welche an spannungsgesteuerten Calciumkanälen angreifen, zu schärfen.

CACNA2D2-Mutation

Bislang liegen zwei Fallbeschreibungen über *CACNA2D2*-Mutationen beim Menschen vor. *Edvardson et al., 2013* berichten über drei Geschwisterkinder blutsverwandter Eltern (Cousin und Cousine ersten Grades), welche eine homozygote Mutation des *CACNA2D2*-Gens zeigen. Dadurch wird an Position 1040 des Proteins der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit die Aminosäure Leucin durch Prolin ersetzt (L1040P). Diese Substitution resultiert in einer geringeren Calciumstromstärke und einer verzögerten Inaktivierung von Calciumkanälen. Alle drei Geschwister leiden unter einer epileptischen Enzephalopathie, einer globalen Intelligenzminderung und einer allgemeinen Entwicklungsverzögerung. Im MRT zeigt sich eine Atrophie des Kleinhirns. In o.g. Arbeit wird des Weiteren beschrieben, dass die Kinder auf Geräusche reagieren, jedoch keine Sprachentwicklung zeigen. Es wird nicht erwähnt, ob bei den Kindern eine Hörprüfung durchgeführt wurde. Wahrscheinlich war dies aufgrund der geistigen Behinderung nicht möglich.

Pippucci et al., 2013 berichten über ein Kind blutsverwandter Eltern (ebenfalls Cousin und Cousine ersten Grades) mit Myoklonien, tonisch-klonischen Anfällen, Absence-Epilepsien und allgemeiner Intelligenzminderung sowie einer Kleinhirnatrophie im MRT. Hier wurde ebenfalls eine *CACNA2D2*-Mutation nachgewiesen: durch den Austausch von Guanin gegen Arginin an Position 6407 (G6407A) kommt es zu einer Frameshift-Mutation mit vorzeitigem Kettenabbruch bei der Proteinsynthese. In dieser Arbeit wird keine Aussage über Hör- und Sprachvermögen des Kindes getroffen. Auch hier wurden keine audiometrischen Untersuchungen durchgeführt.

Aufgrund des in der vorliegenden Arbeit gezeigten Einflusses der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit auf das Hörvermögen ist es empfehlenswert, bei Patienten mit *CACNA2D2*-Mutation eine objektive Bestimmung der Hörschwelle (z.B. mittels Hirnstammaudiometrie in Sedierung) durchzuführen. Im Falle einer Hörminderung stellt dies die Voraussetzung für die Anpassung von Hörgeräten dar. Hier sollte beachtet werden, dass sich gerade bei geistig behinderten Kindern die Korrektur einer Hörschwäche im Rahmen eines therapeutischen Gesamtkonzeptes positiv auf die globale Entwicklung auswirken kann (*Kaga et al., 2007; Youm et al., 2013*).

