

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

Auswirkungen eines Schalltraumas auf das Hörvermögen von  
Mäusen mit modifiziertem  $\text{Ca}_v1.3$ -Calciumkanal  
( $\text{Ca}_v1.3\text{DCRD}^{\text{HA/HA}}$ ) in Haarsinneszellen

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von:

Fahmi NASRI

geb. am: 13.05.1993 in Nablus

Tag der Promotion: 11.04.2024

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jutta Engel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alessandro Bozzato

Die Dissertation „Auswirkungen eines Schalltraumas auf das Hörvermögen von Mäusen mit modifiziertem  $\text{Ca}_v1.3$ -Calciumkanal ( $\text{Ca}_v1.3\text{DCRD}^{\text{HA/HA}}$ ) in Haarsinneszellen“ wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jutta Engel am Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) angefertigt.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1    Aufbau und Funktion des Ohres.....	3
2.2    Stationen der Hörbahn .....	7
2.3    Frühe akustisch evozierte Hirnstammpotentiale .....	9
2.4    Spannungsgesteuerte Calciumkanäle.....	11
2.5    Lärm-induzierter versteckter Hörverlust .....	15
2.6    Ziel der Arbeit und Fragestellung .....	16
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1    Versuchstiere.....	18
3.2    Versuchsplanung.....	19
3.3    Narkose und Antidot.....	22
3.4    Versuchsprotokoll .....	24
3.4.1    Versuchsaufbau.....	24
3.4.2    Akustisches Signal und Tonerzeugung .....	25
3.4.3    ABR-Signal-Aufnahme .....	26
3.4.4    Ablauf einer ABR-Messung .....	26
3.5    Vertäubung .....	27
3.6    Auswertung der Hörschwellen.....	28
3.7    Auswertung der Latenzen und Amplituden .....	29
3.8    Statistische Auswertung .....	30
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
4.1    Etablierung der Vertäubungsmethode an einer C57BL/6N-Kontrollgruppe .....	31
4.2    Klick-ABR von Wildtyp- und HA-Mäusen vor und nach Schalltrauma.....	33

4.3	Frequenzabhängige Hörschwellen von $Ca_v1.3DCRD^{HA/HA}$ -Mäusen vor und nach Schalltrauma .....	36
4.4	Regeneration der frequenzabhängigen Hörschwellen von WT- und HA-Mäusen nach Trauma .....	40
4.5	Schalltrauma-induzierte Änderungen der Wachstumsfunktionen der ABR-Welle I von WT- und HA-Mäusen.....	43
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1	Höhere Empfindlichkeit der Hörschwellen der C57BL/6N-WT-Mäuse auf das Liberman-Trauma.....	53
5.2	Vergleich der Hörmessdaten mit denen anderer Untersucher an derselben Messanlage.....	55
5.3	Amplituden der ABR-Welle I zeigen geringeren verdeckten Hörverlust bei HA-Tieren .....	56
5.4	Paradoxe Auswirkungen des Schalltraumas auf die HA-Mäuse .....	57
5.5	Übertragbarkeit auf den Menschen .....	58
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>68</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Aufbau des Ohres.....	4
Abbildung 2. Querschnitt durch die Cochlea .....	5
Abbildung 3. Querschnitt durch das Corti-Organ.....	6
Abbildung 4. Schema der Hörbahn .....	8
Abbildung 5. Die aufsteigende Hörbahn und eine typische ABR-Wellenform .....	11
Abbildung 6. Aufbau eines high voltage-aktivierten Calciumkanals .....	12
Abbildung 7. Die Veränderung des $Ca_v1.3$ -Kanals durch Manipulation der DCRD-Domäne mit einem Hämagglutinin-Molekül.....	13
Abbildung 8. $Ca^{2+}$ -Ströme in ausgereiften (20 bzw. 19 Tage alten) inneren Haarzellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen .....	14
Abbildung 9. $Ca^{2+}$ -Ströme von inneren Haarzellen bei WT- und HA-Mäusen.....	15
Abbildung 10. Versuchsaufbau während der ABR-Messung .....	21
Abbildung 11. Das Mehrkanal-Oszilloskop während der Messung .....	22
Abbildung 12. Schematische Darstellung der schallisolierten Kammer während des Experiments.....	27
Abbildung 13. Eine ABR-Messung eines Wildtyp-Tieres.....	29
Abbildung 14. Wellenform einer Frequenz-Lautstärke-Kombination einer ABR-Messung .....	30
Abbildung 15. Etablierung des Schalltraumas.....	32
Abbildung 16. Gemittelte ABR-Wellenformen für WT- und HA-Mäuse vor und nach Trauma .....	34
Abbildung 17. Genotyp-spezifische gemittelte ABR-Wellenformen vor und nach Trauma .....	35
Abbildung 18. Mittlere Hörschwellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen am Tag -2 .	36
Abbildung 19. Mittlere Hörschwellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen direkt nach der Vertäubung (Tag 0) .....	37

Abbildung 20. Mittlere Hörschwellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen am Tag 28 nach Vertäubung .....	38
Abbildung 21. Gemittelte Hörschwellen vor und 4 Wochen nach Schalltrauma für Wildtyp- und HA-Mäuse.....	39
Abbildung 22. Temporäre und permanente Hörschwellenerhöhungen durch das Trauma für WT- und HA-Mäuse .....	40
Abbildung 23. Entwicklung der Schalltrauma-induzierten Hörschwellenverschiebungen gegenüber Tag -2 innerhalb von 4 Wochen nach Trauma für WT und HA-Mäuse ...	42
Abbildung 24. Mittlere Amplituden der ABR-Welle I bei 11 kHz und 22 kHz für WT-Mäuse und HA-Mäuse am Tag -2 .....	45
Abbildung 25. Mittlere Amplituden der ABR-Welle I bei 11 kHz und 22 kHz für WT-Mäuse und HA-Mäuse am Tag 28.....	46
Abbildung 26. Mittlere Amplituden der ABR-Welle I bei 11 kHz und 22 kHz für WT-Mäuse und HA-Mäuse vor und 28 Tage nach Schalltrauma.....	47
Abbildung 27. Vergleich der mittleren Amplituden der ABR-Welle I von WT- und HA-Mäusen bei 11 kHz.....	50
Abbildung 28. Vergleich der mittleren Amplituden der ABR-Welle I bei WT- und HA-Mäusen bei 22 kHz.....	51
Abbildung 29. Vergleich der mittleren Audiogramme mit anderen Audiogrammen...	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Anzahl der vertäubten und gemessenen C57BL/6N-Mäuse aus dem Vorexperiment .....	20
Tabelle 2. Dosierung und die Ausgangslösungen der verwendeten Narkose .....	22
Tabelle 3. Dosierung und die Ausgangslösungen des Antidots .....	23
Tabelle 4. Ablauf der ABR-Messungen an verschiedenen Versuchstagen für die Versuchs- und Kontrollgruppe .....	25
Tabelle 5. Ergebnisse des statistischen Tests der frequenzabhängigen Hörschwellen von Wildtyp- und HA-Mäusen am Tag -2 .....	37
Tabelle 6. Statistische Analyse der Amplituden der ABR-Welle I vor und 28 Tage nach Vertäubung für WT- und HA-Mäuse .....	49



## Abkürzungsverzeichnis

Abb: Abbildung

ABR: *eng. auditory brainstem response*

ÄHZ: äußere Haarzellen

BERA: brainstem evoked response audiometry

Ca<sup>2+</sup>: Kalzium-Ion

CaBP: Calcium bindendes Protein

C57BL/6N: *C57 Black6N mouse strain*

Ca<sub>v</sub>1.3DCRD<sup>HA/HA</sup>-Mäuse: Mauslinie

CTM: C-terminale automodulatorische Domäne

dB: Dezibel

DCRD: *Distal C-terminal Regulatory Domain*

EKG: Elektrokardiogramm

et al.: und andere

f-ABR: frequenzspezifische ABR

ID: Identifikationsnummer

IHZ: innere Haarzellen

i.p.: intraperitoneal

K<sup>+</sup>: Kalium-Ion

kHz: Kiloherz

KO: Knockout

LVA-Calciumkanäle: *low voltage*-aktivierte Calciumkanäle

Na<sup>+</sup>: Natrium-Ion

NaCl: Natriumchlorid

n.s.: nicht signifikant

PCRD: *Proximal C-terminal Regulatory Domain*

PTS: dauerhafte Hörschwellenverschiebung (*permanent threshold shift*)

SGN: Spiralganglienneuron

SPL: Schalldruckpegel

s.c.: subkutan

TTS: temporäre Hörschwellenverschiebung (*temporary threshold shift*)

WT-Maus: Wildtyp-Maus

WT-Gruppe: Vertäubungsgruppe der Wildtyp-Mäuse

ZNS: zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

Der versteckte Hörverlust bezeichnet die Tatsache, dass ein akustisches Trauma, das eine temporäre (TTS), aber keine permanente Schwellenverschiebung (PTS) erzeugt, das Gehör dennoch irreversibel schädigen kann. Das Trauma zerstört einen Teil der Synapsen der inneren Haarzellen (IHZ), wodurch ein Teil jener Hörnervenfasern nicht mehr funktional ist, die für die Hörschwelle nicht relevant sind. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen eines Schalltraumas (Breitbandrauschen 8 - 16 kHz mit 100 dB SPL für 2 h) auf Wildtyp-Mäuse (C57BL/6N) und  $Ca_v1.3DCRD^{HA/HA}$ -Mäuse (Knock-In-Mäuse mit einer Modifizierung des  $Ca_v1.3-Ca^{2+}$ -Kanals auf C57Bl6/N-Hintergrund), kurz HA-Maus, untersucht. Der Maximalstrom an  $Ca^{2+}$ -Ionen, der durch  $Ca_v1.3-Ca^{2+}$ -Kanäle in die IHZ der HA-Mäuse fließt, ist um 30 % erhöht (Scharinger et al., 2015). Daraus resultierte die Hypothese, dass aufgrund von Calcium-Toxizität die HA-Mäuse empfindlicher auf das Schalltrauma reagieren. Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob HA-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen aufgrund der  $Ca_v1.3$ -Kanal-Manipulation vor der Vertäubung veränderte Hörschwellen haben und ob sie nach der Vertäubung veränderte TTS, PTS oder Summenaktivität der Hörnervenfasern zeigen. Zunächst wurden die Methode der Hörmessungen und die Vertäubungsmethode an 4 WT-Tieren im Labor etabliert. Das Hörvermögen der Mäuse wurde durch die Messung akustisch evozierter Potentiale (ABR-Messungen) vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trauma bestimmt. Vor dem Trauma zeigten WT- und HA-Mäuse im Alter von 12 Wochen keine relevant unterschiedlichen Klick- oder frequenzspezifischen Hörschwellen. Ein Trauma von 100 dB SPL, 8 – 16 kHz für 2 h erzeugte eine frequenzabhängige TTS bei WT- und bei HA-Tieren v.a. im Hochtonbereich, wobei die akute Schwellenerhöhung bei HA-Tieren größer als bei WT-Tieren war. Die Regeneration der Hörschwellen verlief bei HA-Tieren jedoch etwas besser als bei WT-Tieren. Vier Wochen nach dem Trauma zeigten WT-Mäuse eine PTS bei 22, 32 und 45 kHz. Im Gegensatz dazu trat eine PTS der HA-Mäuse nur bei 32 kHz und 45 kHz auf und fiel geringer aus. Die Amplitude der ABR-Welle I nahm bei 22 kHz bei den WT-Tieren am Tag 28 gegenüber Tag - 2 signifikant ab, ein Zeichen für den versteckten Hörverlust bzw. die cochleäre Synaptopathie. Die Reduktion der Welle I-Amplitude war bei den HA-Tieren deutlich geringer.

Die Hypothese, dass die HA-Tiere aufgrund des höheren  $Ca^{2+}$ -Einstroms in die IHZ langfristig einen stärkeren Traumaschaden erleiden, muss daher verworfen werden. Im Gegenteil, die HA-Tiere wurden durch das Trauma in Bezug auf PTS und ABR-Amplitudenreduktion weniger beeinträchtigt. Vermutlich war die zusätzliche  $Ca^{2+}$ -Belastung der IHZ von HA-Tieren nach

dem 100 dB SPL-Trauma noch in einem moderaten Rahmen, in dem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskaden zu effizienteren Reparaturprozessen als in WT-Tieren führten.

## Summary

An acoustic trauma, which causes a temporary (TTS) but not a permanent threshold shift (PTS) can nevertheless irreversibly impact hearing, which is called hidden hearing loss. The trauma destroys part of the synapses of inner hair cells (IHC), which leads to functional loss of part of auditory nerve fibers that are not relevant for the hearing threshold. This thesis evaluates the consequences of a noise trauma (white noise 8 -16 kHz at 100 dB SPL for 2 h) on wildtype mice (C57BL/6N) and on  $\text{Ca}_v1.3\text{DCRD}^{\text{HA/HA}}$  mice (knock-in mice with a modified  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channel on C57BL/6N background), in short HA mouse.

In HA mice, the maximum current of  $\text{Ca}^{2+}$  ions flowing through  $\text{Ca}_v1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels into IHCs is increased by 30 % (Scharinger et al., 2015). Therefore, we hypothesized that due to  $\text{Ca}^{2+}$  excitotoxicity HA mice would respond more vulnerable to a noise trauma.

The aims of this thesis were to find out whether HA mice due to manipulation of the  $\text{Ca}_v1.3$  channel had altered hearing thresholds before trauma and if they showed different TTS, PTS or summed activity of auditory nerve fibers after trauma compared with wildtype (WT) mice.

First, the methods of hearing measurements and noise trauma application had to be established in the laboratory using 4 WT mice. Hearing performance was assessed by measuring acoustically evoked potentials (ABR measurements) before and at various time points after trauma. Before trauma, WT and HA mice aged 12 weeks did not show any relevant differences in hearing thresholds determined by click- and frequency-ABR. A trauma of 100 dB SPL, 8 – 16 kHz for 2 h elicited a frequency-dependent TTS in both WT and HA-mice mostly in the high frequency region, with the acute TTS of HA mice being larger than in WT mice. Regeneration of hearing thresholds however was slightly better in HA compared with WT mice. Four weeks after the trauma, WT mice showed a PTS at 22, 32 and 45 kHz. In contrast, the PTS of HA mice appeared only at 32 and 45 kHz and moreover was smaller. The amplitude of ABR wave I at 22 kHz was significantly reduced in WT mice on day 28 compared with day -2 indicating hidden hearing loss. In HA mice, the reduction of the amplitude of wave I was less pronounced.

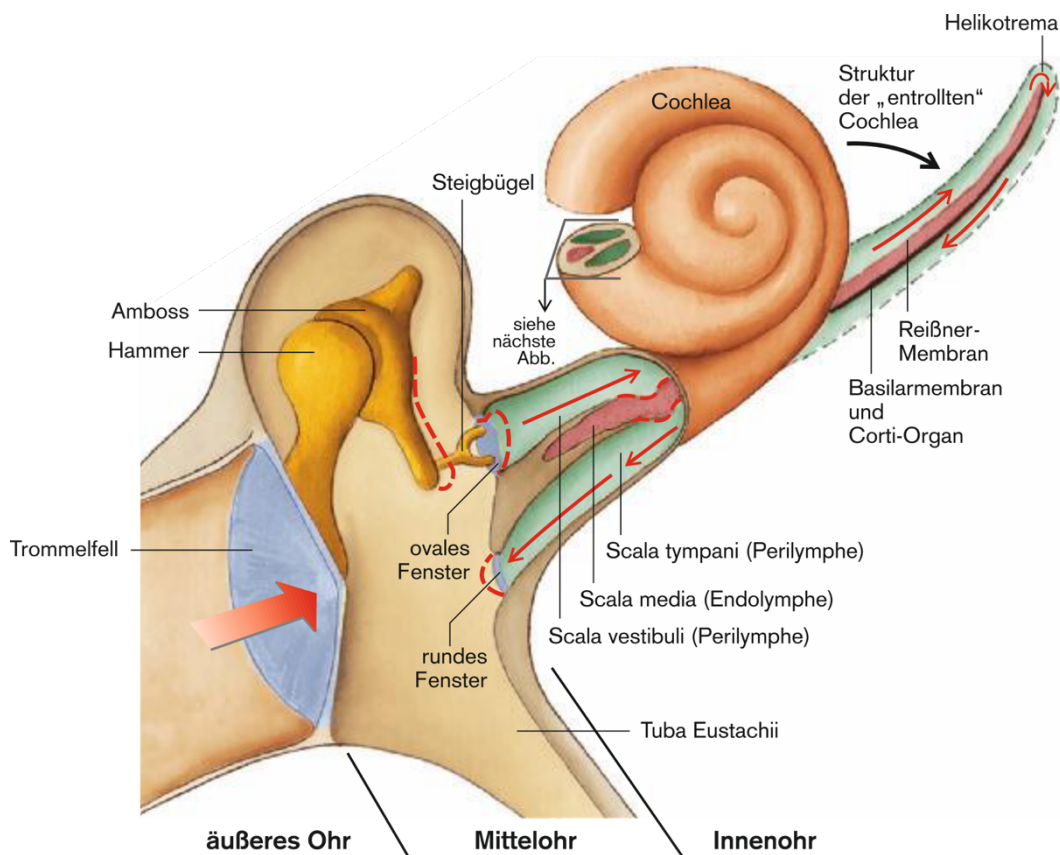
In conclusion, HA animals did not suffer from a more pronounced damage after trauma despite their increased  $\text{Ca}^{2+}$  current into IHCs. On the contrary, HA mice showed milder consequences of the noise trauma with respect to both PTS and reduction of ABR amplitudes. We suggest that the additional  $\text{Ca}^{2+}$  load of IHCs in HA mice caused by the 100 dB SPL trauma was in a moderate range that triggered  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling cascades and more efficient repair processes than in WT animals.

## 2 Einleitung

Der Gehörsinn ist einer der wichtigsten Sinne eines Säugetiers und das Hörorgan ist ein sehr empfindliches und komplexes Organ. Das Hörorgan hat sowohl für den Menschen als auch für das Tier mehrere Aufgaben, wie zum Beispiel das Erkennen und Lokalisieren von Gefahren oder das Erlernen von Sprache, um untereinander kommunizieren zu können. Der Verlust dieses Organs bzw. dessen Funktionen durch eine Schädigung führt u.a. zu einem Verlust von Lebensqualität. Die Aufnahme- und Verarbeitungsprozesse der Schallsignale haben einen sehr schnellen und optimierten Ablauf, wodurch das Orientierungs- und Warnsystem als eine Einheit funktionieren (Behrends et al., 2017).

### 2.1 Aufbau und Funktion des Ohres

Das auditorische System wird in einen peripheren und einen zentralen Anteil unterteilt. Das periphere Hörorgan wird in äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr aufgeteilt. Zum äußeren Ohr gehören Ohrmuschel und der äußere Gehörgang (vgl. Abb. 1). Hier wird das ankommende Schallsignal über die Ohrmuschel empfangen und an das Trommelfell weitergeleitet. Das Mittelohr besteht aus Trommelfell, Ohrtrompete, Paukenhöhle und pneumatischen Räumen. In diesem Teil befindet sich die nach dem Trommelfell angrenzende Gehörknöchelchen-Kette, die aus Hammer, Amboss und Steigbügel besteht. Die drei Strukturen sind über Gelenke verbunden. Der Steigbügel hat eine Fußplatte, durch die eine Verbindung mit dem ovalen Fenster des angrenzenden Innenohres besteht. Die Gehörknöchelchen-Kette dient als Verbindungsstück zwischen dem Luftmedium (Außen- und Mittelohr) und dem Flüssigkeitsmedium (Innenohr). Nachdem das Schallsignal das Trommelfell erreicht, fängt die Gehörknöchelchen-Kette an zu schwingen. (Huppelsberg & Walter, 2009). Dadurch findet eine Impedanzanpassung zwischen dem Luftmedium, welches das Mittelohr ausfüllt, und dem Flüssigkeitsmedium, welches das Innenohr füllt. Die wichtige Rolle der Impedanzanpassung ist, dass die Schallsignale beim Übergang von der Luft auf das flüssige Medium nicht reflektiert werden, sondern der Schall transduziert und schließlich wahrgenommen wird (Zenner, 2010).

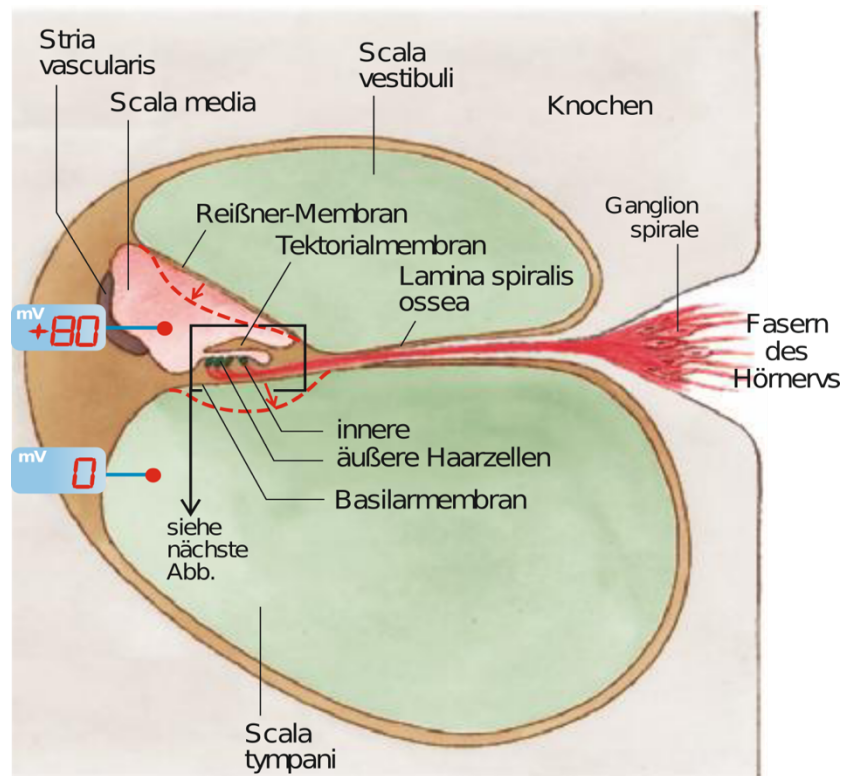


**Abbildung 1. Aufbau des Ohres**

Die schematische Abbildung zeigt das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Die entrollte Cochlea zeigt die drei Scalae, durch die die Schallenergie übertragen wird. Über das Trommelfell (äußeres Ohr) wird der Schall weiter an die Gehörknöchelchen-Kette (Mittelohr) übertragen. Die Fußplatte des Steigbügels leitet die Schallschwingungen über das ovale Fenster an die Scala vestibuli weiter „Perilymphe“. Dadurch findet die Impedanzanpassung statt. Die mechanische Schallenergie wird im Corti-Organ in elektrische Erregung der Haarzellen umgewandelt. Abb. aus (Pape et al., 2014).

Das Innenohr enthält zwei wichtige Organe, das Gleichgewichtsorgan oder vestibuläre Labyrinth und die drei membranösen übereinanderliegenden Scalae, die sich zur Hörschnecke oder „Cochlea“ winden. Die menschliche Cochlea hat im Vergleich zu der Cochlea einer Maus, die zweieinviertel Windungen besitzt, zweieinhalb Windungen. Die drei Gänge bzw. die Scalae der Cochlea sind mit Flüssigkeit gefüllt. Der mittlere Gang, die Scala media (Ductus cochlearis), ist mit Endolymphe gefüllt. Darüber befindet sich die mit Perilymphe gefüllte Scala vestibuli, die sich durch die Reissner-Membran von der Scala media abgrenzt. Durch die Basilar-Membran liegt die Scala tympani unter der Scala media und ist ebenfalls mit Perilymphe gefüllt (Huppelsberg & Walter, 2009). In der Scala media befinden sich die Zellen der Stria vascularis, die für die Produktion der Endolymphe verantwortlich sind. Die Endolymphe, die in ihrer Zusammensetzung der intrazellulären Flüssigkeit ähnelt, ist sehr reich an Kaliumionen, etwa 145 mmol/l  $K^+$  und weniger  $Na^+$  (ca. 1,5

mmol/l). Die anderen beiden Scalae, die an der Schneckenspitze „Helicotrema“ zusammentreffen, enthalten Perilymphe, die ein Ultrafiltrat des Blutplasmas ist und in ihrem Gehalt eher der extrazellulären Flüssigkeit ähnelt, weshalb sie im Gegensatz zu der Endolymphe mehr  $\text{Na}^+$  (ca. 140 mmol/l) und nur wenig  $\text{K}^+$ -Ionen enthält (Pape et al., 2014).