5.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine homozygote Mutation des *Cacna2d2*-Gens bei der *ducky*-Maus einen modulierenden Einfluss auf die Hörschwelle und die überschwellige Aktivität des Hörnerven ausübt. Die Funktion der äußeren Haarzellen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Mutation beeinträchtigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass medikamenteninduzierte und genetisch bedingte Veränderungen an der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle auch für sensorineurale Schwerhörigkeit beim Menschen verantwortlich sein können. Dies sollte bei der Differenzialdiagnose von sensorineuraler Schwerhörigkeit in der klinischen Praxis bedacht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ashmore J (2008). Cochlear Outer Hair Cell Motility. *Phys Rev* 88(1):173-210.
2. Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nürnberg G, Ali A, Ahmad I, Sinnegger – Brauns MJ, Brandt N, Engel J, Mangoni ME, Farooq M, Kahn HU, Nürnberg P, Striessnig J, Bolz HJ (2011). Loss of Ca_v 1.3 (*CACNA1D*) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature Neuroscience* 14(1): 14(1):77-84.
3. Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM, Kusumi K, Perez-Reyes E, Lander ES, Frankel WN, Gardiner RM, Dolphin AC, Reeds M (2001). Ducky Mouse Phenotype of Epilepsy and Ataxia Is Associated with Mutations in the *Cacna2d2* Gene and Decreased Calcium Channel Current in Cerebellar Purkinje Cells. *J Neurosci* 21(16):6095-104.
4. Boenninghaus HG, Lenarz T (2007). Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, *Springer Medizin Verlag* Heidelberg, 13. Auflage, S. 40-42.
5. Brodbeck J, Davies A, Courtney JM, Meir A, Balaguero N, Canti C, Moss FJ, Page KM, Pratt WS, Hunt SP, Barclay J, Rees M, Dolphin AC (2002). The Ducky Mutation in *Cacna2d2* Results in Altered Purkinje Cell Morphology and Is Associated with the Expression of a Truncated $\alpha_2\delta$ -2 Protein with Abnormal Function. *J Biol Chem* 277(10): 7684-93.
6. Catterall WA (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a003947. doi:10.1101.
7. Dallos P (2008). Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr Opin Neurobiol* 18(4):370-76.
8. Dannhof BJ, Bruns V (1993). The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear Res* 66(1):8-22.
9. Długaiczek J (2014). Glycinrezeptoren in der Cochlea: Expression, entwicklungsabhängige Regulation und Funktionsanalysen. *Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*.
10. Długaiczek J, Hecker D, Neubert C, Buerbank S, Campanelli D, Becker CM, Betz H, Knipper M, Rüttiger L, Schick B (2016). Loss of glycine receptors containing the α_3 subunit compromises auditory nerve activity, but not outer hair cell function. *Hear Res* 337:25-34.
11. Dolphin AC (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 19:237-44.
12. Dolphin AC (2013). The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828:1541-49.

13. Dou H, Vasquez AE, Namkung Y, Chu H, Cardell EL, Nie L, Parson S, Shin HS, Yamoah EN (2004). Null Mutation of $\alpha 1D$ Ca^{2+} Channel Gene Results in Deafness but No Vestibular Defect in Mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 5(2):215-26.
14. Edvardson S, Oz S, Abulhijaa FA, Taher FB, Shaag A, Zenvirt S, Dascal N, Elpeleg O (2013). Early infantile epileptic encephalopathy associated with a high voltage gated calcium channelopathy. *J Med Genet* 50:118-123.
15. Engel J (2008). Gerbils can tune in. *J Physiol* 586(4):919.
16. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25:533-35.
17. Fell B (2013). Rolle von $\alpha 2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle und Modulation von BK-Kanälen in inneren Haarsinneszellen der Säugercochlea. *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*.
18. Fell B, Eckrich S, Blum K, Eckrich T, Hecker D, Obermair GJ, Münkner S, Flockerzi V, Schick B, Engel J (2016). $\alpha 2\delta 2$ controls the function and trans-synaptic coupling of $Ca_v1.3$ channels in mouse inner hair cells and is essential for normal hearing. *J Neurosci* 36(43):11024-36.
19. Fettiplace R, Hackney CM (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci* 7(1):19-29.
20. Fuchs P (2002). The Synaptic Physiology of Cochlear Hair Cells. *Audiol Neurootol* 7:40-44.
21. Glowatzki E, Grant L, Fuchs P (2008). Hair Cell Afferent Synapses. *Curr Opin Neurobiol* 18(4):389-95.
22. Gu JW, Herrmann BS, Levine RA, Melcher JR (2012). Brainstem auditory evoked potentials suggest a role for the ventral cochlear nucleus in tinnitus. *J Assoc Res Otolaryngol* 13(6):819-33.
23. Guthardt Torres C (2015). Evaluierung eines neuen Analyseverfahrens zur Messung otoakustischer Emissionen im Hochtonbereich bis 18 kHz. *Dissertation zur Erlangung des Grades des Dr. med. der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*.
24. Guinan JJ (2011). Physiology of the medial and lateral olivocochlear systems. In (DK Ryugo, RR Fay and AN Popper, eds.): *Auditory and vestibular efferents*. Springer Handbook of Auditory Research. Springer, New York.
25. Hecker DJ, Lohscheller J, Bader C, Delb W, Schick B, Dlugaiczyk J (2011). A new method to analyze distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) in the high-frequency range up to 18 kHz using windowed periodograms. *IEEE Trans Biomed Eng* 58(8):2369-2377.
26. Hickox AE, Liberman MC (2014). Is noise-induced cochlear neuropathy key to the generation of hyperacusis or tinnitus? *J Neurophysiol* 111(3):552-64.

27. Hidalgo P, Neely A (2007). Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium* 42(4-5):389-96.
28. Johnson SL, Marcotti W (2008). Biophysical properties of Ca_v1.3 calcium channels in gerbil inner hair cells. *J Physiol* 586(4):1029-42.
29. Kaga K, Shindo M, Tamai F, Tanaka Y (2007). Changes in auditory behaviors of multiply handicapped children with deafness after hearing aid fitting. *Acta Otolaryngol* 559 (Suppl.):9-12.
30. Kemp DT (2002). Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function and use. *Br Med Bull* 63(1):223-241.
31. Knipper M, Van Dijk P, Nunes I, Rüttiger L, Zimmermann U (2013). Advances in the neurobiology of hearing disorders: Recent developments regarding the basis of tinnitus and hyperacusis. *Prog Neurobiol* 111:17-33.
32. Kössl M, Möckel D, Weber M, Seyfarth EA (2008). Otoacoustic emissions from insect ears: evidence of active hearing? *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 194(7):597-609.
33. Kuhn S, Knirsch M, Rüttiger L, Kasperek S, Winter H, Freichel M, Flockerzi V, Knipper M, Engel J (2009). Ba²⁺ currents in inner and outer hair cells of mice lacking the voltage-dependent Ca²⁺ channel subunits beta3 or beta4. *Channels*. 3(5):366-76.
34. Kujawa SG, Liberman MC (2009). Adding Insult to Injury: Cochlear Nerve Degeneration after “Temporary” Noise-Induced Hearing Loss. *J Neurosci* 29(45):14077-85.
35. Lin HW, Furman AC, Kujawa SG, Liberman MC (2011). Primary neural degeneration in the Guinea pig cochlea after reversible noise-induced threshold shift. *J Assoc Res Otolaryngol* 12(5):605-16.
36. Maison SF, Usubuchi H, Liberman MC (2013). Efferent Feedback Minimizes Cochlear Neuropathy from Moderate Noise Exposure. *J Neurosci* 33(13):5542-52.
37. Neef J, Gehrt A, Bulankina AV, Mayer AC, Riedel D, Gregg RG, Strenzke N, Moser T (2009). The Ca²⁺ Channel Subunit β2 Regulates Ca²⁺ Channel Abundance and Function in Inner Hair Cells and Is Required for Hearing. *J Neurosci* 29(34):10730-40.
38. Oxenham AJ, Bacon SP (2003). Cochlear compression: perceptual measures and implications for normal and impaired hearing. *Ear Hear* 24(5):352-66.
39. Pangršič T, Reisinger E, Moser T (2012). Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci* 35(11):671-80.
40. Pierce DA, Holt SR, Reeves-Daniel A (2008). A Probable Case of Gabapentin-Related Reversible Hearing Loss in a Patient with Acute Renal Failure. *Clin Ther* 30: 1681-4
41. Pippucci T, Parmeggiani A, Palombo F, Maresca A, Angius A, Crisponi L, Cucca F, Liguori R, Valentino ML, Seri M, Carelli V (2013). A Novel Null Homozygous Mutation Confirms

CACNA2D2 as a Gene Mutated in Epileptic Encephalopathy. *PLoS One* 8(12):e82154. doi: 10.1371.