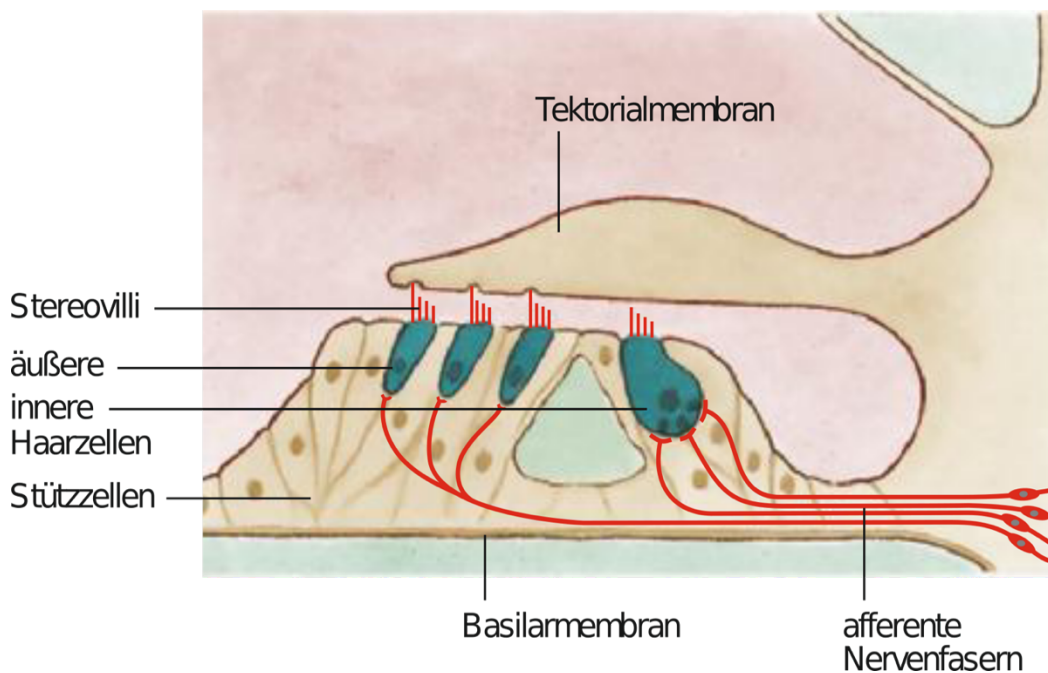


**Abbildung 2. Querschnitt durch die Cochlea**

Durch ein ankommendes akustisches Signal werden die Reissnermembran und die Basilarmembran ausgelenkt, wie in der schematischen Darstellung mit rot gestrichter Linie dargestellt ist. Der grüne Bereich zeigt die Perilymphe der Scala vestibuli und der Scala tympani. Der rote Bereich stellt die Endolymphe der Scala media dar. Durch die Tätigkeit der Stria vascularis entsteht in der Endolymphe eine hohe  $\text{K}^+$ -Konzentration und elektrisches Potenzial von etwa +80 mV gegenüber der Perilymphe (hohe  $\text{Na}^+$ -, niedrige  $\text{K}^+$ -Konzentration). Abbildung nach (Pape et al., 2014).

Der in die Cochlea übertragene Schall tritt über das ovale Fenster ein und erzeugt in der Scala media eine Wanderwelle, eine nichtlineare Auslenkung der Basilarmembran. Bei diesem Vorgang wird der Schalldruck vom mit Flüssigkeit gefüllten Innenohr wieder an das Mittelohr abgegeben, indem er von der Scala vestibuli über das Helicotrema und dann auf die Scala tympani durch Auswölbung der Membran am runden Fenster wandert (vgl. Abb. 2). Durch den oben beschriebenen Prozess kommen die zwischen der Scala vestibuli und Scala tympani liegenden Strukturen in Schwingung. Durch die Ausbreitung der Schwingung auf der Basilarmembran entsteht eine Wanderwelle. Hierbei findet eine Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit und Wellenlänge statt und die Amplitude wird größer. An einem bestimmten Ort der

Basilarmembran kommt es zur maximalen Auslenkung der Amplitude, wodurch das Sinnesepithel, das Corti-Organ, maximal gereizt wird. Der Ort des Druckübergangs ist von den lokalen physikalischen Eigenschaften der Basilarmembran abhängig. Daher führt jede Tonfrequenz zur maximalen Erregung von Haarsinneszellen an einem bestimmten Ort (Tonotopie). Das bedeutet, dass hochfrequente Töne im basalen Teil nahe des ovalen Fenster repräsentiert werden und dass niederfrequente Töne im apikalen Teil der Cochlea repräsentiert werden (Behrends et al., 2017). Der Schallreiz führt zu Scherbewegungen der Tektorialmembran, wodurch die Stereozilien abgeschert werden. Dadurch ziehen Tip-links, Verbindungen zwischen Stereozilien, Transduktionskanäle auf, wodurch der Einstrom von  $K^+$ -Ionen die Haarzellen depolarisiert (J. Zheng et al., 2000). In der nächsten Halbwelle des Schallreizes strömen  $K^+$ -Ionen aus den Haarzellen in die Perilymphumgebung und die Haarzellen repolarisieren wieder. Das Rezeptorpotential führt in inneren Haarzellen zur Öffnung von spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanälen an den Präsynapsen, den synaptischen Ribbons und zur Freisetzung von Glutamat (Fettiplace, 2017; Meyer & Moser, 2010).



**Abbildung 3. Querschnitt durch das Corti-Organ**

Das Corti-Organ, das Sinnesepithel mit zwei Sorten von Rezeptorzellen und mehreren Sorten Stützzellen, liegt auf der Basilarmembran. Die Rezeptorzellen bilden insgesamt vier Reihen, wobei es drei Reihen äußere Haarzellen eine Reihe innere Haarzellen gibt. Die Stereovilli, auch ‚Stereozilien‘, der Haarzellen ragen in die Endolymphe hinein. Die längsten Stereozilien der äußeren Haarzellen sind mit der Tektorialmembran verbunden. Die Stereozilien sind durch Proteinfäden, sogenannte ‚Tip-Links‘, miteinander verbunden. Abb. aus (Pape et al., 2014).

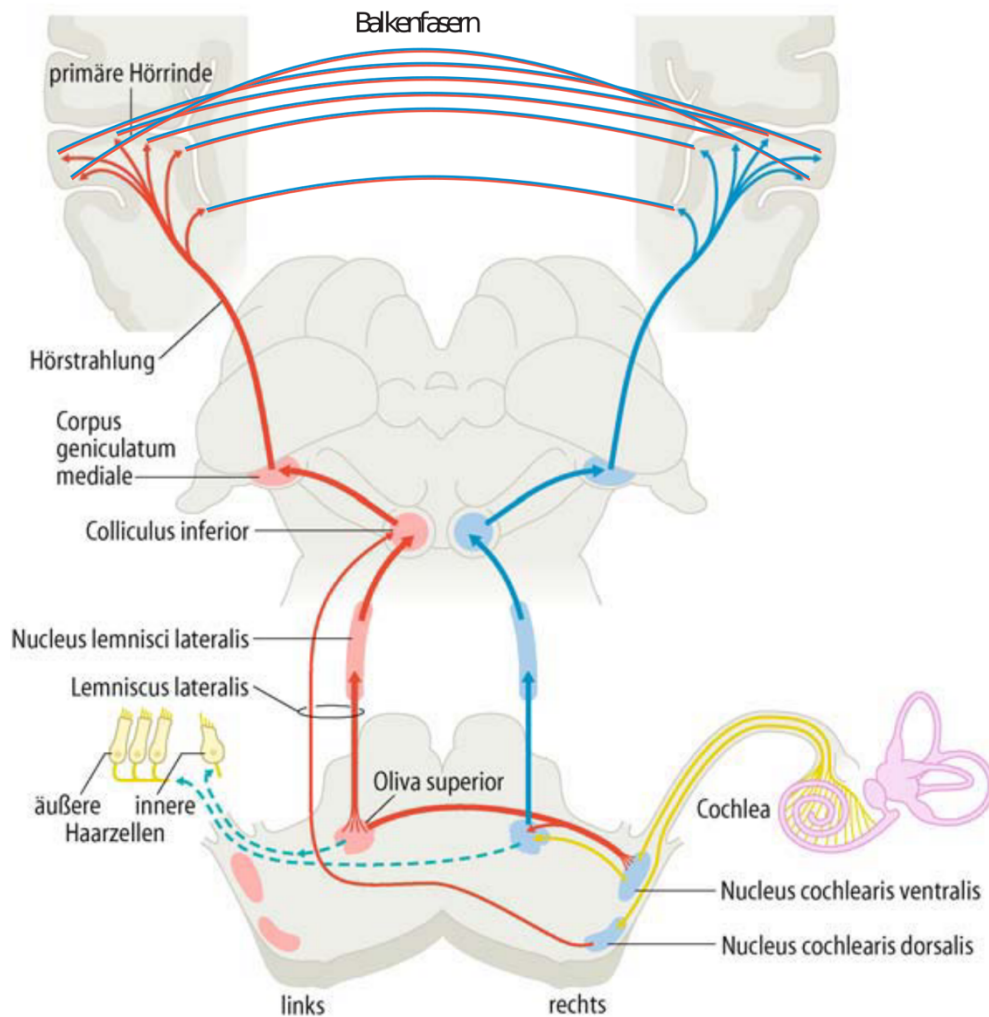


Die Haarzellen bilden Synapsen mit Neuronen, den Spiralganglienneuronen (SGN), deren Nervenfasern im VIII. Hirnnerv weiterverlaufen (Abb. 3). Innere Haarzellen sind die eigentlichen Sinneszellen. Sie besitzen 10 – 30 Ribbonsynapsen, wobei jede Synapse ein Spiralganglienneuron treibt. Innere Haarzellen werden durch 90 % der afferenten, myelinisierten und unverzweigten Typ I-Nervenfasern innerviert (Meyer & Moser, 2010; Mianné et al., 2016; Pape et al., 2014; Perkins & Morest, 1975).

Äußere Haarzellen werden von 10 % der afferenten Nervenfasern, den „Typ II-Fasern“, innerviert, die verzweigt und unmyelinisiert sind. Die Funktion dieser afferenten Fasern ist bisher nicht gut verstanden. Äußere Haarzellen bilden durch ihre Elektromotilität den cochleären Verstärker, das heißt, sie verstärken die Wanderwelle bei niedrigen Schalldruckpegeln. Sie werden von der medialen Olive aus dem Hirnstamm efferent innerviert (Behrends et al., 2017; Fettiplace, 2017).

## **2.2 Stationen der Hörbahn**

Das ankommende Schallsignal wird in verschiedenen Stationen im Zentralnervensystem verarbeitet (Abb. 4), bis in der Hörrinde eine Sinneswahrnehmung bewusst wahrgenommen wird. Die Nervenfasern des Innenohres führen zur Vermittlung der Information von Frequenz, Richtung und Schallintensität. Diese drei Komponenten führen zur Wahrnehmung des Schallereignisses (Behrends et al., 2017).



**Abbildung 4. Schema der Hörbahn**

Die Abbildung stellt den anatomischen Aufbau der Hörbahn und ihren Verlauf von den inneren Haarzellen bis zur der primären Hörrinde dar. Abb. aus (Boeninghaus & Lenarz, 2007).

Nach Reizung der inneren Haarzellen und Ausschüttung des Transmitters Glutamat werden auf den afferenten Fasern elektrische Signale erzeugt und über den Hörnerv (N. cochlearis) geleitet. Danach findet der Eintritt des N. cochlearis im Kleinhirnbrückenwinkel in den Hirnstamm statt, wo der Hörnerv an der ersten Stelle der Hörbahn in verschiedenen Teilen der Nuclei cochleares (Ncll. cochleares ventralis und dorsal) endet (Schmidt, 2013). An dieser Stelle wird das Signal aus dem Ganglion spirale der ipsilateralen Cochlea aufgenommen und analysiert (Behrends et al., 2017).

An der zweiten Station ziehen die vom dorsalen Cochleariskern gekreuzten Fasern zu dem kontralateralen Cochleariskern inferior. Die vom ventralen Cochleariskern gekreuzten Fasern verlaufen zu den oberen Oliven. Zum größten Teil verlaufen diese Fasern contralateral, jedoch gibt es auch einen kleinen Teil von ihnen, der sich ipsilateral zum Ncll. olivares superiores zieht.

Hierbei werden die Signale der beiden Ohren zusammengefasst und es werden der Laufzeitunterschied und die Richtungsquelle analysiert. Die nächste Umschaltstelle liegt in den Ncll. lemniscus lateralis. Dort werden die von der oberen Olive verlaufenden Fasern und die vom ipsilateralen ventralen Cochleariskern kommenden Fasern mit den vom kontralateralen Cochleariskern gekreuzten Fasern im Ncll. Lemniscus lateralis vereint. An dieser Stelle ziehen Fasern zu den Colliculi inferiores weiter (Boenninghaus & Lenarz, 2007).

Die Colliculi inferiores liegen im Mittelhirn und extrahieren zeitliche Aspekte der auditorischen Signale. Da die beiden Colliculi inferiores eine Verbindung haben, werden die Schallinformationen beider Ohren in jeder Hirnhälfte verarbeitet.

Als nächster Schritt wird die Schallinformation über das corpus geniculatum mediale an die primäre Hörrinde und am Ende zu der sekundären Hörrinde geleitet (Behrends et al., 2017;; Boenninghaus & Lenarz, 2007).

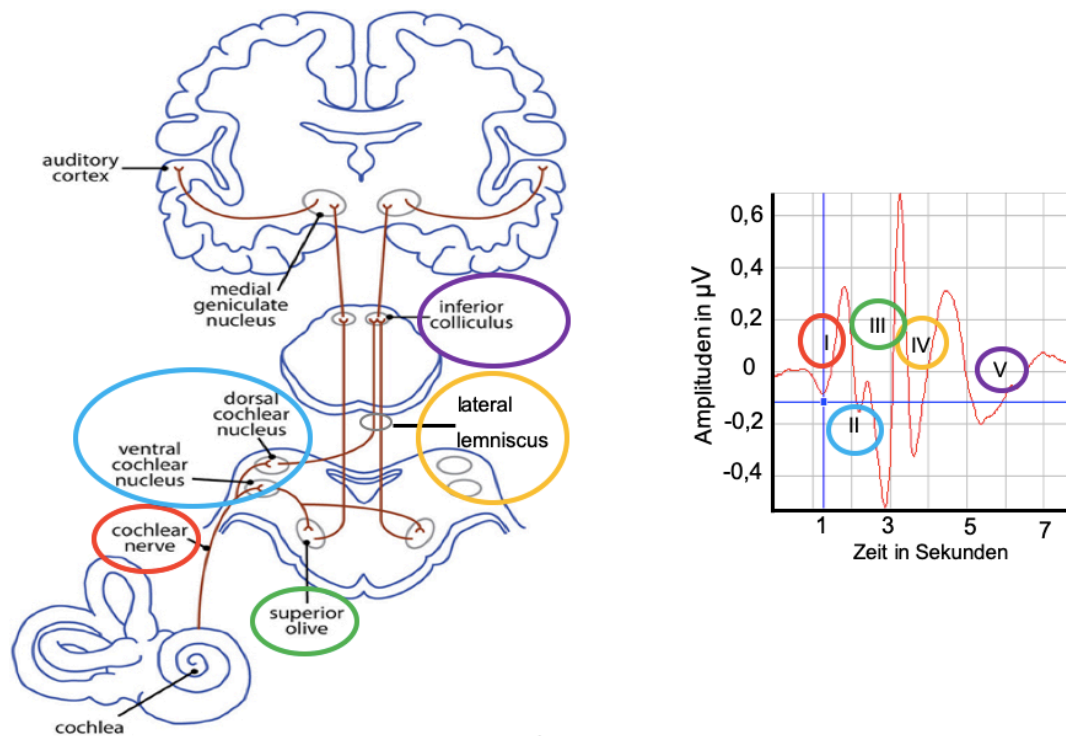
### **2.3 Frühe akustisch evozierte Hirnstammpotentiale**

Das Hörvermögen kann durch mehrere Methoden untersucht werden. Eine dieser Methoden wird als AEHP (akustisch evozierte Hirnstammpotentiale), FAEP (frühe akustisch evozierte Potentiale), AEP (akustisch evozierte Potentiale), BERA (*Brainstem evoked response audiometry*) oder auch als ABR (*auditory brainstem response*) bezeichnet. Für Messungen am Menschen ist der Begriff BERA sehr gebräuchlich, für Messungen an Versuchstieren der Begriff ABR (Maurer et al., 2005).

Seit Ende der 70er Jahre wurde die ABR-Messung als bedeutende Untersuchungsmethode im Bereich der Neurologie, der Psychophysiologie und in der Hörforschung verwendet. Der hohe Wert dieser Untersuchung liegt darin, dass man sie in verschiedenen Bereichen nutzen kann, wie auf Intensivstationen oder in neurologischen und neurochirurgischen Abteilungen (Buettner, 2005). Die BERA ist für jedes Lebensalter geeignet. Ein fundamentaler Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Messung und ihre resultierenden Ergebnisse ohne Patientenanfragen gemacht werden können, weshalb man sie bei vielen Störungen, wie zum Beispiel bei Hörstörungen von Neugeborenen oder Kleinkindern, einsetzen kann (Wolff et al., 2010). Ebenso ist diese Messung für narkotisierte Versuchstiere geeignet (Maurer et al., 2005).

Sobald ein akustischer Reiz durch ein gesundes Ohr empfangen wird, durchläuft das schallinduzierte neuronale Signal mehrere Stationen in der Hörbahn, wodurch man nach Mittelung in den ersten 10 ms extrakranielle Spannungssignale – typischerweise als Wellen von I bis V – messen kann, die die frühen akustisch evozierten Potentiale repräsentieren (Butler & Lomber, 2013).

Hier wird über die Hörbahn der Säugetiere gesprochen, wobei kein wesentlicher Unterschied zu der Hörbahn des Menschen besteht. Jede Welle in der Ableitung spiegelt eine Region in der Hörbahn wider, wodurch jede Welle eine eigene Bedeutung hat. Die erste Welle (I) spiegelt die Aktivität des Hörnervs wider. Sie taucht ca. 1 - 2 ms nach Beginn des akustischen Klick-Reizes auf und hängt von der Reizintensität ab (Møller et al., 1995). Die zweite Welle (II) leitet den Nucleus cochlearis ab, in dem die erste Verschaltung von einem Neuron auf ein anderes stattfindet. Das Maximum der II. Welle ist im Vergleich zu den anderen am geringsten und ihre Erscheinung tritt nach 2 - 3 ms ein (Maurer et al., 2005; Starr & Achor, 1975). Der Nucleus olivaris superior erzeugt die dritte Welle (III), welche die drei höchsten Maxima neben Welle I und V repräsentiert und zwischen 3 - 4 ms eintritt. Die Aktivität des Lemniscus lateralis wird der vierten Welle (IV) zugeordnet, bei der eine Komplexbildung mit dem fünften Gipfel besteht und die zwischen 4 - 5 ms auftaucht. Als letztes lässt sich der Colliculus inferior von der fünften Welle (V) ableiten. Das Maximum der V. Welle ist beim Menschen am größten und erscheint bei etwa 6 ms nach Schallreiz (Buettner, 2005). Im Vergleich zu der ersten Welle (I) ist die fünfte Welle (V) unabhängig von der Reizintensität, daher wird sie zu der Bestimmung der Hörschwelle bei schwächeren Reizen verwendet. Es gibt noch die Wellen VI und VII, aber dafür befindet sich keine eindeutige anatomische Struktur in der Hörbahn, die sie repräsentiert (Maurer et al., 2005).



**Abbildung 5. Die aufsteigende Hörbahn und eine typische ABR-Wellenform**

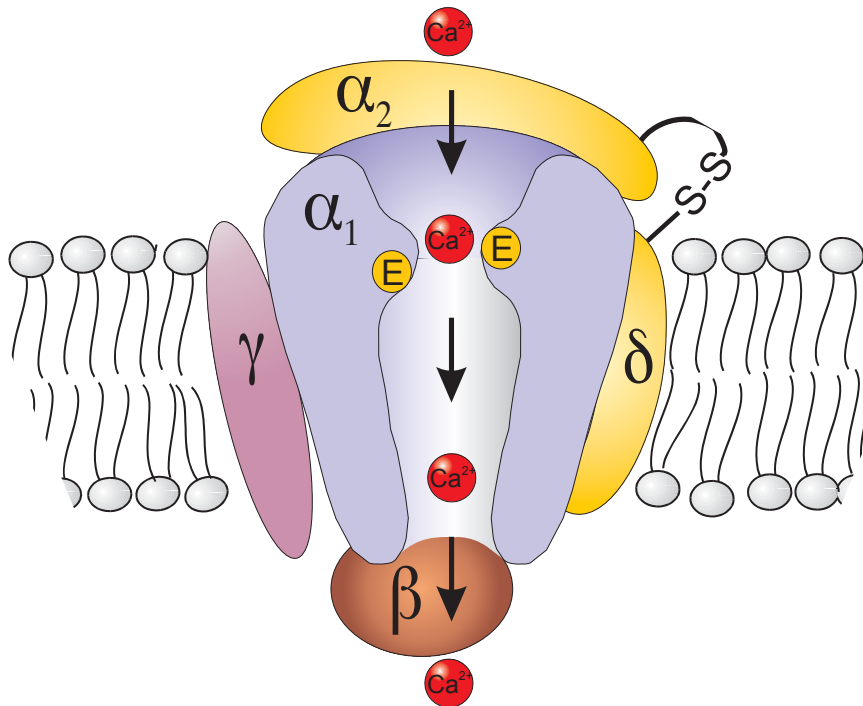
Die anatomischen Stationen jeder Welle einer ABR-Messung (links). Abb. modifiziert nach (B. Butler & Lomber, 2013). Typische Wellenform der gemittelten Spannungssignale in der Hirnstammaudiometrie an der Maus (rechts) durch das Programm Audiology Lab bei meiner Messung.

Das Prinzip des methodischen Vorgehens erfordert bestimmte Bedingungen und technische Ausstattung, die genauer im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben werden.

## 2.4 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

In fast allen elektrisch erregbaren Zellen von Säugetieren befinden sich spannungsgesteuerte Calciumkanäle ( $Ca_v$ -Kanäle), die für die Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration eine fundamentale Rolle spielen und somit zur Signalverarbeitung in den Zellen beitragen (Catterall et al., 2000). Die  $Ca_v$ -Calciumkanäle haben einen komplexen Aufbau aus einer porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und  $\beta$ -,  $\alpha_2\delta$ - und  $\gamma$ -Hilfsuntereinheiten (siehe Abb. 6). Es gibt drei verschiedene Gruppen, die in  $Ca_v1$  bis  $Ca_v3$  eingeteilt sind.  $Ca_v1$  und  $Ca_v2$  gehören zu der Familie der high voltage-aktivierten (HVA) Calciumkanäle (Catterall et al., 2000; Klugbauer et al., 2002). Die dritte Familie der  $Ca_v3$ -Kanäle sind die low voltage-aktivierten (LVA) Calciumkanäle. Jede Gruppe besteht aus mehreren Kanaltypen, die z.T. gewebsspezifisch sind. In dieser Arbeit handelt es sich um die  $Ca_v1.3$ -Kanäle, die bei Mäusen vor allem in ZNS-, Cochlea-,

Herz-, Drüsen- und glatten Muskelzellen exprimiert sind (Platzer et al., 2000; Scharinger et al., 2015; Striessnig et al., 2014).