42. Pirone A, Kurt S, Zuccotti A, Rüttiger L, Pilz P, Brown DH, Franz C, Schweizer M, Rust MB, RübSamen R, Friauf E, Knipper M, Engel J (2014). $\alpha\delta\delta$ Is Essential for Normal Structure and Funktion of Auditory Nerve Synapses and Is a Novel Candidate for Auditory Processing Disorders. *J Neurosci* 34 (2): 434-45
43. Platzter 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^{2+} Channels. *Cell* 102:89-97
44. Probst R, Grevers G, Iro H (2008). Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 3. Auflage
45. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM (2001). Neuroscience. *Palgrave Macmillan*, 2. Auflage
46. Rahne T, Plontke S (2012). Objektive audiologische Diagnostik. *Laryngorhinootologie* 91(10):649-64.
47. Safieddine S, El-Amaraoui A, Petit C (2012). The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Ann Rev Neurosci* 35(1): 509-28.
48. Schaette R, McAlpine D (2011). Tinnitus with a Normal Audiogram: Physiological Evidence for Hidden Hearing Loss and Computational Model. *J Neurosci* 31(38):13452-7.
49. Schick B (2002). Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP): Expression im Innenohr und audiologische Untersuchung von VASP^{-/-} knock-out-Mäusen. *Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*
50. Tziridis K, Buerbank S, Eulenburg V, Długaiczek J, Schulze H (2017). Deficit in acoustic signal-in-noise detection in glycine receptor $\alpha 3$ subunit knockout mice. *Eur J Neurosci* 45(4):581-6.
51. Waka N, Knipper M, Engel J (2003). Localization of the calcium channel subunits $\text{Ca}_v1.2$ ($\alpha 1C$) and $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) in the mouse organ of Corti. *Histol Histopathol* 18(4):1115-23.
52. Youm HY, Moon IJ, Kim EY, Kim BY, Cho YS, Chung WH, Hong SH (2013). The auditory and speech performance of children with intellectual disability after cochlear implantation. *Acta Otolaryngol* 133(1):59-69.
53. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015). The Physiology, Pathology and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67(4):821-70.

7. Anhang

7.1 Tabellen

Tab. 1: Durchgeführte Messungen

Cacna2d2^{wf/wf}

1.	176-0062	männlich	click, pure tone und DPOAE
2.	176-0080	weiblich	click, pure tone
3.	176-0122	männlich	click, pure tone
4.	176-0125	männlich	click, pure tone
5.	176-0142	weiblich	click, pure tone
6.	176-0240	weiblich	click, pure tone und DPOAE
7.	176-0242	männlich	click, pure tone
8.	176-0246	weiblich	click, pure tone und DPOAE
9.	176-0267	weiblich	DPOAE ¹

¹ Click- und f-ABR-Messungen (pure tone) wegen Narkoseproblemen nicht verwertbar.

Cacna2d2^{du/du}

1.	176-0076	männlich	click, pure tone
2.	176-0139	weiblich	click, pure tone
3.	176-0138	weiblich	click, pure tone
4.	176-0179	weiblich	click, pure tone ² und DPOAE
5.	176-0233	männlich	click, pure tone
6.	176-0244	weiblich	click, pure tone und DPOAE
7.	176-0245	weiblich	click, pure tone und DPOAE
8.	176-0252	männlich	click, pure tone und DPOAE

² keine verwertbaren f-ABR-Messungen (pure tone) wegen Narkoseproblemen

Tab. 2: Click-ABR Hörschwellen

<i>Cacna2d2</i>^{wt/wt}-Mäuse		<i>Cacna2d2</i>^{du/du}-Mäuse	
Tier	Hörschwelle (dB SPL)	Tier	Hörschwelle (dB SPL)
176-0062 R	10	176-0076 R	60
176-0062 L	15	176-0076 L	30
176-0080 R	15	176-0139 R	35
176-0080 L	15	176-0139 L	40
176-0122 R	15	176-0138 R	20
176-0122 L	15	176-0138 L	60
176-0125 R	15	176-0179 R	45
176-0125 L	15	176-0233 R	30
176-0142 R	15	176-0233 L	25
176-0142 L	20	176-0244 R	25
176-0240 R	10	176-0244 L	30
176-0240 L	15	176-0245 R	25
176-0242 R	20	176-0245 L	25
176-0242 L	15	176-0252 R	20
176-0246 R	15	176-0252 L	25
176-0246 L	10		
Mittelwert	14,69	Mittelwert	33,00
SD	2,87	SD	12,93
Anzahl (n)	16 Ohren / 8 Tiere	Anzahl (n)	15 Ohren / 8 Tiere