**Abbildung 6. Aufbau eines high voltage-aktivierten Calciumkanals**

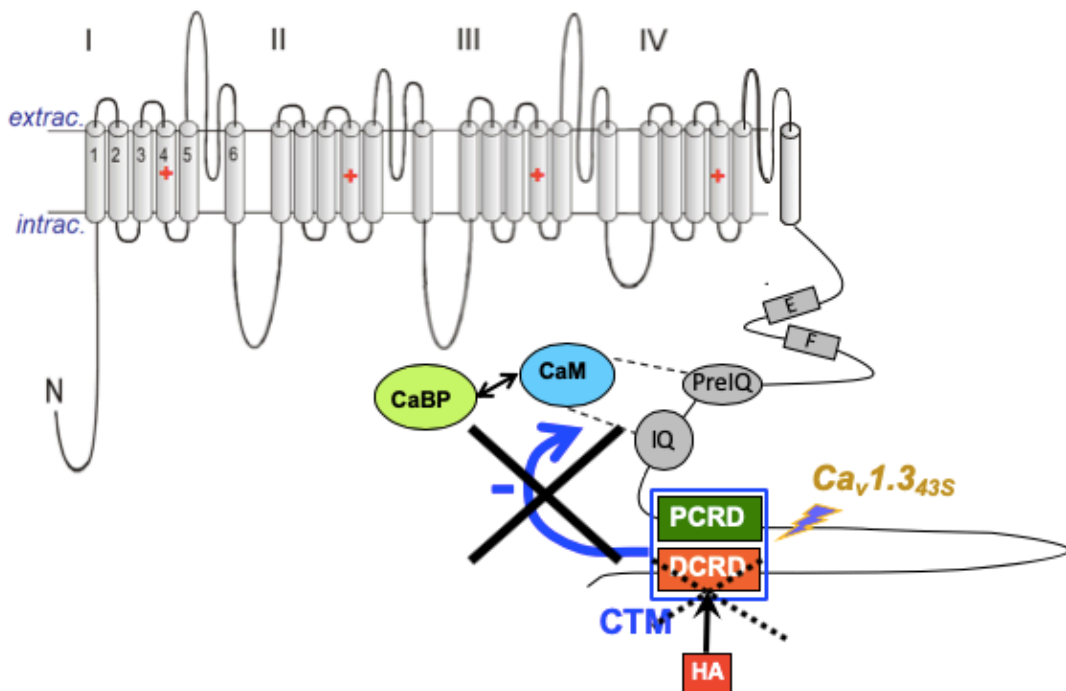
Die Calcium-Ionen strömen über die porenbildende  $\alpha_1$ -Untereinheit von außen nach innen. Nach (Hofmann et al., 1999).

Wegen der Vielfalt der  $\alpha_1$ -Untereinheiten ergeben sich mehrere  $Ca_v1$ -Kanäle ( $Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$ ),  $Ca_v2$ -Kanäle ( $Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$ ) und  $Ca_v3$ -Kanäle ( $Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$ ). Durch elektrophysiologische Messungen unterscheidet man L-, N-, P/Q-, R- und T-Typ-Ströme (und Kanäle) voneinander. Diese Vielfalt bezieht sich auf die große Zahl der Calciumkanal-Gene in Wirbeltieren. Dabei hat jeder Kanaltyp seine eigene physiologische Funktion, die durch verschiedene natürliche Mausmutanten und genetisch veränderte Mausmodelle aufgeklärt wurden. Der  $Ca_v1.3$ -Kanal leitet einen L-Typ-Strom; die Abkürzung „L-Typ“ bezieht sich auf „*long-lasting*“, das heißt der Kanal inaktiviert nicht sofort, sondern bleibt bei Depolarisation länger geöffnet, was zu größeren Calcium-Strömen in die Zelle führt (Catterall, 2000).

In inneren Haarzellen fließen über 90 % des gesamten  $Ca^{2+}$ -Stroms durch  $Ca_v1.3$ -Kanäle und sind essentiell für die Exozytose (Brandt et al., 2003). Deletion von  $Ca_v1.3$  in  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen oder durch Spontanmutationen beim Menschen führen zu Taubheit und Bradyarrhythmie (Baig et al., 2011; Platzer et al., 2000).

## Inaktivierung von spannungsgesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Da durch spannungsgesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle einströmendes Ca<sup>2+</sup> aufgrund seiner Signalfunktion in Zellen potentiell toxisch sein kann, zeigen diese Kanäle zwei Arten von Inaktivierung, wobei der Kanal trotz anhaltender Depolarisation der Zelle schließt: die spannungsabhängige Inaktivierung (VDI) und die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Inaktivierung (CDI). Die VDI ist unabhängig vom Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und führt aufgrund von Konformationsänderungen zum Schließen des Kanals. Bei der CDI entsteht durch Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin an eine C-terminale automodulatorische Domäne (CTM) eine Konformationsänderung im Kanal, die den Kanal schließt (Ben-Johny et al., 2014; Singh et al., 2008).

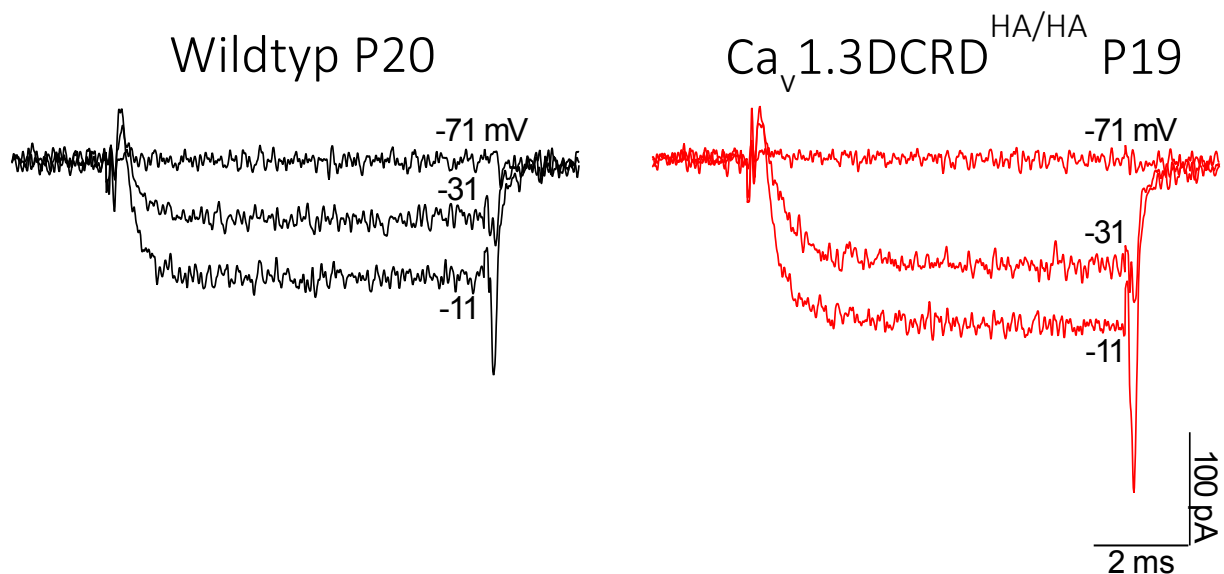


**Abbildung 7. Die Veränderung des Ca<sub>v</sub>1.3-Kanals durch Manipulation der DCRD-Domäne mit einem Hämaggglutinin-Molekül**

In inneren Haarzellen konkurrieren Calcium-bindende Proteine (CaBP) mit Calmodulin um die gleiche Bindungsstelle am C-Terminus des Ca<sub>v</sub>1.3-Kanals. Die Zerstörung der DCRD-Domäne führt zu einem geänderten Öffnungsverhalten des Ca<sub>v</sub>1.3-Kanals. Abbildung aus Scharinger et al., 2013.

Die CTM hat einen proximalen und distalen Teil, Proximal C-terminal Regulatory Domain (PCRD) und Distal C-terminal Regulatory Domain (DCRD) (siehe Abb. 7). Die C-terminale automodulatorische Domäne (CTM) reduziert die Bindungsstärke von Calmodulin an den C-Terminus und bestimmt dadurch die Leitfähigkeit des Kanals in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und spannungsabhängigem Gating. Alternatives Spleißen erzeugt kurze C-terminale Kanalvarianten ohne CTM, was zu einer verstärkten Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Inaktivierung und einer stärkeren Spannungsempfindlichkeit bei heterologer Expression führt (Singh et al., 2008).

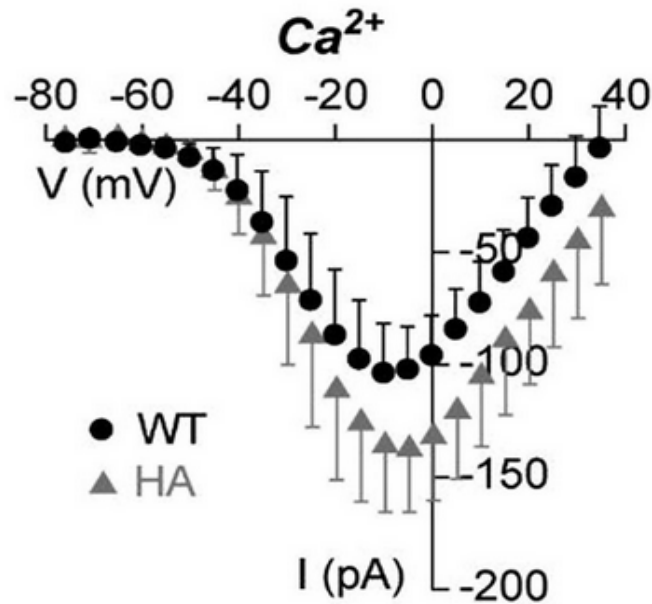
Die Rolle der Modulationsdomäne für die Funktion der langen Kanalvariante in ihrer nativen Umgebung war lange Zeit unbekannt. Um die funktionelle Bedeutung *in vivo* zu bestimmen, wurden genetisch veränderte Mäuse erzeugt, in denen die CTM mit einem Hämagglutinin-(HA-)Tag unterbrochen wurde. Diese Mäuse werden als  $\text{Ca}_v1.3\text{DCRD}^{\text{HA/HA}}$ -Mäuse oder kurz HA-Mäuse bezeichnet (Scharinger et al., 2015). Die Hypothese war, dass durch die Zerstörung der CTM die Wirkung von Calmodulin (Induktion von CDI) erhöht und die CDI der  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle verstärkt wird. Das war bei Chromaffinzellen auch der Fall, was zu hyperpolarisierten Ruhepotentialen und einer verringerten Schrittmacher-Aktivität führte (Scharinger et al., 2015). In den inneren Haarzellen (IHZ) der Cochlea war die lange (HA-markierte)  $\text{Ca}_v1.3$ -Isoform an allen Ribbon-Synapsen vorhanden. Die CTM-Elimination führte hier unerwarteterweise zu einer weiteren Reduktion der CDI von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen in Haarzellen. Vermutlich kam es zur Kompetition von Calmodulin mit CaBPs (Calcium-bindenden Proteinen), die in hoher Konzentration in IHZ vorliegen, und damit zur weiteren Reduktion der CDI (Picher et al., 2017; Scharinger et al., 2015). Außerdem waren die Calcium-Ströme in den IHZ verändert (Abb. 8). Die maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme waren in der HA-Mutante ca. 33 % größer als im Wildtyp (Abb. 8, 9). Die Modifikation der CTM stabilisierte offenbar die Öffnungseigenschaften der  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle, die für eine normale elektrische Erregbarkeit erforderlich sind (Moser & Starr, 2016; Ohn et al., 2016; Scharinger et al., 2015).



**Abbildung 8.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in ausgereiften (20 bzw. 19 Tage alten) inneren Haarzellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen**

Ausgewählte  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom-Spuren (10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) einer inneren Haarzelle einer WT-Maus (schwarz) und einer HA-Maus (rot) nach Depolarisation von einem Haltepotential von  $-86$  mV für 8 ms zu den angegebenen Spannungen. Aus (Scharinger et al., 2015).





**Abbildung 9.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme von inneren Haarzellen bei WT- und HA-Mäusen**

Gemittelte Strom-Spannungskurven von inneren Haarzellen von WT-Mäusen (schwarz, Mittelwert +SD,  $n=10$ ) und von HA-Mäusen (grau, Mittelwert – SD,  $n=10$ ), aufgenommen zwischen 7 und 8 ms nach Beginn des Depolarisationspulses, vgl. Abb. 8. Aus (Scharinger et al., 2015).

Zudem wurde gezeigt, dass die modifizierten Mäuse ( $\text{Ca}_v1.3\text{DCRD}^{\text{HA/HA}}$ ) trotz höherer Calcium-Ströme in IHZ im Alter von 5 Wochen im Vergleich zu den Wildtypen keinen Hörschwellenunterschied hatten (Scharinger et al., 2015).

Aufgrund der erhöhten Calcium-Ströme in den IHZ der HA-Tiere stellte sich uns die Frage, ob es bei starker Erregung des Hörsystems, z.B. durch ein Schalltrauma, zu einem Calcium-bedingten Schaden (Exzitotoxizität) in den IHZ und an den Postsynapsen der HA-Mäuse kommt. Außerdem war von Interesse, ob sich die Hörschwellen der HA-Tiere gegenüber den WT-Tieren über die Zeit verschlechtert.

## 2.5 Lärm-induzierter versteckter Hörverlust

In einer Veröffentlichung von 2006 (Kujawa & Liberman, 2006) ergab eine 2-stündige 100-dB-Rauschexposition eines Oktavbandes von 8-16 kHz zusätzlich zur Zelldegeneration in Spiralganglienneuronen (SGN) eine permanente Schwellenwertverschiebung (PTS), während sich die DPOAEs wieder normalisierten. Dies bedeutet, dass ÄHZ nur vorübergehend betroffen waren. Besonders jüngere Mäuse (im Alter von 4 bis 8 Wochen) waren anfällig, aber auch ältere Mäuse litten unter Langzeiteffekten. Die Verbindung von altersbedingtem Hörverlust und

lärminduziertem Hörverlust (*noise induced hearing loss, NIHL*) zeigte die größten Schwellenverschiebungen.

In einem wegweisenden Experiment wurden Mäuse des CBA/CaJ-Stammes im Alter von 16 Wochen zwei Stunden lang einem Rauschen von 100 dB SPL mit einem Oktavband von 8-16 kHz ausgesetzt (Kujawa & Liberman, 2009). Diese Exposition verursachte nur eine vorübergehende Schwellenwertverschiebung (TTS) und keinen Verlust von IHZ oder ÄHZ. Es wurde jedoch festgestellt, dass ein Teil der Ribbonsynapsen zwischen IHZ und den afferenten SGN-Dendriten im Frequenzbereich ab 16 kHz besonders anfällig für das Trauma waren. Die Zerstörung von Ribbons begann innerhalb weniger Stunden und dauerte Monate an. Afferente Dendriten nahmen ebenfalls ab. Die Zerstörung von SGN wurde als Folgeereignis bewertet. Diese Phänomene wurden beobachtet, obwohl keine PTS vorlag, also regelmäßig getestete Hörschwellen wieder normal waren, und wurden als lärminduzierter versteckter Hörverlust (*noise-induced hidden hearing loss, NIHHL*) bezeichnet (Liberman & Kujawa, 2017; Plack et al., 2014; Schaette & McAlpine, 2011).

## 2.6 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Für die Aufklärung der Hörfunktionen beim Menschen können keine invasiven Experimente durchgeführt werden. Aufgrund der Ähnlichkeiten des peripheren und zentralen Hörsystems vom Menschen und anderen Säugern werden für die Aufklärung der Mechanismen von genetisch bedingter Schwerhörigkeit, Lärmschwerhörigkeit und altersbedingter Schwerhörigkeit Studien an Tieren, insbesondere an Mäusen, weiterhin genutzt. Mäuse bieten wegen der vielen Möglichkeiten der genetischen Manipulation durch *knockout-* oder *knockin*-Techniken ein großes Potential für die Aufklärung von physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen (Early et al., 2022; Kujawa & Liberman, 2019; McLellan et al., 2017).

In Deutschland wird die Lärmbelastung am Arbeitsplatz durch eine gesetzliche Grenze festgelegt, weshalb im Jahr 2007 die „Verordnung zum Schutz der Beschäftigten vor Gefährdungen durch Lärm und Vibrationen“ (kurz: Lärm- und Vibrations-Arbeitsschutzverordnung oder auch LärmVibrationsArbSchV) ins Leben gerufen wurde. Die LärmVibrationsArbSchV sieht es vor, dass je nach Auslösewert bestimmte Maßnahmen ergriffen werden müssen, um die Sicherheit und die Gesundheit der anwesenden Personen nicht zu gefährden. Grundsätzlich sollte ein Wert von 80 Dezibel nicht überschritten werden. Ob und wann dies der Fall ist, muss jedoch zunächst einmal festgestellt werden. Diese Aufgabe fällt gemäß § 3 der Lärm- und Vibrations-Arbeitsschutzverordnung dem Arbeitgeber zu ([Arbeitsrechte.de](http://Arbeitsrechte.de)).

Da sich der spannungsgesteuerte  $Ca_v1.3$ -Calciumkanal an allen Ribbonsynapsen in inneren Haarzellen (IHZ) befindet und für das Hören essentiell ist (Baig et al., 2011; Platzter et al., 2000;

Rutherford, 2015), lag der Fokus dieser Arbeit auf den Auswirkungen einer veränderten Kanalfunktion auf die Hörschwellen und die Empfindlichkeit gegenüber einem Schalltrauma.

Zuerst mussten die Methoden der ABR-Messung und der Vertäubung an Wildtypmäusen der Linie C57BL/6N in der Versuchstierhaltung des Centrums für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) etabliert werden. Die eigentliche Fragestellung war, das Hörvermögen von Wildtypmäusen und  $Ca_v1.3DCRD^{HA/HA}$ -Mäusen durch ABR-Messungen vor und nach zweistündiger Vertäubung im Frequenzbereich von 8 -16 kHz mit 100 dB SPL (Kujawa & Liberman, 2009) sowie nachfolgend in definierten Zeitabständen zu untersuchen. Ein zu den Experimenten dieser Arbeit parallel verfolgtes Ziel war die Untersuchung der cochleären Synaptopathie. Dazu erfolgten histologische Antikörperfärbungen der Prä- und Postsynapsen an Corti-Organen der HA- und WT-Tiere 4 Wochen nach Trauma, die von Kerstin Blum durchgeführt wurden. Es stellte sich heraus, dass die Cochleae im Alter von 16 Wochen sehr stark verknöchert waren. Für den interessanten hochfrequenten Bereich der Cochlea war wegen der Knochenanteile und der resultierenden Lichtstreuung und Reflexion keine sinnvolle Bildaufnahme am Laserscanning-Mikroskop möglich.

Die Fragestellungen dieser Arbeit sind:

1. Etablierung der ABR-Messungen und des Schalltraumas (zweistündige Vertäubung im Frequenzband 8 - 16 kHz) in der Versuchstierhaltung des CIPMM
2. Gibt es einen Unterschied in den Hörschwellen (Klick-ABR und f-ABR) zwischen HA- und WT-Tieren vor dem Trauma (Tag -2), nach dem Trauma (Tag 0) und 28 Tage nach dem Trauma?
3. Regenerieren die Hörschwellen der HA-Tiere über die Zeit anders als die der WT-Tiere?
4. Spiegeln die Amplituden der ABR-Welle I, ein Maß für die Aktivität der Hörnervenfasern, bei WT-Tieren am Tag 28 einen versteckten Hörverlust im Hochfrequenzbereich?
5. Unterscheiden sich die Amplituden der ABR-Welle I zwischen HA- und WT-Tieren in verschiedenen Frequenzbereichen der Cochlea?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden Mäuse der Linie C57BL/6N von Charles River, Sulzfeld, Deutschland, verwendet. Mäuse der Linie C57BL/6N sind häufig verwendete Versuchstiere in Hörversuchen, da sie sich gut zur genetischen Manipulation eignen (Capri et al., 2019; Mekada & Yoshiki, 2021; Mianné et al., 2016). Sie zeigen jedoch eine frühzeitig einsetzende Altersschwerhörigkeit im hochfrequenten Bereich, so dass Experimente in den ersten 4 Lebensmonaten durchgeführt werden sollten (Kane et al., 2012; Q. Y. Zheng et al., 1999).

Die Versuchstiere wurden in der Versuchstierhaltung im Gebäude „Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine“ (CIPMM) in Homburg gezüchtet und von der Kollegin Kerstin Fischer genotypisiert. Die Haltung erfolgte während des Experiments in Gruppen gleichen Geschlechtes, um eine ungewollte Vermehrung der Tiere zu verhindern. Es wurden maximal 3 Versuchstiere im Käfig und unter einem künstlichen Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h bei passender Zimmertemperatur gehalten.

Es wurde ein belüfteter IVC-Käfig für die Tierversuche verwendet, der einen guten Allergenschutz für die Bediener darstellt sowie über gute Hygienebedingungen für die Tiere verfügt. Die Tiere wurden im Käfig unter Standardbedingung gehalten. Sie bekamen Wasser und Futter ad libitum. Zweimal pro Woche wurden die Käfige neu mit Wasser und Futter versorgt. Einmal pro Woche wurde der Käfig gewechselt und eine Inspektion der Tiere von den Tierpflegern im Haus (CIPMM) durchgeführt.

Nach Antragstellung des Tierversuchs an die an die zuständige Behörde wurde der Versuch unter der Tierversuchsnummer 17/2017 genehmigt. Zu Versuchsbeginn habe ich einen 2-tägigen Tierschutzkurs besucht, um entsprechende Sachkunde im Umgang mit Tieren zu erlernen. Vor Beginn der Vertäubungs-Versuchsreihe wurden 4 Wildtyp-Mäuse, 2 männliche und 2 weibliche, verwendet, um die Methode der ABR-Messungen im Labor zu etablieren.

Aus Verhaltensmessungen ist bekannt, dass der Hörbereich dieser Mäuse circa bei 1 - 100 kHz liegt (Markl & Ehret, 1973), wobei mit ABR-Messungen nur der Bereich von 2 – 45 kHz erfasst werden kann. Zu Beginn des Versuchs lag das Alter der Versuchstiere zwischen 10 und 13 Wochen, in diesem Alter hatten sie ein Gewicht von 21 g bis 28 g. Am Anfang, definiert als Tag -2, wurde eine ABR-Messung für das Ausgangs-Hörvermögen durchgeführt. Für diese Arbeit wurden insgesamt 16 Mäuse verwendet, 8 Wildtyp- und 8 HA-Mäuse gemischten Geschlechts (je 8 männliche und 8 weibliche Tiere).

Die Tiere wurden täglich vor und nach jedem Versuch betrachtet, damit sichergestellt war, dass es dem Tier gut geht. In einem Belastungs-Score-Sheet wurde diese Information notiert. Die Inhaltspunkte des Belastungs-Score-Sheets waren das Körpergewicht, der Allgemeinzustand, das Spontanverhalten und der klinische Befund nach der Vertäubung. Für jeden Punkt gibt es einen Wert von 0 bis 20, je höher der Wert ist, desto schlechter war der Zustand des Tiers. Während der gesamten Arbeit waren alle Tiere in einem sehr guten Zustand. An Tag 1, sprich der Tag nach dem Schalltrauma, erreichten die Tiere nach Belastungs-Score-Sheet einen Wert von 5, was einer mäßigen Belastung für diesen Tag entsprach. Alle Tiere erreichten ohne größere Belastungen den letzten Versuchstag (Tag 28) außer einem Tier (C57-R214) aus der Vorexperimentgruppe, das nach Versuchstag 21 aus unklaren Gründen verstorben ist.

### **3.2 Versuchsplanung**

Zu Beginn der Arbeit wurden vier C57BL/6N-Mäuse als Kontrollgruppe verwendet, damit die Methode im Labor etabliert werden konnte. Bei dem Vorexperiment wurden ABR-Messungen an 4 Mäusen, sprich 8 Ohren (entspricht Versuchstag -2) durchgeführt. Von den 4 Mäusen waren 2 männlich und 2 weiblich. Eine männliche Maus ist am 27 Versuchstag verstorben, wodurch die letzte Messung der Hörschwelle (Tag 28) dieser Maus fehlt. In Tabelle 1 ist beschrieben, wie viele Ohren in dem Vorexperiment vertäubt und gemessen wurden.