Tab. 3: f-ABR-Hörschwellen

***Cacna2d2^{wt/wt}*-Mäuse** (n = 8 Tiere / max. 16 Ohren): Hörschwelle in dB SPL

Tier	Frequenz (kHz)									
	2	2,8	4	5,6	8	11,3	16	22,6	32	45,2
176 – 0062 R	80	80	62	35	35	26	20	20	38	80
176 – 0062 L	80	80	59	47	32	32	29	20	50	80
176 – 0080 R	90	75	65	50	35	25	15	25	35	80
176 – 0080 L	80	75	60	35	40	25	20	30	50	70
176 – 0122 R	80	70	60	35	25	10	25	30	60	80
176 – 0122 L	70	65	60	40	30	20	20	30	60	80
176 – 0125 R	70	65	55	60	45	40	30	40	50	80
176 – 0125 L	70	70	50	60	50	30	35	40	65	80
176 – 0142 R	80	65	45	30	25	30	10	40	50	80
176 – 0142 L	90	75	70	55	40	35	kW **	kW **	kW **	kW **
176 – 0240 R	75	75	50	40	35	25	25	25	40	75
176 – 0240 L	70	50	50	45	35	10	35	40	55	75
176 – 0242 R	70	60	50	40	40	25	10	25	75	90
176 – 0242 L	70	60	55	45	45	10	10	25	50	90
176 – 0246 R	70	60	40	30	35	10	10	20	50	90
176 – 0246 L	90	70	55	40	35	20	10	30	55	80
Mittelwert	77,19	68,44	55,38	42,94	36,38	23,31	20,27	29,33	52,20	80,67
Standardabweichung	7,74	8,31	7,69	9,53	6,85	9,41	9,28	7,53	10,34	5,63
Anzahl (Ohren)	16	16	16	16	16	16	15	15	15	15

Cacna2d2^{du/du}-Mäuse (n = 7 Tiere / max. 14 Ohren)

Tier	Frequenz									
	2	2,8	4	5,6	8	11,3	16	22,6	32	45,2
176 – 0076 R	90	90	80	55	30	30	45	60	75	100
176 – 0076 L	95	90	75	50	30	30	30	70	85	100
176 – 0139 R	80	70	55	45	70	50	60	50	50	80
176 – 0139 L	90	90	90	kW **	kW**	kW **	kW **	kW **	kW **	kW **
176 – 0138 R	75	75	55	60	40	45	25	40	65	80
176 – 0138 L	>90	75	kW**	50	kW **	kW **	60	65	65	80
176 – 0233 R	80	70	55	70	35	45	30	40	50	90
176 – 0233 L	90	65	70	45	40	50	30	50	45	70
176 – 0244 R	80	90	55	45	40	35	25	30	40	50
176 – 0244 L	80	80	55	45	45	55	55	kW **	kW **	kW **
176 – 0245 R	80	70	65	45	35	25	35	45	45	kW **
176 – 0245 L	90	70	kW **	kW **	kW **	kW **	kW **	kW **	kW **	kW **
176 – 0252 R	80	65	60	40	35	25	25	40	45	65
176 – 0252 L	80	65	55	40	40	30	35	35	50	65
Mittelwert	84,29	76,07	64,17	49,17	40,00	38,18	37,92	47,73	55,91	78,00
Standardabweichung	6,16	10,03	12,03	8,75	10,95	11,02	13,56	12,72	14,46	16,02
Anzahl (Ohren)	14	14	12	12	11	11	12	11	11	10