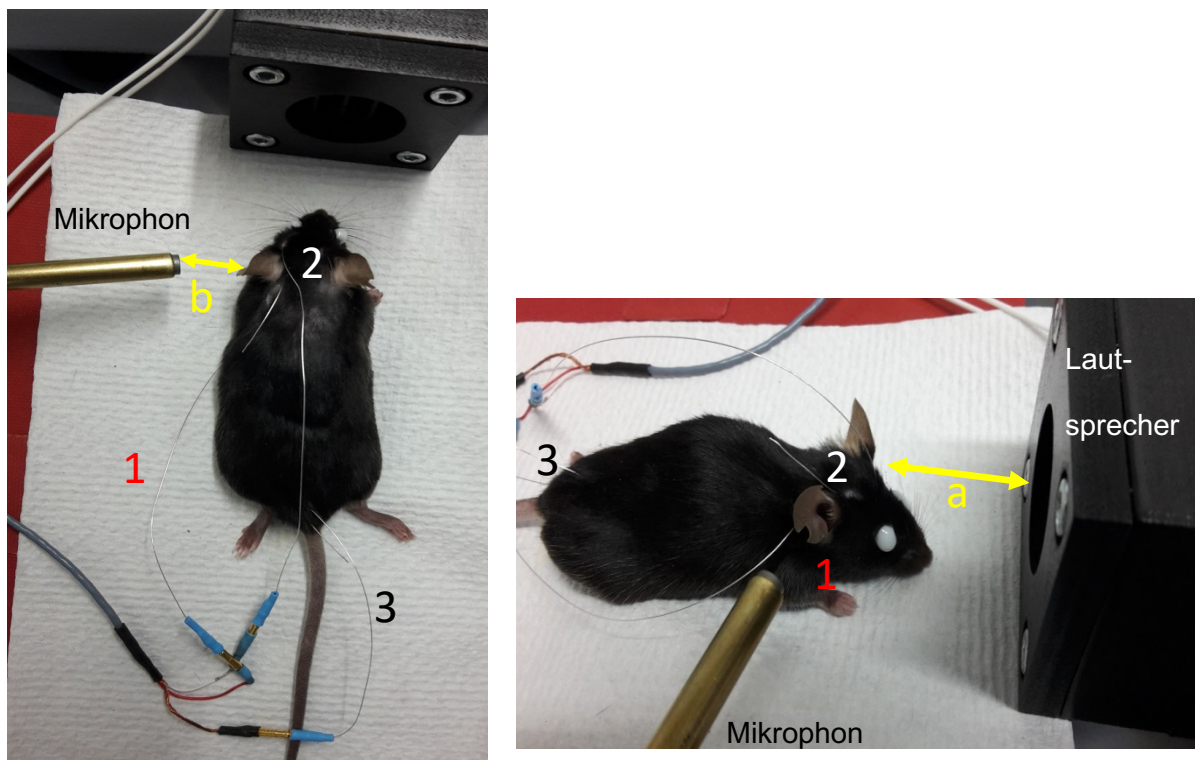
**Tabelle 1. Anzahl der vertäubten und gemessenen C57BL/6N-Mäuse aus dem Vorexperiment**

Die Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Ohren an. Von der Maus C57-R214 fehlt die Messung an Tag 28 (X). Am Versuchstag 0 wurden die Tiere vertäubt (rot). Nach der Etablierung der Methode im Labor (Vorexperiment) und dem Vergleich unserer Ergebnisse mit denen der Publikationen von (Kujawa & Liberman, 2009), wurde mit den eigentlichen Experimenten begonnen.

Maus-ID/Geschlecht/Alter Versuchstag	C57-R213 m 62 Tage	C57-R214 m 62 Tage	C57-R215 w 62 Tage	C57-R216 w 62 Tage	Gesamt- zahl Ohren
-2	2	2	2	2	8
0	2	2	2	2	8
1	2	2	2	2	8
2	2	2	2	2	8
3	2	2	2	2	8
5	2	2	2	2	8
7	2	2	2	2	8
14	2	2	2	2	8
21	2	2	2	2	8
28	2	X	2	2	6

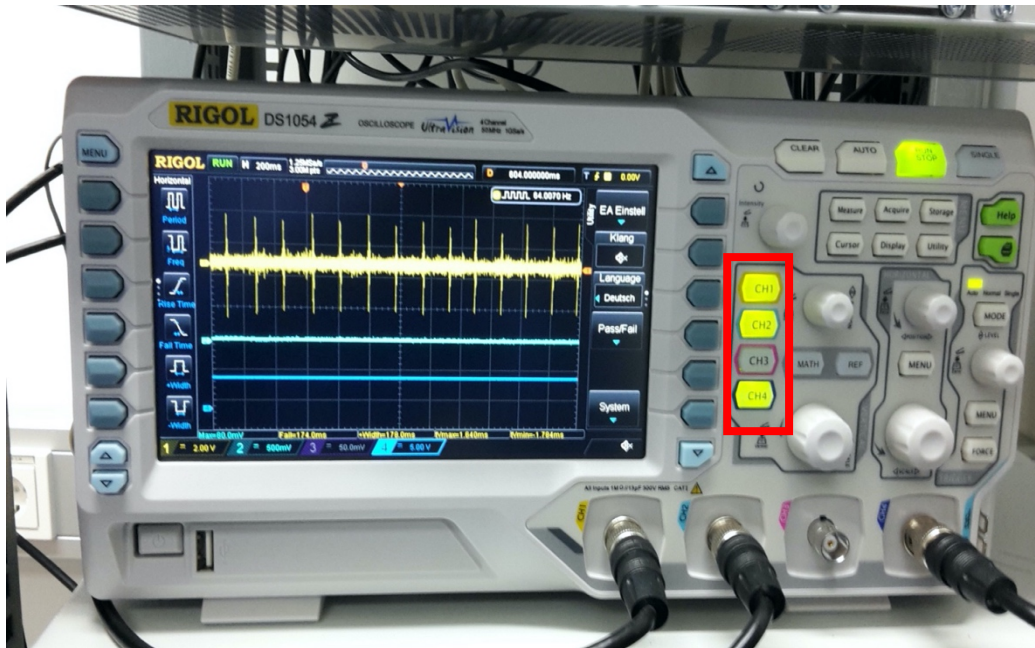
Nach der Etablierung von ABR-Messungen und Vertäubung erfolgten die eigentlichen Vertäubungsexperimente. Dafür wurden insgesamt 16 Mäuse mit C57BL/6N-Hintergrund verwendet, 8 davon waren  $Ca_v1.3DCRD^{HA/HA}$ -Mäuse (im folgenden HA-Mäuse genannt). Jeder Versuch bestand aus Messungen an insgesamt 10 Tagen, die in einem bestimmten Abstand gelegt wurden. An Tag -2 wurden erstmals ABR-Hörschwellen gemessen, dann an Tag 0 das Schalltrauma appliziert und direkt danach wurde bei den Mäusen erneut eine ABR-Messung durchgeführt. An den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 wurden erneut ABR-Messungen durchgeführt. Bei einer ABR-Messung wurde die Maus zunächst aus dem Käfig genommen und das Gewicht bestimmt und notiert. Im Anschluss wurde die Maus durch eine intraperitoneale Injektion eines Anästhetikums narkotisiert und in ein Styroporkästchen gelegt, damit sie in ca. 4 bis 7 Minuten

eine ausreichende Narkosetiefe erreichte. Diese wurde mit dem Zwischenzehenreflex überprüft. Um ein Auskühlen der Maus zu verhindern, wurde diese auf eine heizbare Unterlage in der schallisolierten Kammer gelegt. In dieser Kammer befanden sich ein Lautsprecher (AS04004PR-R, PUI Audio, Dayton, Ohio, USA) und ein Mikrophon (Sennheiser KE4, Sennheiser, Wedemark-Wennebostel), vgl. Abbildung 10. Der Maus wurden subkutan die 3 Elektroden mittels 20 G-Kanüle unter der Haut gelegt (Braun Melsungen, Deutschland) gelegt (aktive Elektroden am Mastoid (positiv), Referenzelektrode am Vertex (negativ) und dritte Elektrode am hinteren Teil des Tieres (Erde)). Die Elektroden bestanden aus einem Silberdraht (GoodFellow, Hamburg) mit einem Durchmesser von ca. 0,25 mm. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) während der Messung vor der Austrocknung geschützt, wie in der Abbildung 10 gezeigt ist. Um das Signal der Elektroden zu überprüfen, wurde es auf dem Mehrkanal-Oszilloskop (Rigol DS 1054®, Rigol Technologies, Peking, China) dargestellt. Das EKG der Maus wurde durch regelmäßiges rhythmisches Auftreten sichtbar (vgl. Abbildung 11). Ein Oszilloskop ist ein elektronisches Messgerät, das die Spannungen in Abhängigkeit der Zeit gegenüber der Nulllinie darstellt.



**Abbildung 10. Versuchsaufbau während der ABR-Messung**

Die rote Elektrode (1) wurde an das zu messende Ohr angelegt (Mastoid, positiv), die weiße Elektrode (2) in der Stirn als Referenz (Vertex, negativ) und die schwarze Elektrode (3) am hinteren Teil des Tieres als Erdung. Der Abstand zwischen dem Kopf der Maus und des Lautsprechers sollte 1 cm (Pfeil a) und der Abstand zwischen dem gemessenen Ohr und dem Mikrophon ebenfalls 1 cm (Pfeil b) betragen.



**Abbildung 11. Das Mehrkanal-Oszilloskop während der Messung**

An dem Oszilloskop wurden 3 von vier Kanälen verwendet (rot umrandet). Kanal 1 zeigt das vom Tier abgeleitete Signal auf akustische Stimulation mit EKG, Kanal 2 zeigt die die Wellenform der akustischen Stimuli. Kanal 3 zeigt den Trigger während der Messung.

### 3.3 Narkose und Antidot

Vor der ABR-Messung und dem Schalltrauma wurden die Mäuse narkotisiert. Die Narkose wurde interperitoneal mit einer 1 ml Spritze und Sterican Kanüle 40x20 mm Gr. 20 (Braun Melsungen, Deutschland) injiziert. Die Narkose besteht aus 3 Betäubungsmitteln, die vor dem Versuch vorbereitet und gemischt wurden. Anschließend wurden sie in Eppendorf-Reaktionsgefäße von 2 ml gefüllt und mit Datum beschriftet bei -20°C eingefroren. Bis zu 2 Monate konnte das Narkosegemisch aufbewahrt werden. In der Tabelle 2 werden die Dosierung der Narkose und die Verdünnung beschrieben.

**Tabelle 2. Dosierung und die Ausgangslösungen der verwendeten Narkose**

Dosierung der Narkose:	Ausgangslösungen:
Fentanyl; 0,05 mg pro kg Körpergewicht (0,05 µg/g)	Fentanyl Ampulle mit 100 µg in 2 ml (Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln)
Midazolam: 5 mg pro kg Körpergewicht (5 µg/g)	Midazolam Ampulle mit 5 mg in 1 ml (Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln)
Medetomidin: 0,5 mg pro kg Körpergewicht (0,5 µg/g)	Medetomidin 10 ml Flasche mit 5 mg pro ml (Orion Corporation, Espoo, Finland)



Die Dosierung der Narkose wurde im Verhältnis von 1:100:10 mit isotoner Natriumchloridlösung (Braun, Melsungen) verdünnt, das heißt, um eine 10 ml Narkose herzustellen, braucht man 1 ml Fentanyl, 1 ml Midazolam, 0,5 ml Medetomidin und 7,5 ml Isotone Natriumchloridlösung 0,9%. Bevor die Mäuse narkotisiert wurden, wurden sie gewogen und die entsprechende Narkosemenge der Maus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die entsprechende Menge wird wie folgt berechnet: Pro Gramm Maus Körpergewicht wird 0,01 ml Narkose benötigt. Demnach werden einer 23 g schweren Maus 0,23 ml Narkosemittel gegeben. Nach der Injektion wurde die Maus in eine Styroporbox gelegt und 7-10 min abgewartet, bis sie sich in ausreichender Narkose befand (Überprüfung durch Zwischenzehenreflex). Auf einer Heizdecke (ca. 37 °C) und in einer schallisolierten Kammer wurde im Anschluss die ABR-Messung durchgeführt. Am Vertäubungstag (Tag 0), an dem die Narkose länger anhalten sollte, konnte bei Bedarf ein Drittel der anfänglichen Narkosedosis verabreicht werden, da das Schalltrauma 2 Stunden andauerte. Reflexe durch Stimulation der Extremitäten wurden etwa alle 30 Minuten geprüft.

Das Gegenmittel bzw. das Antidot wurde direkt nach dem Ende jeder ABR-Messung injiziert, um die Wirkungen der Narkose zu verkürzen. Die Menge des Antidots wurde genauso wie die Narkosemenge berechnet. Die Dosierung des Antidots und die Ausgangslösung wird in Tabelle 3 gelistet.

**Tabelle 3. Dosierung und die Ausgangslösungen des Antidots**

Dosierung des Antidots:	Ausgangslösungen:
Naloxon: 1,2 mg/kg	Naloxon: Ampulle mit 0,4 mg in 1 ml (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg)
Flumazenil: 0,5 mg/kg	Flumazenil: Ampulle mit 0,5 mg in 5 ml (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg)
Atipamezol: 2,5 mg/kg	Atipamezol: 10 ml-Flasche mit 5 mg/ml (Orion Corporation, Espoo, Finland)

Genau wie bei der Narkose wurde auch die Antidotlösung vor dem Experiment hergestellt und der Rest bei -20°C eingefroren, um den Versuch schneller und einfacher durchzuführen. Die Antidotlösung bestand aus 3 Medikamenten, die im folgenden Verhältnis gemischt wurden: um eine 10 ml Antidotlösung herzustellen, wurden 3 ml Naloxon, 5 ml Flumazenil und 0,5 ml Atipamezol gemischt und in 1,5 ml isotone Natriumchloridlösung 0,9% verdünnt. Danach wurden die 10 ml auf 2 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Es wurde pro Gramm Körpergewicht 0,01 ml Antidotlösung injiziert. Demnach wurden einer 23 g schweren Maus 0,23 ml

Antidotlösung gegeben. Die Injektion des Antidots wurde subkutan (s.c.) unter der Nackenfalte verabreicht. Im Anschluss wurde die Maus in ihren Käfig gelegt und 1-5 min gewartet, bis sie aufwachte.

### **3.4 Versuchsprotokoll**

Bei dem Versuchsaufbau gab es bestimmte Bedingungen und Materialien, um eine ABR-Messung durchführen zu können. Ein akustisches Signal wurde erzeugt und gleichzeitig werden die akustisch evozierten elektrischen Potentiale der Stationen der Hörbahn (die ersten 10 ms) von dem Tier abgeleitet. Als Software wurde das Programm „Auditives Stimulations- und Aufzeichnungssystem“ (Audiology\_Lab, Otoconsult, Marcus Müller, Frankfurt) verwendet. Dieses Programm wurde konzipiert, um Töne einer bestimmten Frequenz mit einem gewünschten Schalldruckpegel zu erzeugen. Gleichzeitig werden eingehende ABR-Signale, die von dem Tier abgeleitet werden, aufgezeichnet und gespeichert.

#### **3.4.1 Versuchsaufbau**

Der Aufbau des Setups bestand aus einer schallisolierten Kammer, in der sich ein Mikrophon, ein Lautsprecher, ein Vorverstärker und die Ableitelektroden befanden. Von einem PC wurden akustische Signale erzeugt und über das Mikrophon (Sennheiser KE4, Sennheiser, Wedemark-Wennebostel) kalibriert. Danach wurden die ABR-Signale vom Tier abgeleitet und vor der Aufzeichnung verstärkt und gefiltert. Nach der Messung wurden die Daten gespeichert.

Bezüglich der traumatischen Lärmbelastung wurde ein Hochtonhorn (MHD-220N / RD, Monacor®, Bremen, Deutschland) in der Mitte der schallisolierten Kammer im gleichen Abstand zu allen Mäuseohren (ca. 30 cm) aufgehängt (vgl. Abbildung 10).

Eine initiale Kalibrierung wurde für alle im Experiment verwendeten Frequenzen und das Schalltrauma durchgeführt. Die akustischen Signale wurden mit einem Mikrofon (B&K 2670, Brüel & Kjaer, Naerum, Dänemark) registriert und anschließend über einen Vorverstärker (Brüel & Kjær 2670; Brüel & Kjær, Bremen) und einen damit verbundenem Messverstärker (Brüel & Kjær2636; Brüel & Kjær, Bremen) geleitet und die Lautstärke kalibriert. Die Empfindlichkeit betrug 127 mV/Pa. Das Frequenzspektrum wurde zusätzlich durch einen Spektrumanalysator (Ono Sokki Multi-purpose FFT Analyzer CF-5220, Ono Sokki Technology, Yokohama, Japan) kontrolliert. Das Mikrofon Brüel & Kjaer 4939 wurde an der gleichen Stelle platziert, an der sich das zu messende/ zu vertäubende Ohr der Maus befand. Der Trauma-Geräusch-Generator war Teil des Audiology\_Lab (Otoconsult, Marcus Müller, Frankfurt). Die Beschallung betrug zwei Stunden, mit einem Frequenzband von 8-16 kHz (weißes Rauschen) und einem Schalldruckpegel von 100 dB SPL.

Bei einem Vertäubungsversuch wurden zwei Tiere (jeweils HA und WT) gleichzeitig vertäubt. Beide Ohren aller Mäuse wurden den ABR-Messungen und dem Schalltrauma unterzogen. Die Tiere wurden am 28. Tag getötet. Eine histologische Untersuchung der Cochleae wurde von Kerstin Blum, AG Engel, bei einigen Tieren beider Gruppen durchgeführt.

Zusätzlich zu den ABR-Signalen wurden Hörschwellen, Amplituden der Wellen und Latenzen an Tag -2 (vor dem Lärmtrauma), 0 (unmittelbar nach dem Lärmtrauma), 1, 3, 5, 7, 14, 21 und 28 nach dem Lärmtrauma gemessen und später ausgewertet, siehe Ablauf der ABR-Messungen (Tabelle 4). Bei der Kontrollgruppe (nur WT, kein Trauma) wurde die gleiche Prozedur durchgeführt.

**Tabelle 4. Ablauf der ABR-Messungen an verschiedenen Versuchstagen für die Versuchs- und Kontrollgruppe**

ABR	Trauma + ABR	ABR	ABR	ABR	ABR	ABR	ABR	ABR	ABR
Tag -2	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28

### 3.4.2 Akustisches Signal und Tonerzeugung

Die Tonerzeugung fand in mehreren Schritten statt. Als erstes wurde der Stimulus von einem PC berechnet, anschließend durch einen Abschwächer und Verstärker (Otoconsult, Marcus Müller, Frankfurt) modifiziert, bis der gewünschte Stimulus in Frequenz und Schalldruckpegel erreicht wurde. Dann wurde der Stimulus an den Lautsprecher weitergeleitet und abgespielt. Zusätzlich wurde der Stimulus an ein Oszilloskop (DS 1054, Rigol Technologies, Peking, China) weitergegeben, damit er für den Versuchsleiter sichtbar war, vgl. Abbildung 11. Der Stimulus wurde von einem speziellen Breitbandlautsprecher (AS04004PR-R, PUI Audio, Dayton, Ohio, USA) in Schallwellen umgewandelt. Der Schall aus dem Lautsprecher traf auf die Ohren der Maus und auf das Mikrophon (Sennheiser KE4, Sennheiser, Wedemark-Wennebostel) neben dem zu messenden Mausohr. Vom Mikrophon gelangte das Signal über mehrere Signalverteiler und Wandler (Otoconsult, Marcus Müller, Frankfurt), welcher das Signal von analog auf digital umwandelte und auf den Computer übertrug. Mit Hilfe dieser Rückkopplung konnte das Computerprogramm erkennen, ob der Lautsprecher auf die richtige Lautstärke kalibriert war und gegebenenfalls Anpassungen in der Lautstärke bei den verschiedenen Frequenzen vornehmen. Dadurch war sichergestellt, dass der gewünschte Schalldruckpegel das Ohr des Versuchstiers erreichte.

Darüber hinaus wurden Klickstimuli verwendet, um die Hörschwelle grob bestimmen zu können. Klicks sind Stimuli, in denen alle Frequenzen enthalten sind. Sie hatten eine Dauer von 100  $\mu$ s und wurden in 5 dB-Schritten von 0 bis 100 dB SPL präsentiert. Für die Frequenz-ABR wurden Töne mit reinen Tonfrequenzen im Bereich von 2 bis 45,2 kHz in Halboktavschritten präsentiert. Sie wurden bei Schalldruckpegeln zwischen 0 und 100 dB in Schritten von 5 dB erzeugt. Somit wurden ca. 10 Frequenzen in 5 dB SPL-Schritten präsentiert (vgl. Abbildung 13). Die Gesamtdauer jedes präsentierten Tons betrug 3 ms, einschließlich 1 ms Anstiegs- und Abfallzeit als Sinusfunktion. Jeder Ton wurde 256-mal in zufälliger Reihenfolge präsentiert.

Die ABR-Ableitung zu den präsentierten Tönen wurde in invertierenden Modi über 250 Wiederholungen gemittelt. Dies ermöglichte eine bessere Darstellung der gemittelten ABR-Wellenformen, weil Artefakte und zufällige Signale eliminiert wurden. Signale nach Amplifikation über 0,9 Volt und unter -0,9 Volt wurden ausgeschlossen, da sie möglicherweise durch die Atmung oder Herzpotentiale hervorgerufen worden waren.

### **3.4.3 ABR-Signal-Aufnahme**

Durch die subkutan gelegten Elektroden wurden die gemessenen Potenziale abgeleitet und zu einem Signalverstärker (Otoconsult, Marcus Müller, Frankfurt) geleitet, wo das Signal um den Faktor 1000 von nV in  $\mu$ V verstärkt wurde. Danach wurden durch einen Filter alle Frequenzen unter 0,2 kHz und über 5 kHz eliminiert und alle Signale, die dazwischenlagen, wurden wieder um den Faktor 1000, das heißt in mV verstärkt. Zudem wurden die Signale zu einem Oszilloskop (Rigol DS 1054®, Rigol Technologies, Peking, China) weitergeleitet, um sie zu visualisieren.

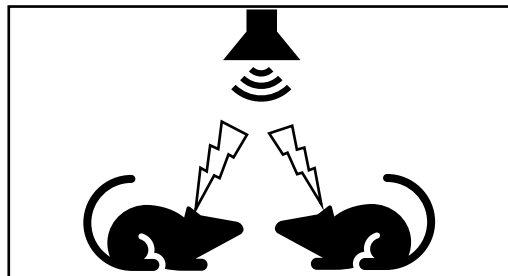
### **3.4.4 Ablauf einer ABR-Messung**

Die Mäuse werden aus der Schleusenkammer der Tierversuchshaltung geholt und mit dem Käfig in den Untersuchungsraum gebracht. Nach der Narkosegabe und dem Auftragen von Bepanthen®-Salbe auf die Augen der Maus wurde das Tier auf eine beheizte Unterlage gelegt, um eine Auskühlung des Körpers zu verhindern. Dann wurden drei Elektroden subkutan, wie bereits beschrieben, angeschlossen (vgl. Abbildung 10). Vor der Durchführung der Messung wurde geprüft, ob eine Störung des Ableitsignals vorlag. Wenn dies der Fall war, wurden die Elektroden besser positioniert oder neu gelegt. Danach wurde das Mikrofon ausgerichtet, indem es ca. 1 cm Abstand und im 45° Winkel zu dem zu messenden Ohr hatte. Dann sollte der Abstand des Mauskopfes zum Lautsprecher ca. 1 cm sein (vgl. Abbildung 10). Letztendlich wurde der Deckel der Kammer verschlossen, um eine bessere Schallisolierung zur Umgebung

zu ermöglichen und die Messung möglichst störungsfrei durchzuführen. Die durchschnittliche Dauer der Messung betrug ca. 40-45 min. Man brauchte insgesamt 5-10 min für die Narkoseabgabe, 3 min für den Anschluss der Elektroden, 15 min für die Messung der Klick- und Frequenz-ABRs am rechten Ohr, 2 min für den Wechsel der Elektroden und noch einmal 15 min für die Messung der Klick- und Frequenz-ABRs am linken Ohr. Schließlich wurde ein Antidot-Mittel subkutan (s.c.) injiziert. Nach 1-2 min waren die Mäuse wach. So betrug die Gesamtdauer einer ABR-Aufzeichnung für beide Ohren in etwa 45 Minuten pro Maus.

### 3.5 Vertäubung

Für die Vertäubung wurden zwei narkotisierte Mäuse auf einmal vertäubt (siehe Abbildung 12). Die Mäuse wurden mittig in eine schallisolierte Kammer gelegt, damit das Schalltrauma alle vier Ohren, wie in Abbildung 12 dargestellt ist, gleichmäßig traf. Die beiden Mäuse wurden für 2 Stunden mit einem weißen Rauschen im Frequenzband zwischen 8-16 kHz und einem Pegel von 100 dB SPL beschallt. Sie lagen dabei narkotisiert auf einer beheizten Unterlage und in einer schallisolierten Kammer. Für die Vertäubung wurde das Programm „NoiseExposure“ verwendet. Durch einen Verstärker (Otoconsult, Marcus Müller, Frankfurt) und einen Lautsprecher (MHD-220N/RD, MONACOR INTERNATIONAL GmbH & Co. KG, Bremen) wurde das Rauschen als Schalltrauma appliziert.



**Abbildung 12. Schematische Darstellung der schallisolierten Kammer während des Experiments**

Jeweils zwei Mäusen wurden in der schallisolierten Kammer beschallt (seitliche Ansicht). Der Lautsprecher befand sich zentral über den Tieren. Er war am Deckel der schallisolierten Kammer befestigt. Das Schalltrauma mit 8-16 kHz weißem Rauschen hatte einen Schalldruckpegel von 100 dB SPL, dem die narkotisierten Tiere für eine Dauer von 2 Stunden ausgesetzt wurden.

Damit eine gleichmäßige Schallverteilung der Mäuse mit einer Lautstärke von 100 dB SPL und einem Breitbandrauschen von 8-16 kHz ermöglicht werden kann, wurden vor Beginn des Versuchs die Mäuse im mittleren Punkt der Kammer positioniert. Dieser Punkt wurde schon zuvor

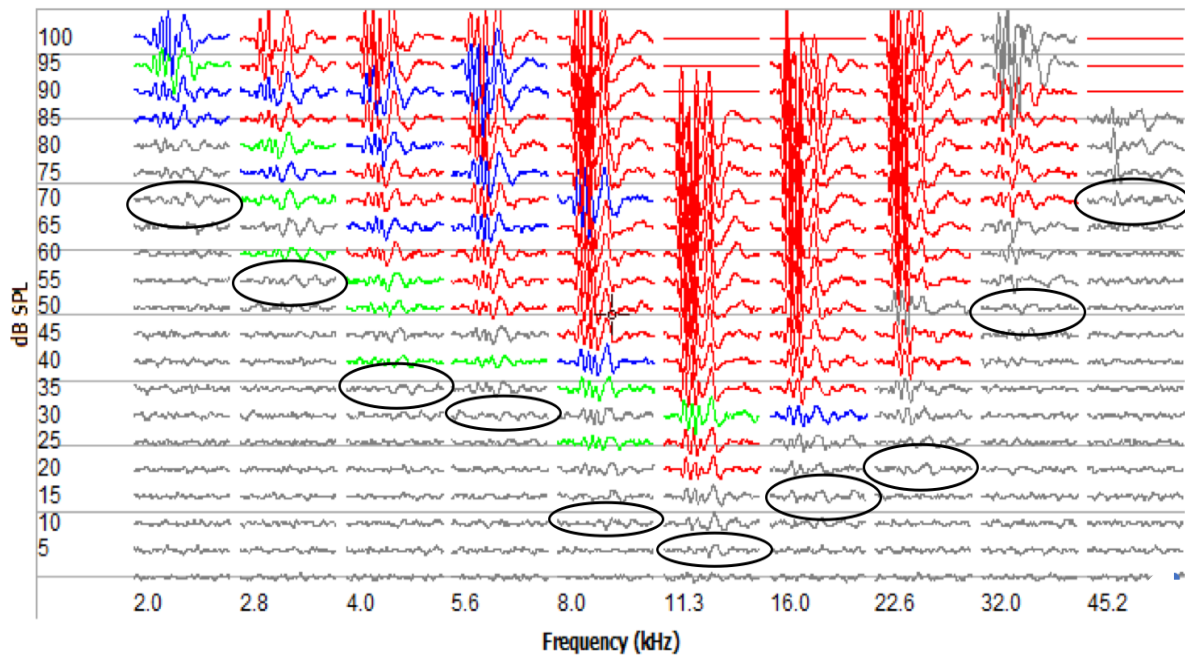
bei der Kalibrierung des Systems markiert. Die Kalibrierung erfolgte wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben.

Nach dem zweistündigen Schalltrauma wurde direkt eine ABR-Messung durchgeführt. Eine Maus wurde außerhalb der Kammer auf eine warme Unterlage gelegt und die andere Maus wurde der ABR-Messung unterzogen. Im Anschluss wurde der zuerst gemessenen Maus das Antidot appliziert und bei der verbliebenen Maus die ABR-Messung durchgeführt. Um ein unterschiedliches ABR-Ergebnis wegen der Wartezeit nach Trauma auszuschließen, wurde jedes Mal beim Beginn der ABR-Messung die Mausart getauscht, das heißt einmal wurde mit einer HA-Maus und einmal mit einer Wildtyp-Maus begonnen, so dass die mittlere Narkosedauer für jede Gruppe nahezu identisch war und eine mögliche Fehlerquelle vermieden wurde.

### **3.6 Auswertung der Hörschwellen**

Für die Datenauswertung wurden 2 Programme verwendet, Audiology Lab und Microsoft-Excel. Jede ABR-Messung (Spannungssignal) hing von der Kombination aus Signalamplitude, Frequenz und Schalldruckpegel ab, woraus sich ABR-Wellenformen ergeben. Als erstes wurden die Hörschwellen der Klick-ABR vom rechten und vom linken Ohr der Maus in Audiology Lab bestimmt und anschließend die Werte in eine Excel-Tabelle eingetragen. Als nächstes wurden die Hörschwellen bei den einzelnen Frequenzen der ABR-Messung (bei den Frequenzen 2; 2,8; 4; 5,6; 8; 11,3; 16; 22,6; 32; 45,2 kHz) bestimmt und in eine Excel-Tabelle eingetragen. Dann wurde daraus der Mittelwert und die Standardabweichung aller gewonnenen Werte der Klick- und Frequenz-ABR aller gemessenen Ohren berechnet und in einem Diagramm dargestellt, um einen Vergleich mit den anderen Messungstagen zu bekommen.

An manchen Stellen der Messung gab es keine deutlichen Hörschwellen bzw. keine Ergebnisse. Dies lag hauptsächlich an höheren realen Schwellenwerten als mit Audiology Lab messbar sind. Die Ursachen der meisten undeutlichen Wellen sind wahrscheinlich die Grenze des Lautsprechers bei besonders hohen Frequenzen oder das Mikrophon. Die Bestimmung der Hörschwelle variierte ein wenig von einer Person zur anderen Person, weshalb es sehr wichtig war, dass die Datenauswertung von derselben Person durchgeführt wird, damit man am Ende eine einheitliche Datenauswertung hatte. Für die Identifizierung der Hörschwelle gab es mehrere Kriterien. Man beginnt bei jedem Frequenzbereich von leisen zu lauten Tönen, bis deutlich eine Wellenform aus dem Rauschen erkennbar ist (vgl. Abbildung 13). Die Welle I sollte eine Latenz zwischen 1,2 und 2,2 ms haben. Die Latenz der Welle I nimmt mit steigender Frequenz stetig zu. Eine Messung mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis ergab klare und besser identifizierbare ABR-Wellen. Für Auswertung der Klick-ABR wurde die gleichen Kriterien angewendet.



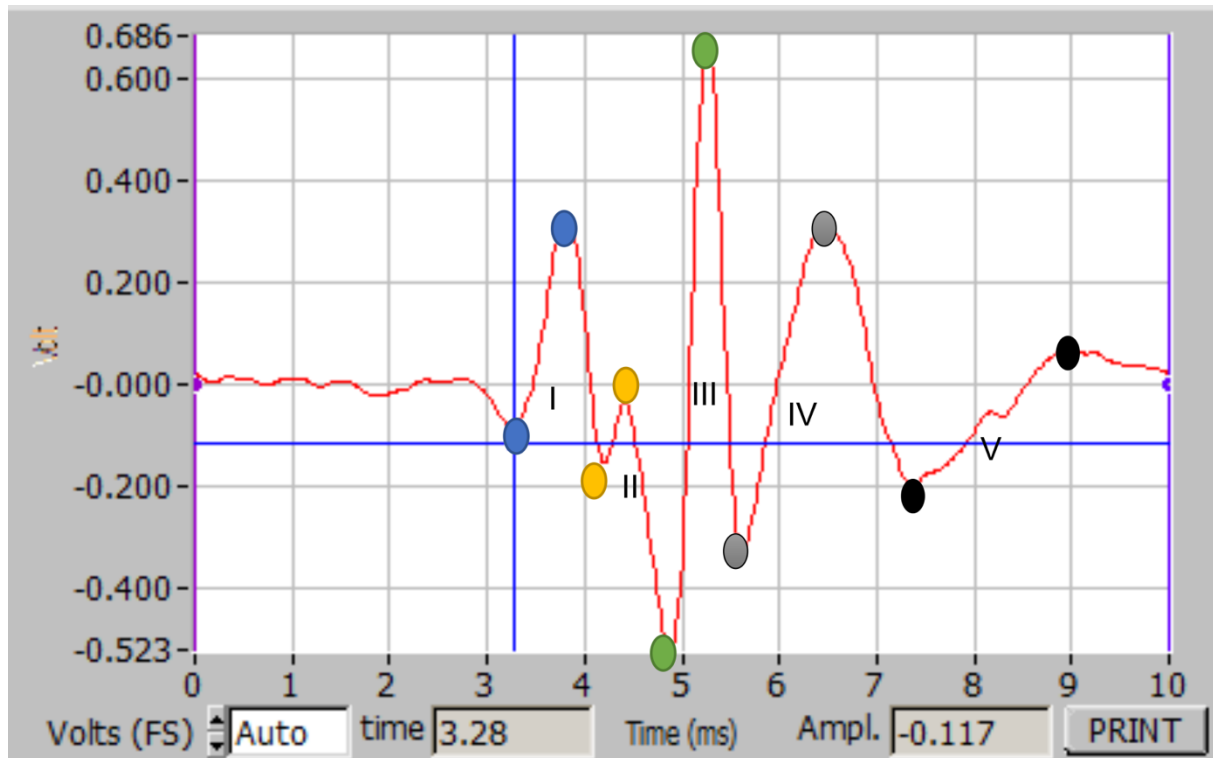
**Abbildung 13. Eine ABR-Messung eines Wildtyp-Tieres**

Die Y-Achse zeigt den Schalldruckpegel in dB SPL und die X-Achse beschreibt die Frequenz in kHz. Die ermittelten Hörschwellen sind mit den schwarzen Ovalen markiert. Der Färbung der Wellen wurde vom Programm automatisch generiert, aber für die Auswertung nicht verwendet.

### 3.7 Auswertung der Latenzen und Amplituden

Die Auswertung der Latenzen und der Amplituden der Wellenformen wurde durch das Programm Audiology Lab per Hand durchgeführt. Es wurden der negative und positive Peak für die Wellen von I bis V von der Wellenform jeder einzelnen Frequenz-Lautstärke-Kombination der ABR-Messung mit Doppelklick bestimmt und automatisch in eine Excel-Tabelle übertragen. Dann wurde

n diese Daten in einer Excel-Tabelle separat ausgewertet.



**Abbildung 14. Wellenform einer Frequenz-Lautstärke-Kombination einer ABR-Messung**

Jedes Paar der farbigen Punkte zeigt einen negativen und positiven Peak der jeweiligen Welle. Die Wellen wurden mit den Ziffern von I bis V markiert. Die Y-Achse beschreibt die Höhe der Amplitude und die X-Achse bezieht sich auf die Zeit in ms (Latenz). So konnte für jede Welle die Amplitude und die Latenz bestimmt werden.

### 3.8 Statistische Auswertung

Für die Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichung, für die Erstellung der Diagramme und die statistische Berechnung (Mann-Whitney U-Test) wurde Microsoft Excel verwendet. Signifikanzniveaus waren wie folgt:

\* =  $p < 0,05$  (5 % Fehlerwahrscheinlichkeit)

\*\* =  $p < 0,01$  (1 % Fehlerwahrscheinlichkeit)

\*\*\* =  $p < 0,001$  (0,1 % Fehlerwahrscheinlichkeit).



## 4 Ergebnisse

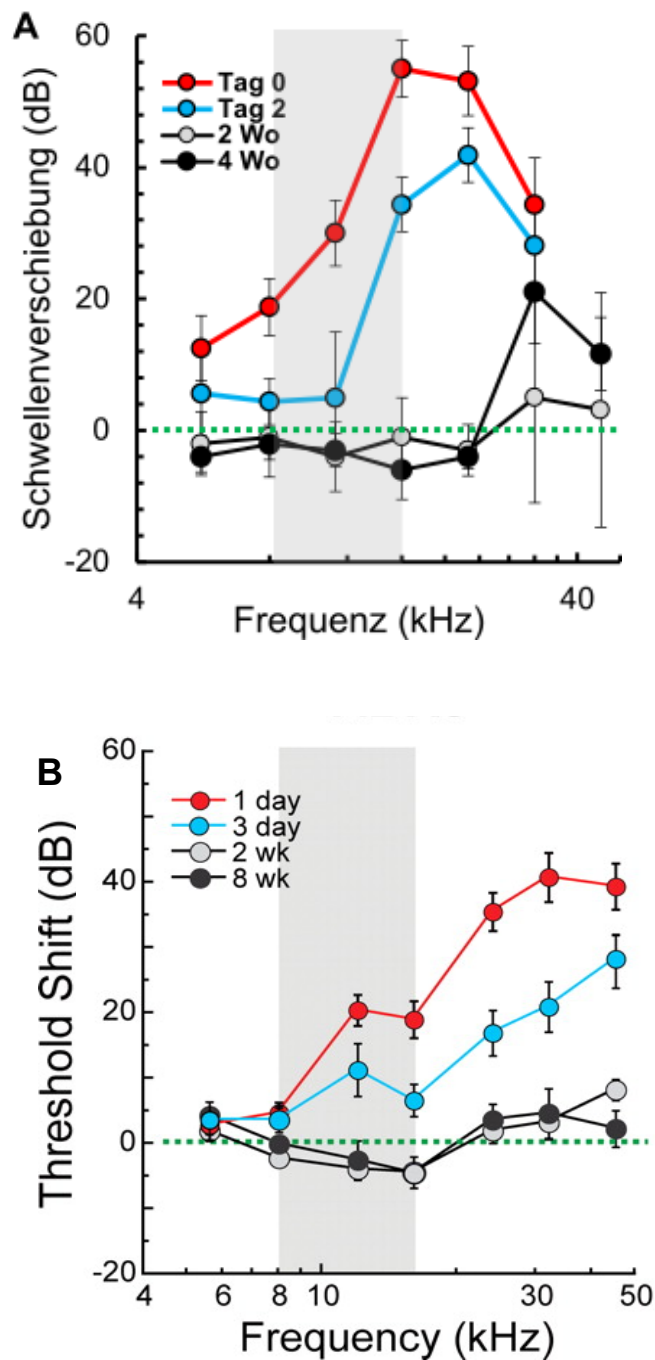
### Datenbasis

Im Rahmen meiner Arbeit wurden elektrophysiologische Untersuchungen an 20 Mäusen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6N durchgeführt. Vier Wildtyp-Mäuse wurden zur Etablierung von ABR-Messungen und Vertäubung in unserem Labor verwendet, 8 Wildtyp-Mäuse und 8 HA-Mäuse für den eigentlichen Vertäubungsversuch. Die Mäuse wurden während der Messung und des Schalltraumas narkotisiert. Von 20 Tieren konnten für 19 Tiere für die vorliegende Arbeit komplette Daten aufgenommen werden und nur bei einem Tier der Etablierungsgruppe konnte die letzte Messung an Tag 28 nicht durchgeführt werden, da das Tier aus unklarem Grund starb.

Als erstes werden die Ergebnisse der Etablierungsgruppe mit den Ergebnissen von Liberman et al. 2009 verglichen. Als zweites werden die Ergebnisse der Klick-ABR-Messungen vorgestellt. Anschließend werden die Hörschwellen der Frequenz-ABR-Messungen und die Regeneration nach Trauma präsentiert. Zum Schluss werden die Ergebnisse der frequenzabhängigen Amplituden der ABR-Welle I vorgestellt. Die Abbildungen zeigen die relevantesten Daten der Versuchstage -2, 0 und 28.

### 4.1 Etablierung der Vertäubungsmethode an einer C57BL/6N-Kontrollgruppe

Für die Etablierung der Methode wurden vier C57BL/6N Mäuse verwendet. An Tag -2 wurden die Mäuse narkotisiert und es wurde eine ABR-Messung durchgeführt, an Tag 0 wurde die Gruppe einer 2-stündigen Vertäubung unterzogen, nach der Vertäubung wurde eine weitere ABR-Messung durchgeführt. Weitere ABR-Messungen erfolgten an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28.



### Abbildung 15. Etablierung des Schalltraumas

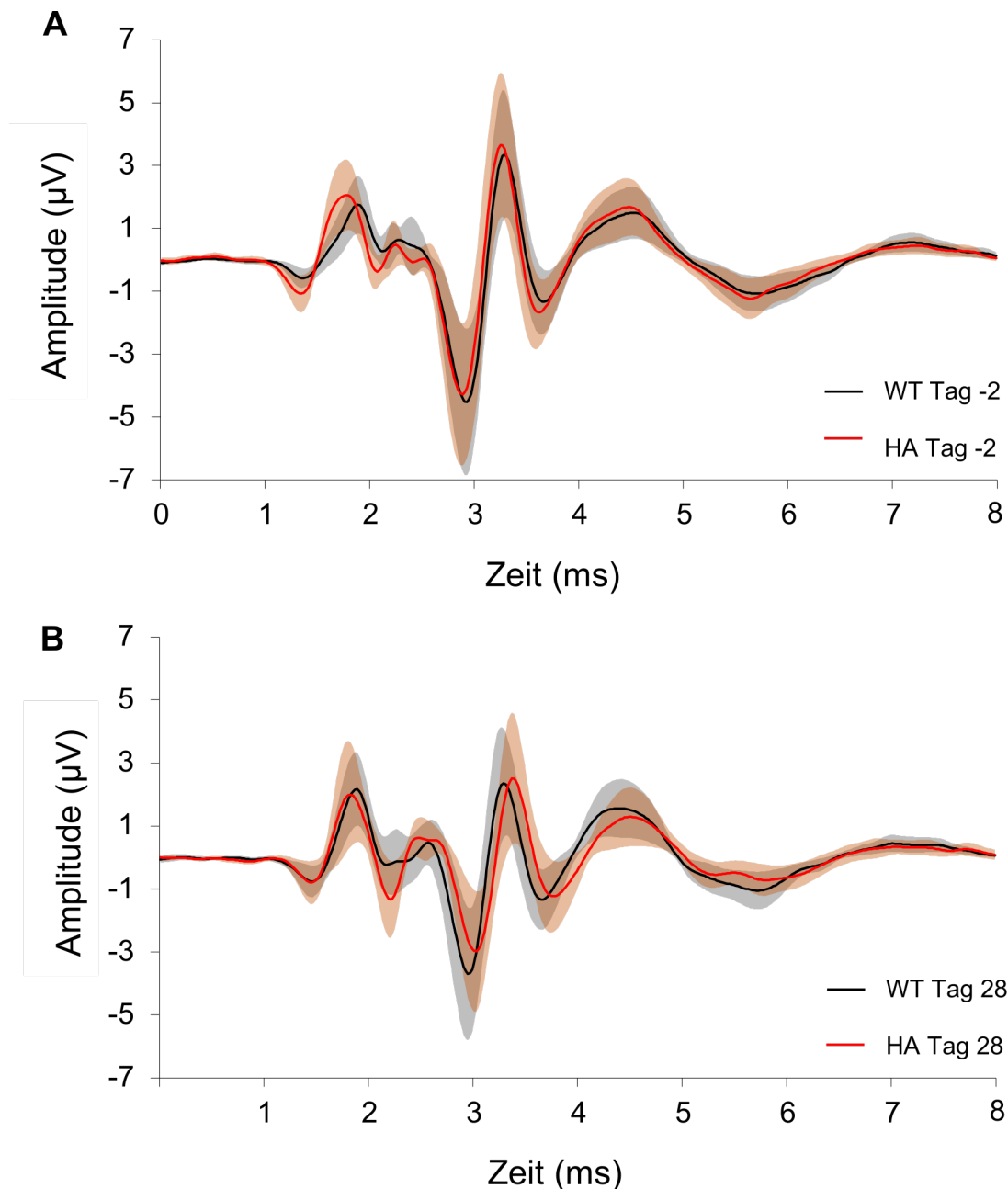
Hörschwellenverschiebung nach dem Schalltrauma für (A) eigene Messungen an der WT-Etablierungsgruppe (C57BL/6N-Hintergrund),  $n = 6 - 8$  Ohren, und (B) von Kujawa und Liberman an CBA/CaJ-Mäusen ( $n = 6 - 12$  Ohren). Die graue Fläche in der Mitte des Diagramms zeigt den Frequenzbereich des Vertäubungsrauschens (8-16 kHz), die horizontale gestrichelte Linie die Hörschwellen an Tag -2. Abbildung 15 A zeigt die Hörschwellen vor der Vertäubung (Tag 0, rot) und an verschiedenen Tagen nach der Vertäubung (Tag 2, blau, 2 Wochen, grau und 4 Wochen, schwarz)  $n = 6-8$  Ohren. Abbildung 15 B aus Kujawa und Liberman zeigt die Hörschwellen an verschiedenen Tagen nach der

Vertäubung (Tag 2, rot, Tag 3, blau 2 Wochen, grau und 8 Wochen, schwarz) n = 6-21 Ohren. (Kujawa & Liberman, 2009).

In Abbildung 15 werden die Ergebnisse der Vertäubung an der Kontrollgruppe als Schwellenverschiebung gegenüber den Hörschwellen vor Vertäubung mit den Daten von Kujawa und Liberman verglichen. Bei den beiden Abbildungen hat sich die Kurve an Tag (1) der Vertäubung (in unserer Arbeit entspricht dies dem Tag 0) am meisten nach oben verschoben. Dies sieht man sehr deutlich im Bereich des Schalltrauma (graue Fläche 8-16 kHz) und in Richtung höhere Frequenzen, welches dem medialen und midbasalen Bereich in der Cochlea entspricht. Am Tag 14 hatte sich die Hörfähigkeit in beiden Studien praktisch erholt. Das zeigt, dass wir die Vertäubungsmethode in unserem Labor etablieren konnten. Ein Unterschied in den Studien liegt darin, dass bei uns die letzte Messung am Tag 28 und bei Kujawa & Liberman am Tag 56 war. Am Tag 28 war bei unseren Tieren eine gewisse Schwellenerhöhung bei 32 kHz und 45 kHz sichtbar, die ein Zeichen einer bereits einsetzen Hochtton-Altersschwerhörigkeit sein könnte (Kane et al., 2012; Kujawa & Liberman, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde an den Tagen 1 und 3 kein Wert für die Hörschwelle bestimmt. Man sieht jedoch, dass zwischen der Hörschwelle direkt nach Trauma (Tag 0) und Tag 2 bei meinen Messungen schon eine deutliche Verbesserung stattfand.

### **4.2 Klick-ABR von Wildtyp- und HA-Mäusen vor und nach Schalltrauma**

In der Klick-ABR wird als Stimulus ein kurzer Klick-Ton mit einem breiten Anregungsspektrum verwendet. Diese Methode liefert eine erste schnelle Bewertung von Hörstörungen (Møller et al., 1995; Starr & Achor, 1975; Yu et al., 2011; Q. Y. Zheng et al., 1999). Da die hohen Frequenzen bei dieser Methode im Anregungsreiz unterrepräsentiert sind, ist bei Mäusen immer auch eine Messung der f-ABR nötig (Lin et al., 2011; Maison et al., 2013). In Abbildung 16 sind gemittelte ABR-Wellenformen von WT- und HA-Mäusen vor und 28 Tage nach Trauma dargestellt.