kW ** = kein Wert bei dieser Frequenz

Tab. 4: click-ABR-Welle I-Wachstumsfunktionen

***Cacna2d2^{wt/wt}*-Mäuse** (n = 8 Tiere / 16 Ohren) : Amplitude der ABR-Welle I (μV)

Tier	Schalldruckpegel über Hörschwelle (dB SL)											
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
0062 R ¹	1,59	2,47	3,36	4,36	4,72	5,18	5,33	5,43	5,67	6,22	5,89	6,28
0062 L	0,58	0,93	1,23	1,38	1,73	1,98	2,21	2,88	3,05	3,49	3,65	3,78
0080 R	1,42	2,24	2,67	3,83	4,49	5,88	6,48	7,50	7,61	9,00	9,13	9,16
0080 L	0,44	0,63	1,02	1,42	2,09	2,39	3,10	3,26	3,98	4,03	4,56	4,64
0122 R	0,89	2,54	2,69	3,28	3,96	4,42	5,59	5,84	5,90	6,05	6,29	6,11
0122 L	0,87	1,20	2,06	2,55	3,69	4,02	4,81	5,43	5,96	5,63	5,75	6,10
0125 R	1,06	1,08	1,81	2,48	3,49	3,85	4,18	4,62	5,23	5,57	5,34	6,05
0125 L	1,30	1,03	1,82	2,97	3,30	3,22	3,64	4,49	4,67	5,06	5,42	5,25
0142 R	2,36	4,33	6,77	8,69	10,71	13,01	14,47	15,86	17,98	19,18	19,92	21,41
0142 L	1,79	3,68	6,99	6,65	6,72	12,01	11,03	8,67	15,53	15,40	15,56	14,07
0240 R	2,29	3,76	5,33	7,60	8,56	10,79	12,31	14,09	14,79	16,08	16,87	16,40
0240 L	2,78	4,43	5,79	5,30	8,06	9,56	10,53	11,60	11,95	11,97	12,60	11,47
0242 R	2,43	3,78	4,41	5,81	7,43	8,44	9,71	10,62	11,49	11,19	11,83	11,90
0242 L	1,41	2,61	3,94	5,22	5,81	8,15	10,11	11,04	12,26	12,71	13,07	12,37
0246 R	3,68	4,97	6,48	8,60	11,45	13,47	14,88	16,06	17,26	17,98	18,67	20,17
0246 L	1,08	1,90	2,65	3,10	3,75	4,75	4,87	5,37	5,49	5,66	6,57	7,42
MW	1,62	2,60	3,69	4,58	5,62	6,94	7,70	8,30	9,30	9,70	10,07	10,16
SD	0,88	1,41	2,03	2,38	2,93	3,86	4,13	4,39	5,08	5,27	5,45	5,53
n (Ohren)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

¹ Aus Platzgründen wurden hier nur die Endziffern der einzelnen Tiere angegeben.

Cacna2d2^{ko/ko}-Mäuse (n = 7 Tiere / max. 14 Ohren): Amplitude der ABR-Welle I (μV)

Tier	Schalldruckpegel über Hörschwelle (dB SL)											
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
0139 R¹	1,20	1,17	1,53	2,14	2,21	2,70	2,74	3,43	3,37	3,20	4,19	5,02
0139 L	kW	0,19	1,24	2,01	2,45	2,40	2,93	3,07	3,18	3,25	2,73	3,18
0138 R	3,05	4,12	5,48	8,01	9,24	11,33	12,92	15,15	16,49	19,45	26,52	31,56
0138 L	kW**	kW	kW	kW	kW	0,06	0,26	0,41	0,33	0,51	0,80	0,40
0076 R	kW	kW	kW	0,85	0,11	1,14	1,37	2,08	2,18	2,64	3,59	3,84
0076 L	0,20	0,48	0,70	1,34	1,24	1,71	1,62	1,33	0,81	1,85	2,17	3,33
0233 R	2,49	4,17	5,71	6,86	7,79	7,66	7,32	7,19	6,97	4,24	2,69	3,16
0233 L	3,91	4,73	5,54	5,37	6,29	5,32	5,24	4,19	2,31	4,56	5,02	4,37
0244 R	3,46	4,01	4,96	5,96	6,56	8,10	9,33	10,02	8,81	7,55	7,85	9,05
0244 L	1,85	2,23	2,83	3,09	3,18	3,52	4,50	5,55	5,28	5,48	6,77	7,55
0245 R	5,18	6,51	8,37	8,40	10,77	12,29	13,87	15,16	14,73	14,61	17,20	17,81
0245 L	2,30	2,44	2,71	2,18	3,13	2,96	2,59	2,02	1,00	2,80	1,28	0,61
0252 R	3,91	5,46	6,50	7,92	8,53	9,22	10,17	11,01	10,65	10,68	10,65	10,71
0252 L	2,72	3,99	4,96	6,03	6,72	7,72	8,31	7,29	4,73	5,03	4,93	6,49
MW	2,75	3,29	4,21	4,63	5,25	5,44	5,94	6,28	5,78	6,13	6,89	7,65
SD	1,38	1,99	2,37	2,77	3,38	3,93	4,42	4,91	5,15	5,33	7,11	8,23
n (Ohren)	11	12	12	13	13	14	14	14	14	14	14	14

** kein Wert bei dieser Frequenz

Tab. 5: DPOAE-Pegel***Cacna2d2*^{wt/wt}-Mäuse** (n = 3 Tiere / 6 Ohren)

f2 (Hz)	DPOAE-Amplitude (µV)					
	176 - 0062		176 - 0240		176 - 0267	
	re	li	re	li	re	li
10013	12,51	5,40	20,52	11,53	17,85	15,29
10475	13,66	13,48	25,91	18,54	15,04	19,82
11019	7,77	20,81	15,56	25,20	15,38	27,43
11509	10,93	23,14	22,39	13,99	21,90	24,63
11935	17,45	26,89	13,54	18,51	26,87	29,22
12521	17,11	25,67	7,16	10,35	26,86	24,63
12992	16,94	24,71	15,46	20,53	23,23	27,47
13536	18,09	23,07	21,92	20,15	24,87	28,52
14006	15,49	23,21	24,23	22,43	16,16	25,78
14498	13,47	24,06	23,97	22,92	20,18	25,83
15029	12,89	21,02	19,57	23,91	18,94	25,97
15503	16,71	18,26	16,31	25,36	20,89	26,30
16011	19,99	17,51	18,36	21,67	29,14	33,91
16465	22,71	13,62	31,61	29,18	34,79	34,14
17013	25,07	12,34	31,81	28,63	36,44	34,13
17519	25,24	9,38	31,75	28,05	38,39	34,68
17921	23,11	6,59	31,74	28,17	36,89	32,98
MW (10 – 18 kHz)	17,01	18,19	21,87	21,71	24,93	27,69

Cacna2d2^{du/du}-Mäuse (n = 4 Tiere / 8 Ohren)

f2 (Hz)	DPOAE-Amplitude (µV)							
	176 - 0179		176 - 0244		176 - 0245		176 - 0252	
	re	li	re	li	re	li	re	li
10013	23,87	19,25	17,50	16,26	28,74	31,82	19,74	23,75
10475	21,69	21,56	19,86	27,61	27,29	27,79	26,13	15,75
11019	24,03	15,58	21,26	29,07	30,21	34,31	27,54	17,91
11509	27,22	28,44	22,69	31,33	31,67	33,77	30,18	20,80
11935	25,74	30,99	25,18	31,80	33,70	36,49	28,34	22,73
12521	28,42	30,84	24,52	28,72	34,96	37,35	18,19	26,19
12992	26,10	29,36	27,14	26,43	34,86	37,60	35,10	32,53
13536	24,87	27,78	28,72	27,44	32,69	35,87	34,15	33,62
14006	22,94	29,73	26,88	25,56	35,08	36,91	33,43	31,89
14498	18,98	30,35	25,81	26,34	32,60	36,65	34,34	29,19
15029	18,18	29,25	25,86	27,43	28,16	35,04	32,28	30,40
15503	23,36	31,24	28,02	24,51	25,71	33,04	31,90	29,15
16011	25,17	32,12	31,52	30,07	21,53	33,42	30,86	33,96
16465	29,48	31,42	35,74	29,93	21,41	36,47	29,44	37,01
17013	30,16	31,33	35,64	29,81	23,93	38,75	30,72	39,09
17519	28,31	31,37	33,06	28,21	25,69	39,09	29,38	39,91
17921	26,53	30,97	31,87	27,98	25,21	38,38	28,32	38,56
MW (10 – 18 kHz)	25,00	28,33	27,13	27,56	29,03	35,46	29,41	29,56