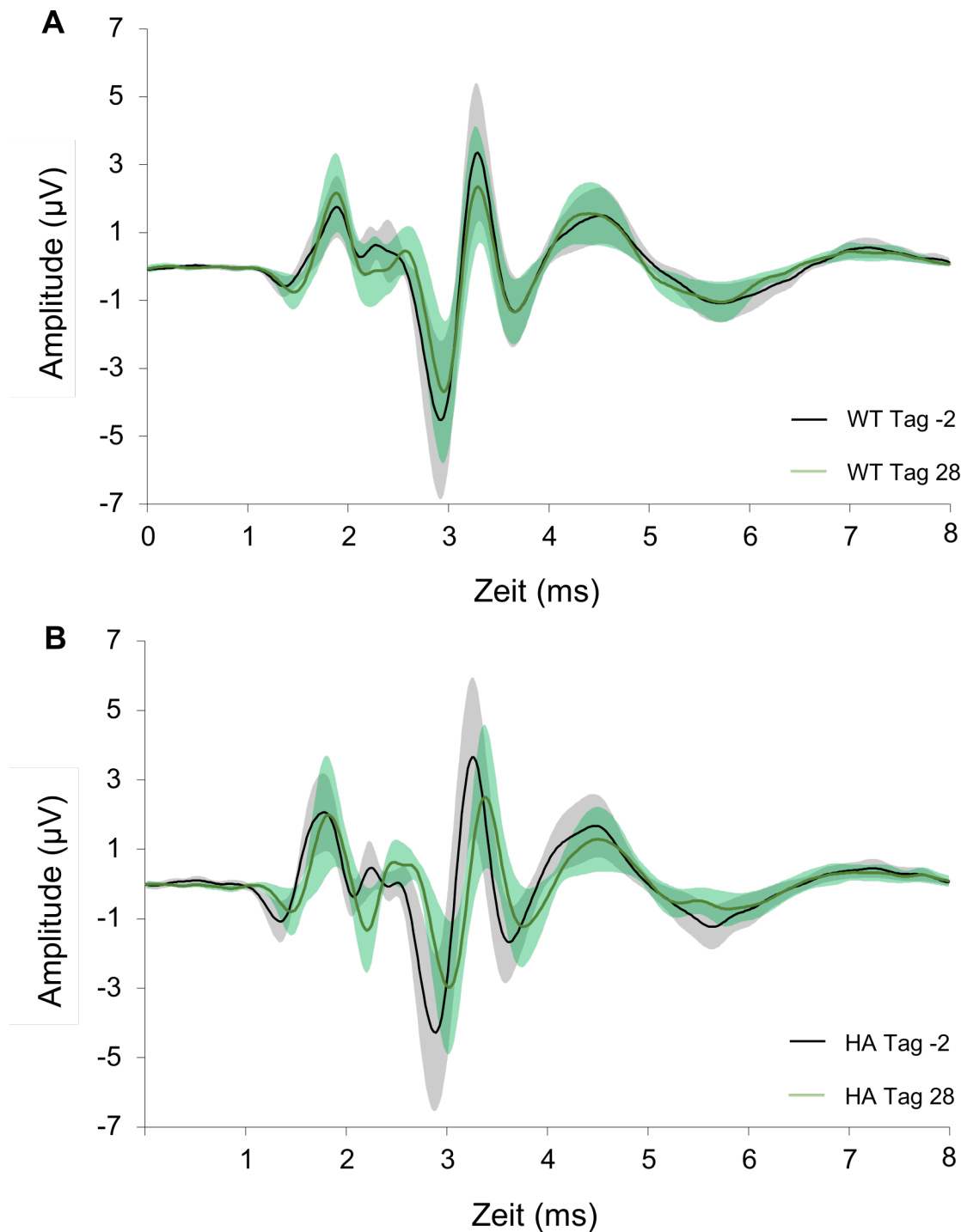


**Abbildung 16. Gemittelte ABR-Wellenformen für WT- und HA-Mäuse vor und nach Trauma**

Gemittelte ABR-Wellenformen  $\pm$  SD als Antwort auf einen Klick-Reiz vor Schalltrauma (A) und 28 Tage nach Trauma (B) für die WT-Tiere (schwarz) und die HA-Tiere (rot). Es wurde jeweils die ABR-Wellenform der Ohren bei einem Pegel von 30 dB über der individuellen Schwelle verwendet. Anzahl der Ohren (Tiere): 16 (8) pro Genotyp.

Qualitativ lässt sich aus der Abbildung 16A entnehmen, dass an Tag -2 die Form der mittleren ABR-Wellen beider Gruppen ungefähr gleich ist. Der negative Peak der Welle II war bei den HA-Tieren größer. Insgesamt bemerkt man eine kürzere Latenz von Welle I bis zu Welle II der HA-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe. Vier Wochen nach Trauma (Abbildung 16B) waren

die Formen der gemittelten ABR-Wellen beider Genotypen ebenfalls ähnlich. Nur bei den Wellen III und IV zeigte die HA-Gruppe eine kleine Verzögerung im Vergleich zu der WT-Gruppe.

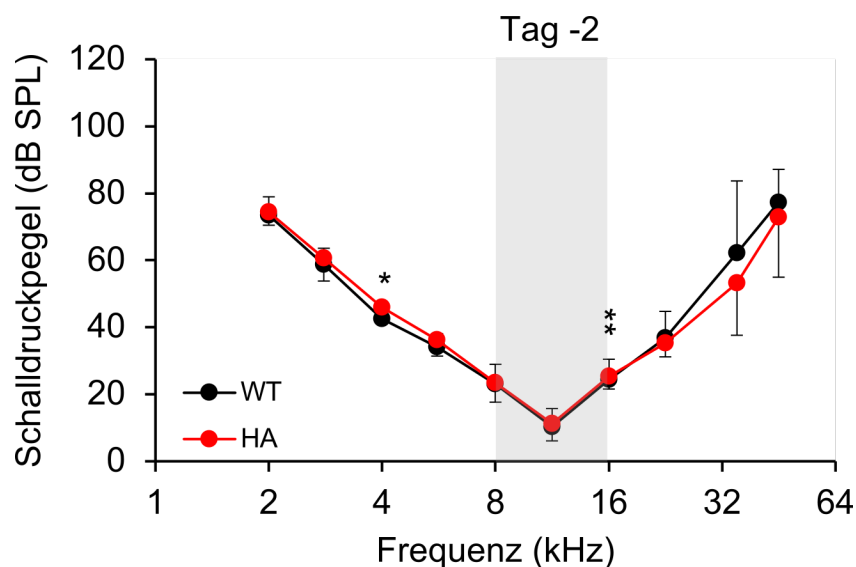


**Abbildung 17. Genotyp-spezifische gemittelte ABR-Wellenformen vor und nach Trauma**  
Vergleich der ABR-Wellenformen  $\pm$  SD als Antwort auf einen Klick-Reiz vor (Tag -2) und 28 Tage nach Schalltrauma für WT- Mäuse (A) und HA-Mäuse (B). Es wurde jeweils die ABR-Wellenform eines Ohres bei einem Pegel von 30 dB über der individuellen Schwelle verwendet; Anzahl der Ohren (Tiere): 16 (8) pro Genotyp.

Abb. 17 stellt die ABR-Wellenformen vor und 28 Tage nach Vertäubung getrennt für die Genotypen dar. Aus den beiden Abbildungen 16 und 17 wird ersichtlich, dass es nach der Vertäubung keinen wesentlichen und klaren Unterschied bei der Form und Anzahl der Wellen gab. Die beiden untersuchten Mauslinien zeigten jedoch nach der Vertäubung tendenziell spätere und kleinere Wellen. Dies war auffällig bei der HA-Gruppe (Abb. 17B) für die reduzierten Amplituden der Wellen II, III und IV, wohingegen bei der WT-Gruppe eine Verkleinerung nach Vertäubung nur bei der Welle III bestand (Abb. 17A). Vier Wochen nach Vertäubung war bei beiden Genotypen keine Verzögerung der ersten Welle vorhanden, aber eine Verzögerung der Wellen II bis IV in der HA-Gruppe. Im Gegensatz dazu wies die WT-Gruppe am Tag 28 nur eine leichte Verzögerung in Welle III auf.

### 4.3 Frequenzabhängige Hörschwellen von $Ca_v1.3DCRD^{HA/HA}$ -Mäusen vor und nach Schalltrauma

In den folgenden Abbildungen werden die Hörschwellen von WT-Gruppe und HA-Gruppe in verschiedenen Darstellungen veranschaulicht. In dieser Arbeit werden nur die Schwellen an den Tagen -2, 0 und 28 präsentiert, obwohl an weiteren Tagen Messungen durchgeführt wurden, weil an diesen drei Tagen die Hauptkriterien gut darstellbar sind. Tag -2 zeigt das normale Hörvermögen der Mäuse vor dem Schalltrauma, Tag 0 beschreibt die Hörschädigung direkt nach dem Trauma und Tag 28 stellt das Hörvermögen nach maximaler Regenerationsphase im Rahmen dieser Experimente dar.



**Abbildung 18. Mittlere Hörschwellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen am Tag -2**

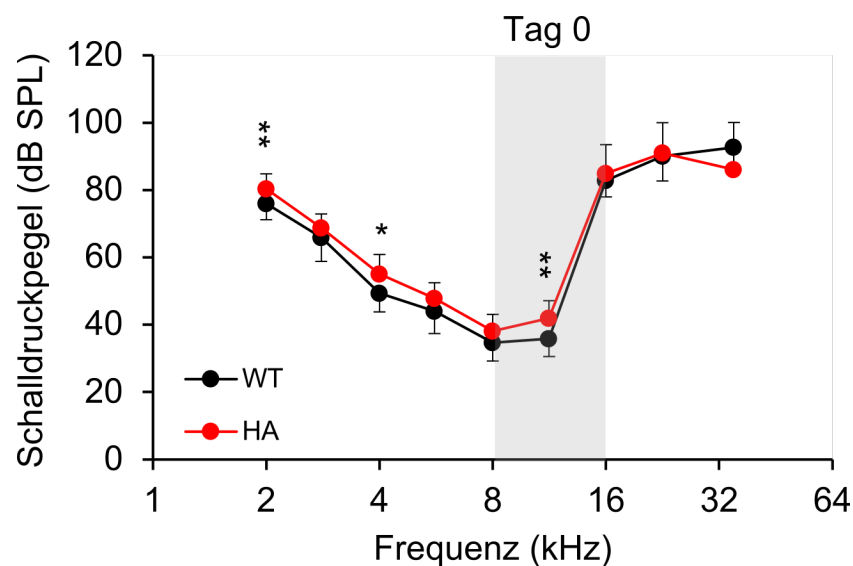
Mittlere Hörschwellenkurve +/- SD von 8 Wildtyp-Mäusen (schwarz, n = 16 Ohren) und von 8 HA-Mäusen (rot, n = 16 Ohren) am Tag -2. Der graue Balken im Diagramm entspricht dem Frequenzband des späteren Vertäubungsrauschens. \*p < 0,05; \*\* p < 0,01 (Mann-Whitney U-Test).

Abbildung 18 zeigt die initialen Hörschwellen der beiden Gruppen am Tag -2, die aus jeweils 8 Mäusen (3 männliche und 5 weibliche) bestanden. In der Situation vor dem Trauma gab es signifikante, aber geringe Schwellenwertunterschiede zwischen den Gruppen. Diese geringen Unterschiede zeigten sich bei 4 kHz (WT: 43 dB SPL versus HA: 46 dB SPL) und bei 16 kHz (WT: 24 dB SPL versus HA: 25 dB SPL), siehe Tabelle 5. Da die Genauigkeit der Schwellenbestimmung nur 5 dB beträgt, sind diese beiden Unterschiede als nicht relevant zu betrachten. Beide Genotypen haben damit fast gleiche frequenzabhängige Hörschwellen vor der Vertäubung.

**Tabelle 5. Ergebnisse des statistischen Tests der frequenzabhängigen Hörschwellen von Wildtyp- und HA-Mäusen am Tag -2**

In die Tests gingen Daten von jeweils 16 Ohren von 8 Tieren für beide Genotypen ein. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ‚n.s.‘ bedeutet nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test).

Frequenz (kHz)	2	2,8	4	5,6	8	11,3	16	22,6	32	45,2
$p$ -Wert $\leq$	n.s.	n.s.	0,05	n.s.	n.s.	n.s.	0,01	n.s.	n.s.	n.s.

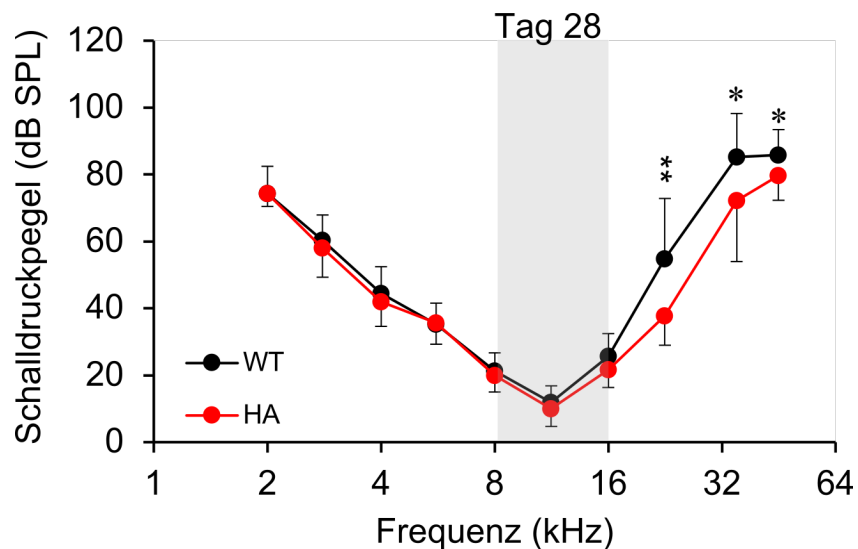


**Abbildung 19. Mittlere Hörschwellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen direkt nach der Vertäubung (Tag 0)** Mittlere Hörschwellen  $\pm$  SD von 8 Wildtyp-Mäusen (schwarz,  $n = 16$  Ohren) und 8 HA-Mäusen (rot,  $n = 16$  Ohren) direkt nach der Vertäubung (Tag 0). Der graue Balken in der Mitte des Diagramms entspricht dem Frequenzband (8-16 kHz) des Vertäubungsrauschens von 100 dB SPL für 2 h. \*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,01$  (Mann-Whitney U-Test).

In Abbildung 19 sind die Hörschwellen am Tag 0, kurz nach dem Schalltrauma von 100 dB SPL für 2 h, dargestellt. Bei beiden Genotypen fand eine gleichartige Schwellenerhöhung oberhalb von 11 kHz statt, vgl. Abbildung 16. Bei den Frequenzen von 2 bis 11 kHz waren die Werte der HA-Gruppe tendenziell höher als bei der WT-Gruppe. Bei 3 Frequenzen (2 kHz, 4

kHz, 11 kHz) gab es eine signifikante Erhöhung der Hörschwellen der HA-Gruppe um maximal 6 dB (bei 11 kHz).

Vier Wochen nach dem Trauma, am Tag 28, waren die mittleren Hörschwellen beider Genotypen wieder abgesunken und von 2 bis 16 kHz gleich (Abb. 20). Für Frequenzen von 22,6 bis 45,2 kHz waren die durchschnittlichen Hörschwellen der WT-Gruppe signifikant höher als bei der HA-Gruppe, und zwar um 17 dB (22,6 kHz), 13 dB (32 kHz) und 6 dB (45,2 kHz). Obwohl also die HA-Tiere direkt nach Vertäubung den größeren Schaden aufwiesen (Abb. 19), zeigten sie eine bessere Regeneration der Schwellen als der Wildtyp.

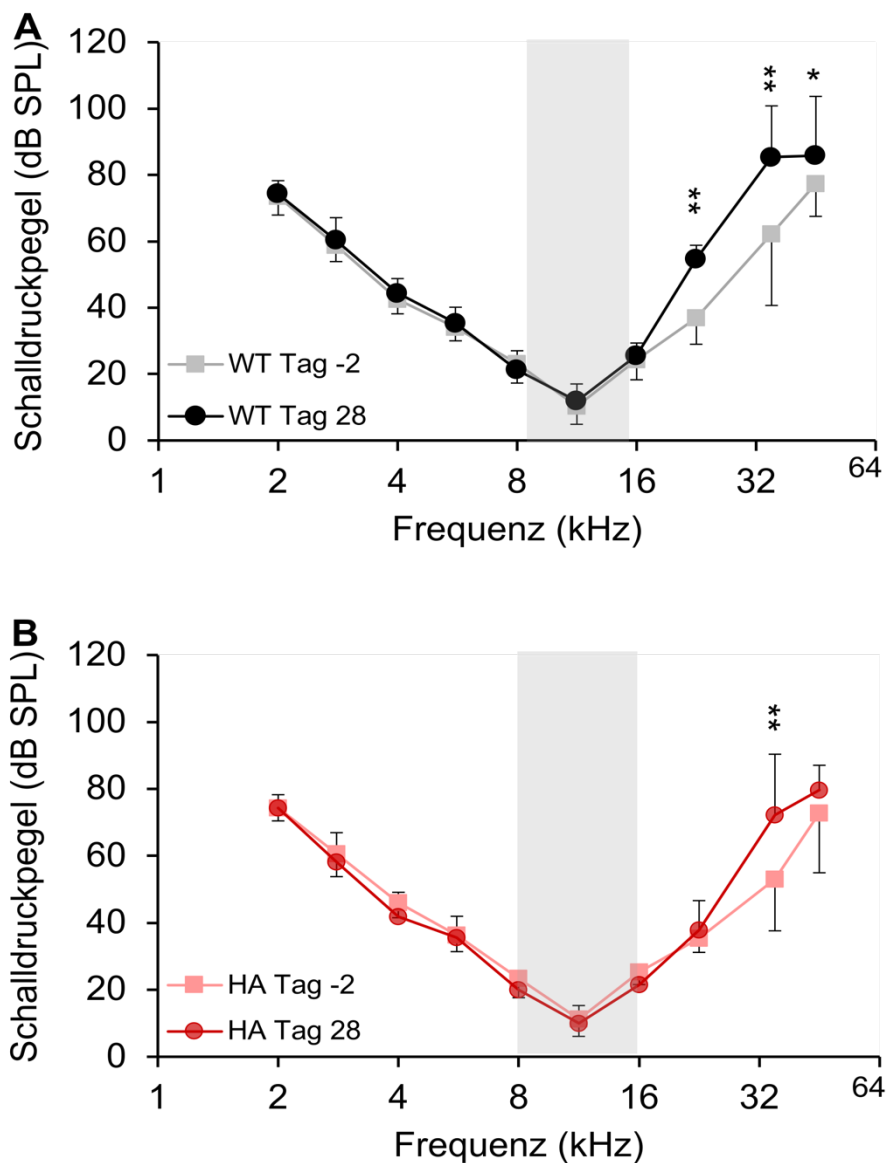


**Abbildung 20. Mittlere Hörschwellen von WT-Mäusen und HA-Mäusen am Tag 28 nach Vertäubung**

Mittlere Audiogramme +/- SD von 8 Wildtyp-Mäusen (schwarz, n = 16) und 8 HA-Mäusen (rot, n = 16) an Tag 28 nach Vertäubung. Der graue Balken entspricht dem Frequenzband des Vertäubungsrauschens. \*  $p \leq 0,5$  \*\*  $p \leq 0,01$  (Mann-Whitney U-Test).

Um die Auswirkungen des Schalltraumas für jeden Genotyp besser beurteilen zu können, zeigt Abb. 21 die mittleren Hörschwellen an Tag-2 und Tag 28 getrennt für WT- und HA-Mäuse. Bei niedrigen Frequenzen (2 – 16 kHz) verursachte das Schalltrauma sowohl bei der WT-Gruppe als auch bei der HA-Gruppe keine Hörschwellenerhöhung. Bei den WT-Tieren blieben nach 4 Wochen signifikante Schwellenerhöhungen bei 22,6 kHz, 32 kHz und 45,2 kHz zurück (Abb. 21A), bei den HA-Tieren jedoch nur bei 32 kHz (Abb. 21B). Die größte Schwellenerhöhung gab es bei der WT-Gruppe bei einer Frequenz von 22 kHz (37 dB SPL an Tag -2, 55 dB SPL an Tag 28).

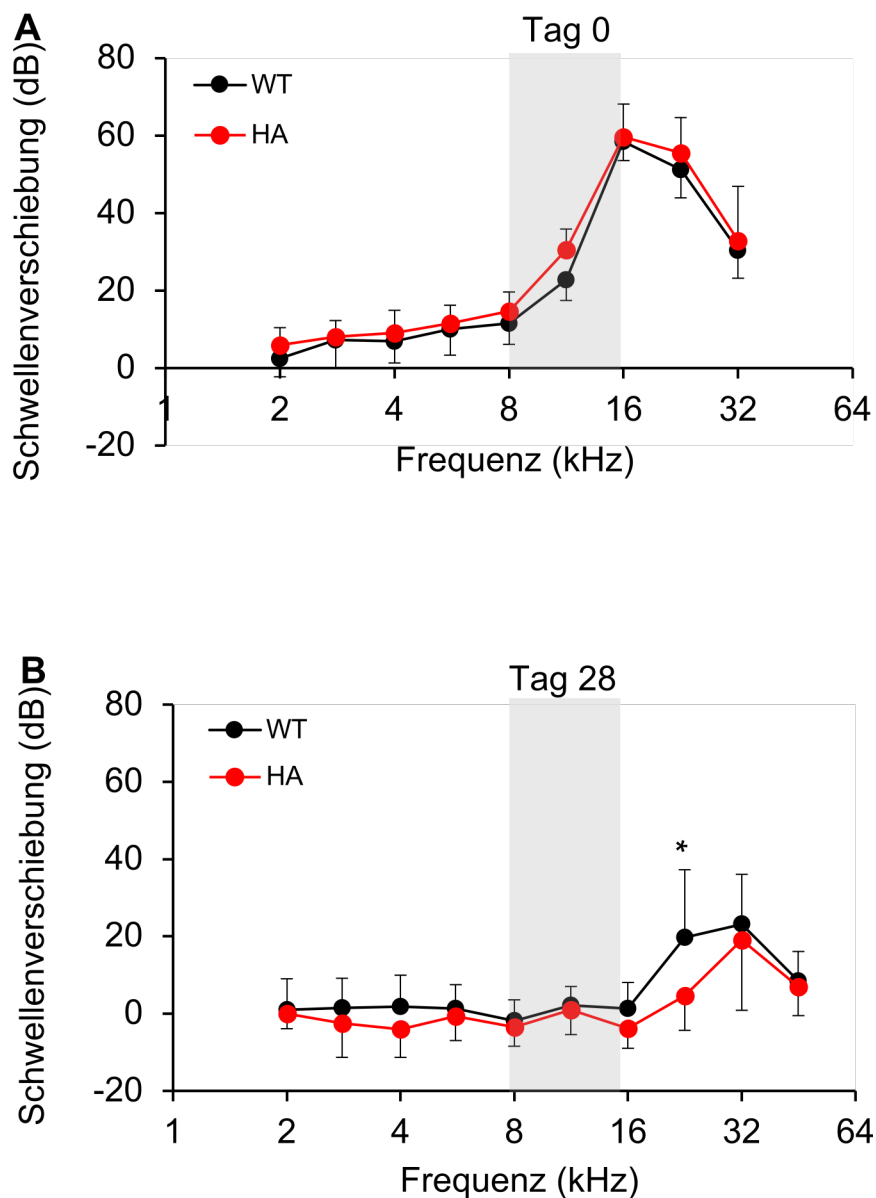




**Abbildung 21. Gemittelte Hörschwellen vor und 4 Wochen nach Schalltrauma für Wildtyp- und HA-Mäuse**

Mittlere Hörschwelle +/- SD von 8 Wildtyp-Mäusen (A) und 8 HA-Mäusen (B) an Tag -2 im Vergleich zu Tag 28. Der graue Balken in der Mitte des Diagramms entspricht dem Frequenzband des Vertäubungsrauschens. \*  $p \leq 0,5$  \*\*  $p \leq 0,01$  (Mann-Whitney U-Test).