7.2 Abkürzungsverzeichnis

ABR: auditory brainstem response (Hirnstammaudiometrie)

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ANOVA: analysis of variance (Analyse der Varianz/Abweichung)

ÄHZ: äußere Haarzelle

BERA: brainstem evoked response audiometry (Hirnstammaudiometrie)

BM: Basilarmembran

bp: base pairs

***Cacnac2d2* / *CACNAC2d2*:** Gen der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals der Maus / des Menschen

$\text{Ca}_v1.1 - 1.4$: α_1 -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals vom L-Typ

$\text{Ca}_v\beta$: β -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals

dB: Dezibel

DHP: Dihydropyridin

DNA: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)

DPOAE: Distorsionsprodukt-otoakustische Emissionen

du: ducky

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

f: frequenzspezifisch

GluR: Glutamat-Rezeptor

IHZ: innere Haarzelle

KG: Körpergewicht

ko: knockout

LTCC: L-type calcium channel (L-Typ Calciumkanal)

MOC: mediales olivocochleäres (Bündel)

MRT: Magnetresonanztomogramm

nHL: normal hearing level (normierte Hörschwelle)

OAE: otoakustische Emission

P: postnataler Tag

PCR: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

SANDD: sinusatrial node dysfunction and deafness (sinuatriale Knotendysfunktion und Taubheit)

SGN: Spinalganglienneuron

SL: sensation level (Hörschwelle)

SNR: signal-to-noise ratio (Signal-Rausch-Abstand)

SPL: sound pressure level (Schalldruckpegel)

TAE: Tris-Acetat-EDTA

TEOAE: transitorisch evozierte otoakustische Emission

VGCC: voltage-gated calcium channel (spannungsgesteuerter Calciumkanal)

VWA: von-Willebrand-Faktor-A

wt: Wildtyp

ZNS: zentrales Nervensystem

7.3 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Fell B (2013). Rolle von $\alpha 2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle und Modulation von BK-Kanälen in inneren Haarsinneszellen der Säugercochlea. *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.*
- Fell B, Eckrich S, Blum K, Eckrich T, Hecker D, Obermair GJ, Münkner S, Flockerzi V, Schick B, Engel J (2016). $\alpha 2\delta 2$ controls the function and transsynaptic coupling of $Ca_v1.3$ channels in mouse inner hair cells and is essential for normal hearing. *J Neurosci* 36(43):11024-36.

7.4 Danksagung

Ich danke dem Klinikdirektor, Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick, für die Möglichkeit, meine Promotion in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes durchzuführen. Insbesondere danke ich ihm für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Frau PD Dr. med. Julia Długaiczek (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, UKS) danke ich von ganzem Herzen für ihre engagierte Betreuung der Arbeit und die positive Unterstützung in allen Bereichen. Danke für viel konstruktive Kritik, wertvolle Vorschläge und Tipps, die meine Dissertation verbessert haben. Vielen Dank für die Hilfe!

Danke an Herrn Dr. rer. nat. (Dipl. Ing.) Dietmar Hecker (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, UKS) für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Hörmessungen sowie bei der Auswertung der gewonnenen Ergebnisse.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Jutta Engel (Institut für Biophysik, Universität des Saarlandes) für die Überlassung der von ihr und ihrem Team gezüchteten Tiere, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, die Messungen durchzuführen. Ebenso vielen Dank an das Team von Frau Prof. Dr. Engel, Frau Dr. rer. nat. Barbara Fell (geb. Diesteldorf) und Kollegen, die mich bei der Handhabung und Genotypisierung der Mäuse anleiteten. Ganz besonders möchte ich allen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Engel für die gute und konstruktive Zusammenarbeit danken.

Vielen Dank an meine Familie und liebe Freunde, die mich während dieser Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meinem Vater. Er hat mich auf meinem gesamten Werdegang begleitet und stets positiv unterstützt. Der Glaube an mich und dass am Ende alles gut gehen wird, hat mich immer bestärkt durchzuhalten und nicht frühzeitig aufzugeben! Daher möchte ich ihm diese Arbeit widmen! Ich danke dir von ganzem Herzen lieber Papa!

Vielen lieben Dank euch allen!