#### 4.4 Regeneration der frequenzabhängigen Hörschwellen von WT- und HA-Mäusen nach Trauma



**Abbildung 22. Temporäre und permanente Hörschwellenerhöhungen durch das Trauma für WT- und HA-Mäuse**

Differenz der mittleren Hörschwelle +/- SD direkt nach dem Trauma bezogen auf Tag -2 (A, TTS) und am Tag 28 bezogen auf Tag -2 (B, PTS). WT-Tiere schwarz (n=8), HA-Tiere rot (n=8). Der graue Balken entspricht dem Frequenzband des Vertäubungsrauschens. \*  $p \leq 0,5$  (Mann-Whitney U-Test).

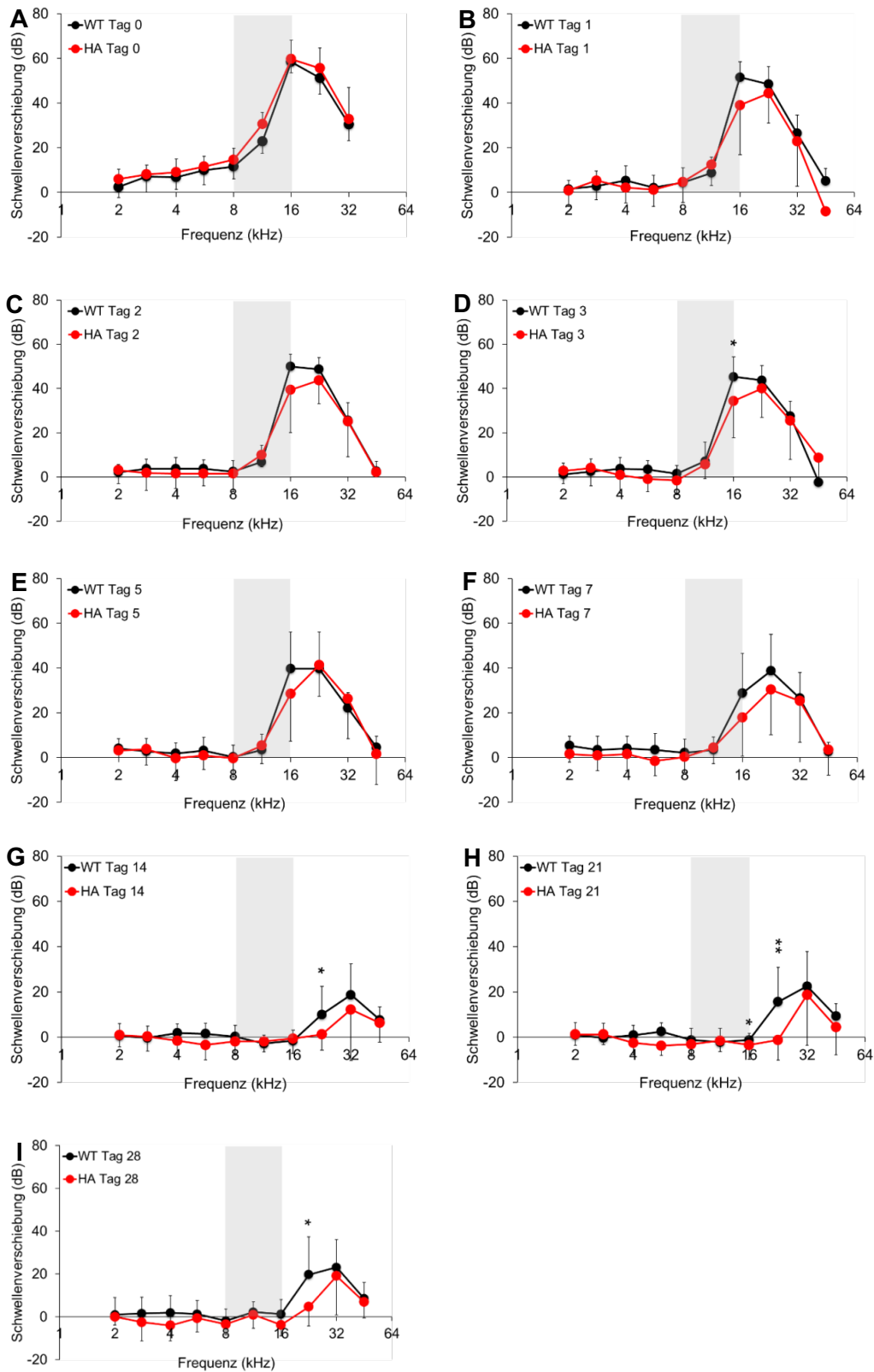
Da die HA-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren den größeren Schaden an Tag 0 aufwiesen, aber bessere Hörschwellen an Tag 28, ist der Hörverlust für Tag 0 im Vergleich zu Tag -2 und die Wiederherstellung der Hörschwelle an Tag 28 im Vergleich zu Tag 0 in Abbildung 22 gezeigt. Die mittlere akute Trauma-induzierte TTS war bis 8 kHz – der unteren Grenze des Vertäubungsrauschens – sehr klein (Abb. 22A).

Der Hörverlust stieg bei 11 kHz steil an, war maximal bei 16 kHz und 22 kHz, und fiel zu 45 kHz wieder ab. Dies galt sowohl für WT- und HA-Tiere, es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Vier Wochen nach Trauma zeigten beide Genotypen die gleiche Erholung der Hörschwellen bis 16 kHz (Abb. 22B, Tag 0 – Tag 28). Bei den Frequenzen 22,6 kHz und 32 kHz blieb bei beiden Genotypen eine PTS übrig, deren genaue Beurteilung nichtvertäubte Kontrollgruppen gleichen Alters erfordert hätte.

Bei der Frequenz von 22,6 kHz erholte sich die Schwelle der HA-Tiere signifikant besser als die der Wildtyp-Tiere, während sich bei 32 kHz und 45 kHz beide Gruppen gleich verhielten.

Insgesamt muss man das 100 dB SPL-Trauma bei diesen Mäusen mit dem C57BL/6N-Hintergrund und dem Alter von ca. 16 Wochen (an Tag 28) als ein PTS-Trauma im Hochfrequenzbereich bezeichnen. Das Ziel, das TTS-Trauma von Kujawa & Liberman (2009) zu reproduzieren, wurde nicht erreicht.



**Abbildung 23. Entwicklung der Schalltrauma-induzierten Hörschwellenverschiebungen gegenüber Tag -2 innerhalb von 4 Wochen nach Trauma für WT und HA-Mäuse** Die Differenz der mittleren Hörschwellen +/- SD bezogen auf Tag -2 für die WT-Gruppe (schwarz, n=8) und die HA-Gruppe (rot, n=8) für die angegebenen Versuchstage (Abb. A- I). \* p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01 (Mann-Whitney U-Test).

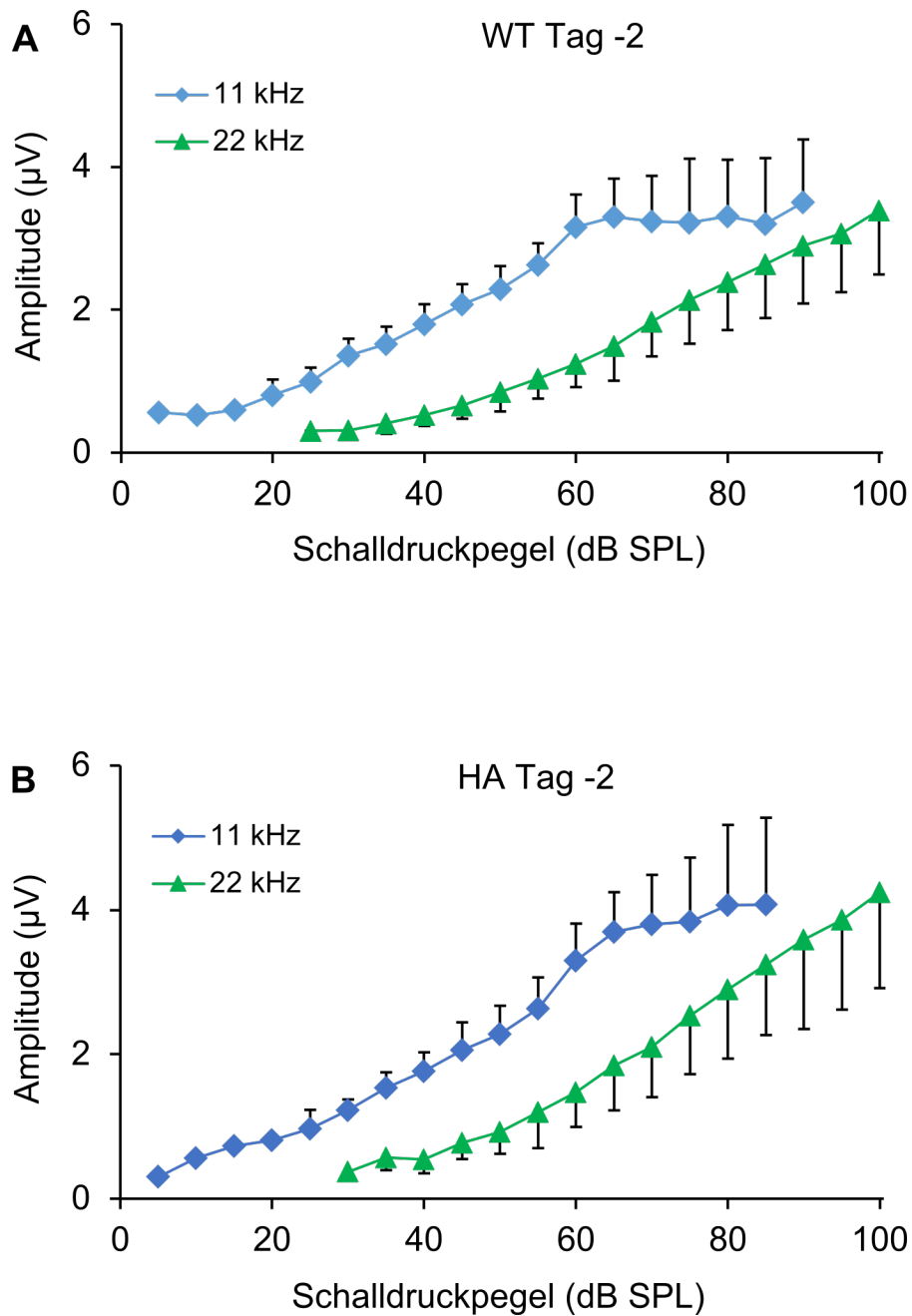
Der Traumaschaden (TTS oder PTS) bzw. die teilweise Regeneration der Hörschwellen nach Trauma für WT- und HA-Tiere ist in Abb. 23 für alle gemessenen Zeitpunkte (Tag 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28) dargestellt. Der Hörschaden war für beide Genotypen sehr ähnlich und war für die HA-Tiere niemals signifikant größer als für die WT-Tiere. An Tag 1, 2 und 3 war der Schaden für beide Genotypen relativ ähnlich dem Ausmaß an Tag 0, mit Ausnahme der Frequenzen bis 8 kHz, bei denen sich die Schwellen bereits normalisiert hatten. Zudem waren wieder Hörschwellen bei 45 kHz messbar, was am Tag 0 für keines der 32 untersuchten Ohren der Fall war (Schwelle > 100 dB SPL). Bis zum Tag 14 fand noch weitere Regeneration und Abnahme der Schwellen statt. An den Tagen 21 und 28 war eine Tendenz zum Anstieg im Hochfrequenzbereich zu beobachten. Dies könnte durch die früh einsetzende Hochtonschwerhörigkeit verursacht sein (Kane et al., 2012; Q. Y. Zheng et al., 1999). Es sei darauf hingewiesen, dass der WT bei 22,6 kHz an den Tagen 14, 21 und 28 eine signifikant höhere mittlere Schwelle als die HA-Gruppe aufwies, was die Hypothese vom größeren permanenten Lärmschaden bei den HA-Tieren in Frage stellt.

#### **4.5 Schalltrauma-induzierte Änderungen der Wachstumsfunktionen der ABR-Welle I von WT- und HA-Mäusen**

Wie in Kapitel 3.6 erläutert, kann die Verringerung der Amplitude der ABR-Welle I als wichtiges Zeichen für die cochleäre Synaptopathie bzw. den lärminduzierten versteckten Hörverlust (NIHHL) und den lärminduzierten Hörverlust (NIHL) angesehen werden. Die Amplitude der ABR-Welle I kann sowohl für Klickgeräusche (vgl. Abb. 16 und 17) als auch für Reintöne als Funktion des Pegels dargestellt werden und heißt dann „Wachstumsfunktion der Welle I“. Alle Diagramme in Kapitel 4.5 zeigen Amplituden der Antworten auf Reintöne als Funktion des Schalldruckpegels.

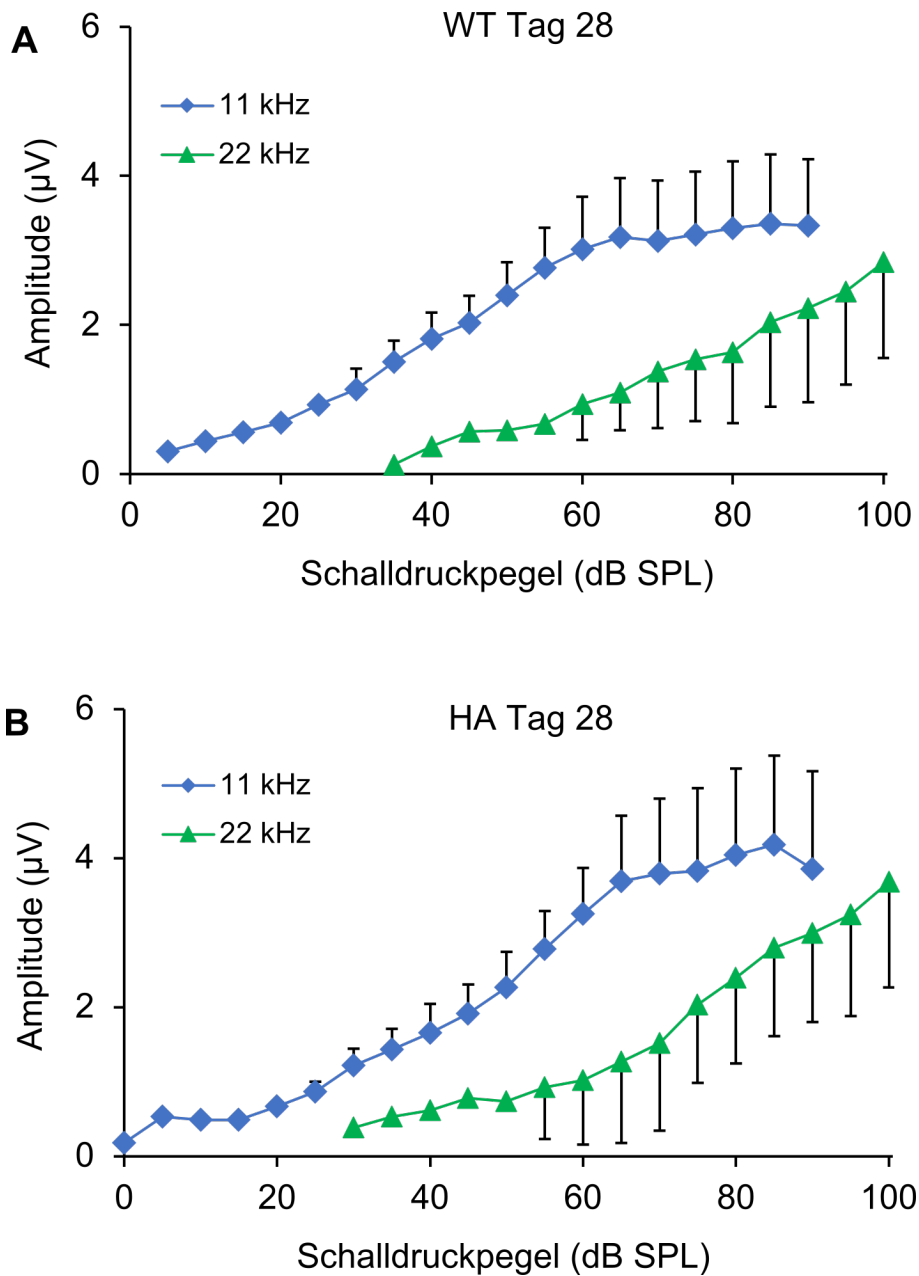
In dieser Arbeit werden exemplarisch nur die Amplituden bei den Frequenzen 11 kHz und 22 kHz präsentiert. Bei 11 kHz zeigten die Tiere das beste Hörvermögen, daher große Amplituden der ABR-Welle I sowie keine PTS nach Trauma. Bei 22 kHz trat ein deutlicher TTS-Schaden und teilweise auch PTS-Schaden auf. Hier wurde daher ein versteckter Hörverlust erwartet. Noch passender wäre die Auswertung der Amplituden bei 32 kHz gewesen. Allerdings waren hier die Hörschwelle schon initial hoch und der PTS-Traumaschaden groß, was zu relativ kleinen Amplitudenwerten führte. In Kombination mit den großen Standardabweichungen der Amplituden, die teilweise durch technische Artefakte verursacht wurden, waren die Amplitudenwerte bei 32 kHz vor und 4 Wochen nach Trauma nicht verwendbar.

Die Amplituden der ABR-Welle I werden in diesem Kapitel auf mehrere Arten dargestellt, um Unterschiede besser demonstrieren zu können. Als erstes werden die Amplituden bei 11 kHz und 22 kHz getrennt nach Genotyp für Tag -2 (Abb. 24) und Tag 28 (Abb. 25) dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass der Beginn der Wachstumsfunktionen auf der Frequenzachse für 22 kHz erst bei höheren Pegeln beginnt als bei 11 kHz (Abb. 24, Abb. 25) was auf die höheren Hörschwellen bei 22 kHz gegenüber 11 kHz sowohl vor als auch nach Trauma zurückzuführen ist, vgl. Abb. 21.



**Abbildung 24. Mittlere Amplituden der ABR-Welle I bei 11 kHz und 22 kHz für WT-Mäuse und HA-Mäuse am Tag -2**

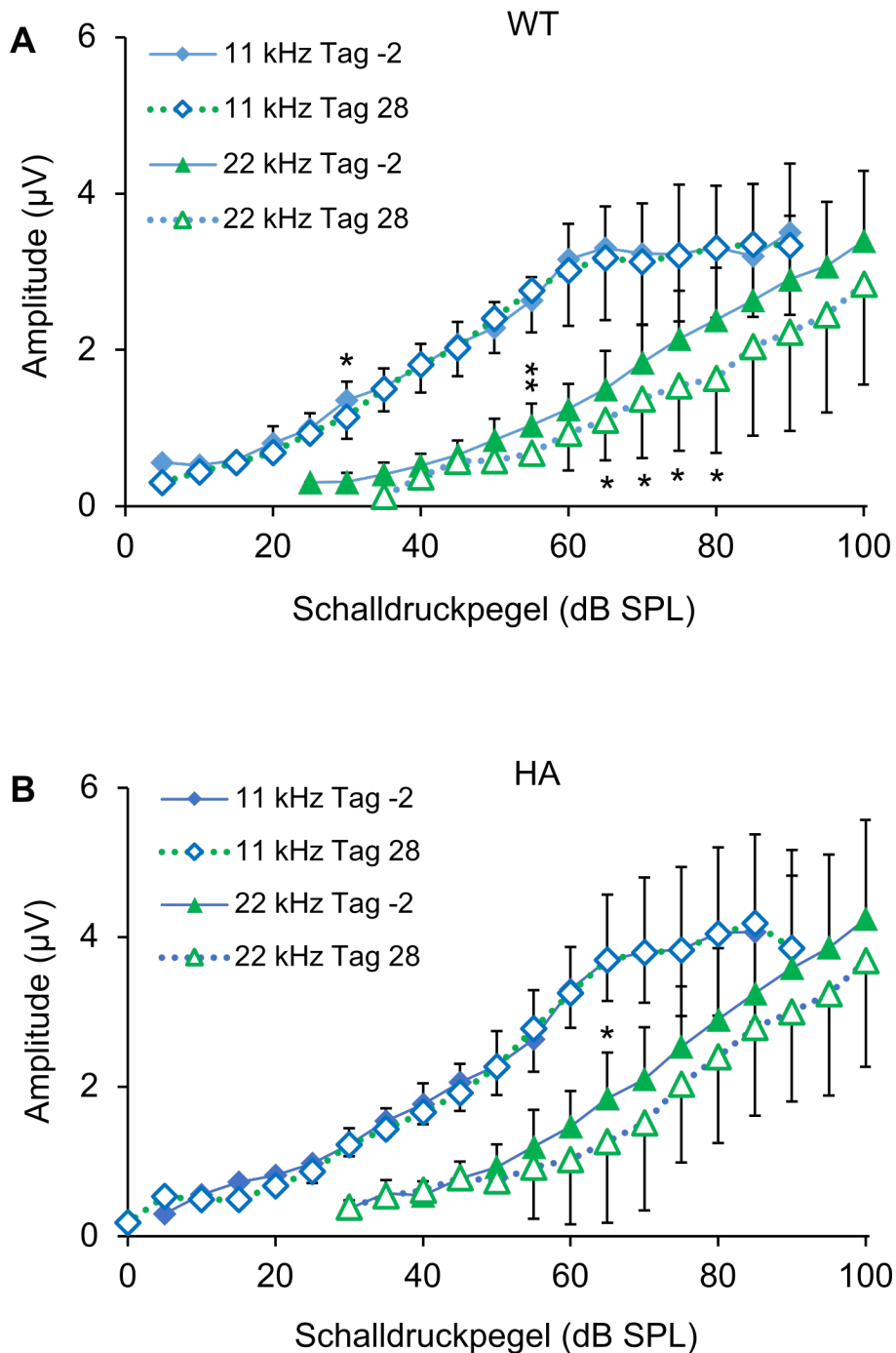
Vergleich der mittleren Amplitude  $\pm$  SD bei 11 kHz (blau) und 22 kHz (grün) für die WT-Mäuse (A) und HA-Mäuse (B) an Tag -2. Die Standardabweichung wurde wegen besserer Übersichtlichkeit jeweils nur in eine Richtung aufgetragen.



**Abbildung 25. Mittlere Amplituden der ABR-Welle I bei 11 kHz und 22 kHz für WT-Mäuse und HA-Mäuse am Tag 28**

Vergleich der mittleren Amplitude  $\pm$  SD bei 11 kHz (blau) und 22 kHz (grün) für die WT-Mäuse (A) und HA-Mäuse (B) an Tag 28 nach Vertäubung. Die Standardabweichung wurde wegen besserer Übersichtlichkeit jeweils nur in eine Richtung aufgetragen.





**Abbildung 26. Mittlere Amplituden der ABR-Welle I bei 11 kHz und 22 kHz für WT-Mäuse und HA-Mäuse vor und 28 Tage nach Schalltrauma**

Vergleich der mittleren Amplituden  $\pm$  SD bei 11 kHz (blau) und 22 kHz (grün) jeweils für Tag -2 (volle Symbole) und Tag 28 (leere Symbole) für die WT-Mäuse (A) und HA-Mäuse (B). \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$  (Mann-Whitney U-Test). Die Standardabweichung wurde wegen besserer Übersichtlichkeit jeweils nur in eine Richtung aufgetragen.

Diese Tatsache wird auch in der Abbildung 26 bestätigt. In Abb. 26A werden die Amplituden der ABR-Welle I der WT-Tiere für 11 kHz und für 22 kHz am Tag -2 mit denen von Tag 28 verglichen. Nach (Kujawa & Liberman, 2009) sollte hier eine permanente Amplitudenabnahme im hochfrequenten Bereich sichtbar werden.

Tatsächlich fanden sich für 11 kHz (mittelfrequenter Bereich) keine Unterschiede in den Wachstumsfunktionen der Amplituden. Für 22 kHz lagen die Mittelwerte der Amplituden 28 Tage nach Trauma ab 55 dB SPL immer unter denen vor Trauma (Tag -2), und für 5 Pegelwerte wurden diese Unterschiede signifikant.

Wegen der hohen Standardabweichungen und dafür relativ geringe n-Zahlen gab es für höhere Lautstärken keine weiteren signifikanten Unterschiede. Mit diesen Befunden wurden die Ergebnisse von (Kujawa & Liberman, 2009) – permanente Abnahme der Amplituden der ABR-Welle I und damit der funktionalen Nervenfasern nach Trauma - für die Frequenz 22 kHz bestätigt. Allerdings fand sich in der WT-Versuchsgruppe für 22 kHz eine permanente Schwel- lenerhöhung am Tag 28 (Abb. 21A), so dass man nicht vom versteckten Hörverlust sprechen kann. Im Gegensatz dazu wurde bei der kleineren WT-Etablierungsgruppe keine PTS am Tag 28 beobachtet (Abb. 15A).

Bei der HA-Gruppe (Abb. 26B) waren keine Effekte des Traumas auf die Amplituden bei 11 kHz vorhanden. Bei 22 kHz war auch bei den HA-Tieren - wie beim WT- eine Tendenz zur Amplitudenabnahme zu sehen, jedoch gab es nur bei einem Pegel (65 dB SPL) eine signifi- kante Reduktion am Tag 28 gegenüber Tag -2. Die HA-Tiere zeigen auch in Bezug auf die Welle-I-Amplituden eine bessere Regenerationsfähigkeit als der WT.

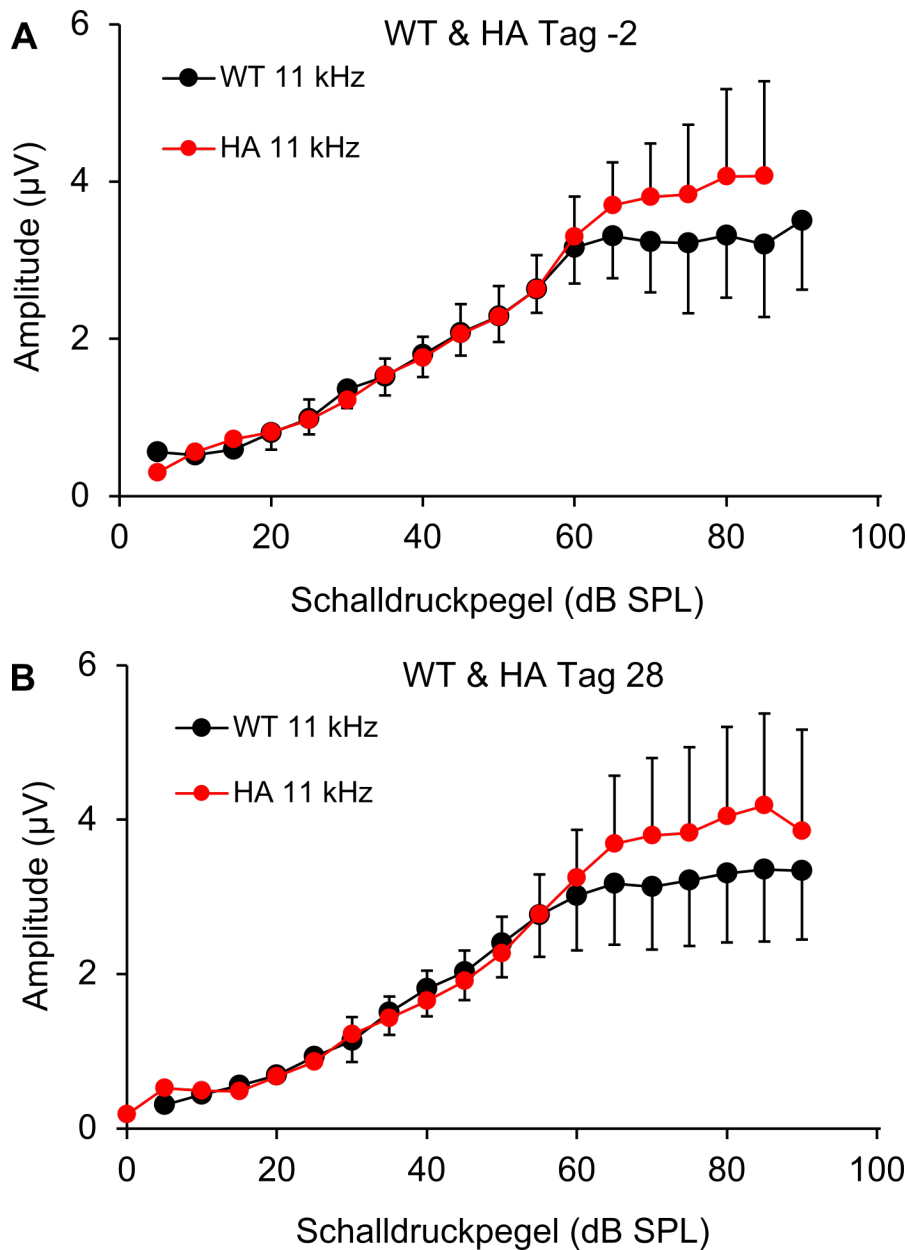
In der Tabelle 6 werden nochmals die signifikanten Unterschiede der oberen Abbildungen 26 präsentiert.

**Tabelle 6. Statistische Analyse der Amplituden der ABR-Welle I vor und 28 Tage nach Vertäubung für WT- und HA-Mäuse**

Für ausgewählte Frequenzen (11 kHz bzw. 22 kHz) wurden die Amplituden der ABR-Welle I zwischen Tag -2 und Tag 28 mit dem U-Test jeweils für beide Genotypen analysiert. Bei dem Zeichen „-“ konnte aufgrund nicht mehr messbarer Amplituden nach Vertäubung kein U-Test durchgeführt werden.

Schalldruckpegel (dB SPL)	Signifikanzniveau $p \leq$			
	WT 11 kHz	WT 22 kHz	HA 11 kHz	HA 22 kHz
15	-	-	-	-
20	n.s.	-	-	-
25	n.s.	-	n.s.	-
30	0,05	-	n.s.	-
35	n.s.	-	n.s.	-
40	n.s.	-	n.s.	-
45	n.s.	-	n.s.	-
50	n.s.	-	n.s.	n.s.
55	n.s.	0,005	n.s.	n.s.
60	n.s.	ns	n.s.	n.s.
65	n.s.	0,05	n.s.	0,05
70	n.s.	0,05	n.s.	n.s.
75	n.s.	0,05	n.s.	n.s.
80	n.s.	0,05	n.s.	n.s.
85	-	n.s.	-	n.s.
90	-	n.s.	-	n.s.
95	-	n.s.	-	n.s.
100	-	n.s.	-	n.s.

In den Abbildungen 27 und 28 werden die Amplituden der ABR-Welle I für jeweils eine der Frequenzen (11 kHz, 22 kHz) für beide Mauslinien kombiniert dargestellt, und zwar für Tag -2 (Abb. 27A, 28A) und Tag 28 (Abb. 27B, 28B).

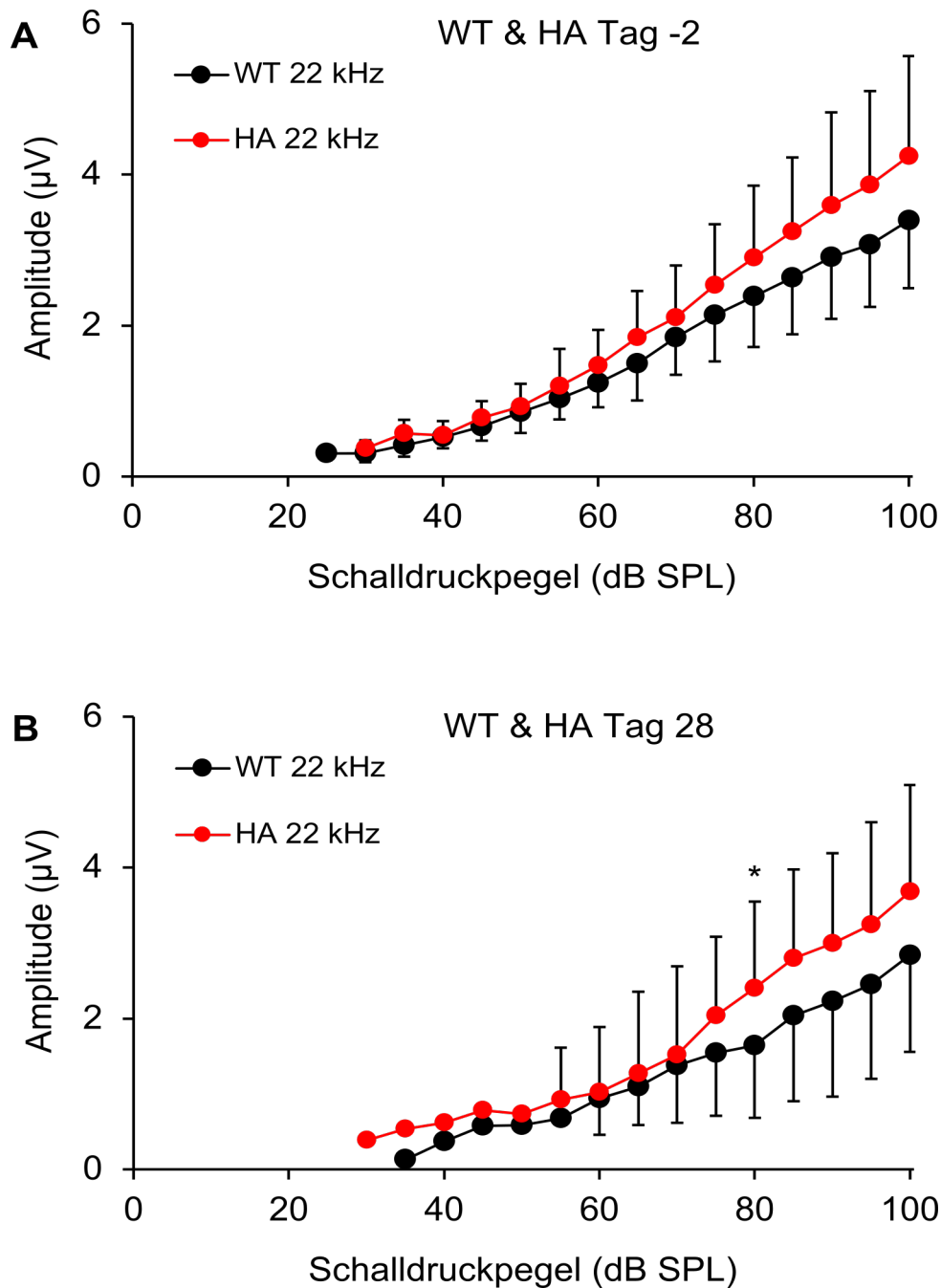


**Abbildung 27. Vergleich der mittleren Amplituden der ABR-Welle I von WT- und HA-Mäusen bei 11 kHz**

Vergleich der mittleren Amplitude  $\pm$  SD bei WT-Mäusen und HA-Mäusen an Tag -2 (A) und an Tag 28 (B) bei 11 kHz. Es gab zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Aus Abbildung 27 geht hervor, dass die durchschnittliche Amplitude der ABR-Welle I für beide Genotypen bei 11 kHz ab etwa 60 dB SPL nicht mehr anstieg, sondern sich auf ein Niveau von ca. 3,5 - 4,5  $\mu\text{V}$  einpendelte. Bis zum Schalldruckpegel von 55 dB SPL war der Unterschied zwischen den durchschnittlichen Amplituden in beiden Gruppen sehr gering ( $< 0,2 \mu\text{V}$ ). Je höher der Pegel anstieg, desto größer war die Tendenz größerer Amplituden der HA-Tiere

gegenüber den WT-Tieren, wobei es keine signifikanten Unterschiede gab. Dies lag wahrscheinlich an der hohen Standardabweichung der Daten bei einer zu geringen Anzahl gemessener Ohren.



**Abbildung 28. Vergleich der mittleren Amplituden der ABR-Welle I bei WT- und HA-Mäusen bei 22 kHz**

Vergleich der mittleren Amplitude  $\pm$  SD bei WT-Mäusen und HA-Mäusen an Tag -2 (A) und an Tag 28 (B) bei 22 kHz. Es gab zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Abbildung 28 liefert Informationen zu den Wachstumsfunktionen wie in Abb. 27, aber für die Frequenz 22 kHz. Aus Abbildung 28 geht hervor, dass die mittleren Amplituden bei 22 kHz im Vergleich zu den mittleren Amplituden bei 11 kHz (Abbildung 27) am Tag -2 und am Tag 28 mit steigendem Pegel weiter anstiegen. Auch hier gab es an beiden Tagen eine Tendenz größerer mittlerer Amplituden der HA-Tiere ab ca. 70 dB SPL, es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Entgegen den Erwartungen einer größeren Vulnerabilität der HA-Tiere gegenüber dem Schalltrauma lässt sich also auch bezüglich der Amplitude der ABR-Welle I die Aussage treffen, dass die HA-Tiere nicht stärker als die WT-Tiere von einer Abnahme betroffen waren.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass

- WT- und HA-Tiere im Alter von 12 Wochen keine relevant unterschiedlichen Klick- oder frequenzspezifischen Hörschwellen besaßen
- ein Trauma von 100 dB SPL, 8 – 16 kHz für 2 h eine TTS bei WT- und HA-Tieren erzeugte
- die Trauma-bedingte akute Schwellenverschiebung bei HA-Tieren größer als bei WT-Tieren war
- die Regeneration innerhalb von 4 Wochen bei HA-Tieren etwas besser verlief als bei WT-Tieren
- vier Wochen nach diesem Trauma eine größere PTS im Hochtonbereich bei WT-Mäusen (bei 22, 32 und 45 kHz) und in geringerem Maße bei HA-Mäusen (bei 32 kHz und 45 kHz) vorlag
- die ABR-Welle I bei 22 kHz bei WT-Tieren am Tag 28 gegenüber Tag -2 signifikant abnahm, ein Zeichen für den versteckten Hörverlust bzw. die cochleäre Synaptopathie
- die Hypothese, dass die HA-Tiere aufgrund des höheren  $Ca^{2+}$ -Einstroms in die IHZ einen stärkeren Traumaschaden erleiden müssten, nicht zutrifft. Im Gegenteil, die HA-Tiere wurden durch das Trauma in Bezug auf PTS und ABR-Amplitudenreduktion weniger beeinträchtigt.

In der Diskussion gehe ich auf die höhere Empfindlichkeit der C57BL/6N-WT-Mäuse auf das Liberman-Trauma ein. Desweiteren wird die Verlässlichkeit der Hörmessungen an unserer Anlage und die Datenauswertung durch verschiedene Untersucher betrachtet. Den Hauptteil nimmt die Diskussion der unerwarteten Auswirkungen des Schalltraumas auf die HA-Mäuse ein. Abschließend folgen Überlegungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen.

### 5.1 Höhere Empfindlichkeit der Hörschwellen der C57BL/6N-WT-Mäuse auf das Liberman-Trauma

In dieser Arbeit wurden die Methoden der ABR-Messung und der Vertäubung erstmals in unserem Labor etabliert. Dazu wurden vier C57BL/6N-Mäuse verwendet, von denen am Tag 28

Hörschwellen von nur drei Tiere ausgewertet werden konnten. Der Vergleich der Hörschwellen 4 Wochen nach Trauma bzw. mit den Ergebnissen der Publikation von (Kujawa & Liberman, 2009), zeigt, dass es ähnliche Trauma-bedingte TTS gab, jedoch bei unseren WT-Mäusen gegenüber Tag -2 bei 32 kHz und 45 kHz eine PTS zu finden war (Abb. 15). Das könnte wegen der sehr kleinen und genetisch ähnlichen Etablierungsgruppe Zufall sein (alle Tiere kamen aus demselben Wurf). Betrachtet man die Hörschwellenänderung der WT-Tiere der größeren Versuchsgruppe 4 Wochen nach Trauma (Abb. 22B) gegenüber Tag -2, ergibt sich auch hier eine PTS, und zwar bei 22,6 und 32 kHz. Diese Tiere waren jedoch mit  $16,4 \pm 0,7$  Wochen älter als die Tiere der Etablierungsgruppe ( $9,8 \pm 0$  Wochen).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass das Liberman-Trauma bei unserer Mauslinie und an unserer Messanlage nicht nur eine TTS, sondern im Hochfrequenzbereich (variabel zwischen 22,6 und 45 kHz) auch eine PTS bewirkt, so dass unsere Tiere in diesem Bereich einen sichtbaren (und nicht nur versteckten) Hörverlust erlitten. Die naheliegendste Erklärung ist ein funktioneller Schaden der ÄHZ im Hochfrequenzbereich (Kujawa & Liberman, 2019), was in zukünftigen Experimenten durch Messung von DPOAEs untersucht werden könnte. Es wurde vor kurzem systematisch untersucht, wie verschiedene Mauslinien auf Lärmbelastung reagieren, selbst wenn identische Studienparameter verwendet wurden (Early et al., 2022; Lavinsky et al., 2021). Bei einer Bestimmung der Amplituden der ABR-Welle I von 69 Inzucht-Mauslinien zwei Wochen nach einem Trauma von 2 - 10 kHz bei 108 dB SPL für 2 h zeigte sich eine große Heterogenität der Schalltraumafolgen. Die Autoren teilten daraufhin die Linien in empfindliche und robuste Linien ein. Bedauerlicherweise wurden die CBA/CaJ-Mäuse (Kujawa & Liberman, 2009) und unsere Linie C57BL/6N nicht in die Studie eingeschlossen. Für die Linie C57BL/J wurde eine mittlere Empfindlichkeit ermittelt.

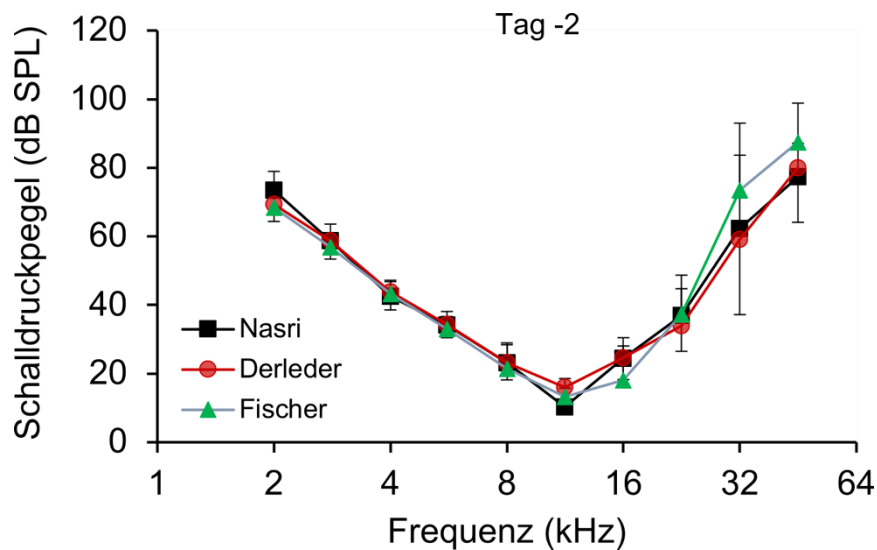
Um bei unserer Linie C57BL/6N Schalltrauma-induzierte Effekte von möglichen Folgen der frühzeitig einsetzenden Altersschwerhörigkeit im Hochfrequenzbereich (Kane et al., 2012; Mianné et al., 2016) zu trennen, wurden deshalb bei späteren Versuchsprojekten der Arbeitsgruppe die Tiere bereits im Alter von 8 Wochen in den Versuch genommen und grundsätzlich mit einer Kontrollgruppe gleicher Individuenzahl und gleichen Alters verglichen. Diese Kontrollgruppe erhält keine Vertäubung, sondern nur ABR-Messungen am Tag -2 und am Tag 28. Das jüngere Alter der Tiere bei Ende des Versuchs (ca. 3 Monate) ermöglichte auch die erfolgreiche Präparation aller Abschnitte der Cochlea für die immunhistochemische Analyse der Prä- und Postsynapsen durch Philipp Schätzle (Follow-up Dissertation) bzw. Kerstin Blum. Die Cochleae der WT- und HA-Tiere aus der vorliegenden Arbeit waren nach Abschluss der



Hörmessungen mit 4 Monaten leider zu stark verknöchert, um verlässlich präpariert und analysiert zu werden. Eine Aussage zur Synaptopathie im Hochfrequenzbereich war daher nicht möglich.

## 5.2 Vergleich der Hörmessdaten mit denen anderer Untersucher an derselben Messanlage

Nach der Durchführung und Beendigung meiner Versuche wurden ABR-Messungen von zwei Doktoranden an WT-Tieren an Tag -2 vor Vertäubung mit anderen Schalltraumata durchgeführt (Abb. 29). Es ist zu beachten, dass die Tiere von Philip Derleder und Philipp Fischer ca. 4 Wochen jünger als meine Versuchstiere waren. Die mittleren Hörschwellen lagen bis 8 kHz sehr nah beieinander. Oberhalb von 8 kHz gab es etwas größere Abweichungen zwischen den Gruppen, die jedoch bei keiner Frequenz signifikant unterschiedlich waren. Interessanterweise wichen die Mittelwerte der Gruppe von Philipp Fischer bei 32 kHz und bei 45 kHz nach oben ab, obwohl die Tiere jünger waren als die von mir gemessenen. Daraus kann man schließen, dass über den Zeitraum von 4 Wochen keine Altersschwerhörigkeit im hochfrequenten Bereich bei meinen Tieren auftrat.



**Abbildung 29. Vergleich der mittleren Audiogramme mit anderen Audiogrammen**

Mittlere Audiogramme +/- SD der von mir gemessenen WT-Mäuse an Tag -2 im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen von Philipp Fischer und Philip Derleder an Tag -2. Mittleres Alter der Mäuse: Nasri, 84 Tage; Derleder, 54 Tage; Fischer, 51 Tage; alle anderen Bedingungen (Messanlage, Messprotokoll, Narkose) waren konstant. Anzahl der Ohren: Nasri, n = 16; Derleder, n = 40; Fischer, n = 19. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Abb. 29 zeigt, dass die Daten, die von verschiedenen Untersuchern zu verschiedenen Zeitpunkten an unserer Hörmessanlage gemessenen und ausgewertet wurden, gut übereinstimmen. Alle Standardabweichungen der Messwerte überlappen sich und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messtagen. Für die kleinen Unterschiede zwischen den Daten kann es verschiedene Ursachen geben, u.a. die biologische Variabilität der Tiere in den Gruppen. Eine Ursache kann jedoch ausgeschlossen werden, nämlich eine individuell andere Beurteilung der Hörschwelle, denn eine zufällige Auswertung der Messdaten anderer Forscher ergab keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Die größten Abweichungen traten bei höheren Frequenzen auf, betrug jedoch fast immer nur 5 dB. Um das Risiko der Durchführung unterschiedlicher Bewertungen vollständig auszuschließen, sollten alle Prüfer alle Daten in den folgenden ähnlichen Arten von Experimenten verblindet auswerten.

Ein anderer Grund für Unterschiede könnte auch die minimale Variation der Stichposition der Elektroden bei den Versuchstieren sein (z. B. unterscheiden sich die Positionen der Ohrelektroden der linken und rechten Hand geringfügig). Außerdem könnten auch die Lage und die Einstellung des Mikrophons während der Messung ein Grund für die Variabilität von Messwerten sein.

### **5.3 Amplituden der ABR-Welle I zeigen geringeren verdeckten Hörverlust bei HA-Tieren**

Die Amplitude der ABR-Welle I gilt als Biomarker einer Schwerhörigkeit, bei der Typ I-Afferenzen deutlich vermindert sind und somit das elektrische Signal des Hörnerven bei Schallanregung kleiner ist. Diese Art von Hörverlust kann ohne Änderung der Hörschwelle beim *hidden hearing loss* (NIHHL) oder bei einer sensorineuralen Lärm- oder Altersschwerhörigkeit mit Schwellenerhöhung auftreten (Furman et al., 2013; Kujawa & Liberman, 2009; Schaette & McAlpine, 2011). Die ultrastrukturellen Ursachen sind ein Verlust gepaarter Synapsen zwischen IHZ und den Afferenzen Typ I und schließlich auch eine Abnahme der SGN, was wegen der starken Verknöcherung der Cochlea im vom Schalltrauma betroffenen Hochfrequenzbereich nicht untersucht werden konnte.

Die Amplitude der ABR-Welle I bei der 11-kHz-Frequenz nahm nach dem Trauma sowohl für WT- als auch für HA-Tiere (Abb. 26) nicht ab. Daher lag für diese Frequenz keine (funktionelle) Synaptopathie vor. Bei der höheren Frequenz von 22 kHz waren die mittleren Amplituden bei mittleren und höheren Schalldruckpegeln nach Trauma tendenziell reduziert, wobei es in der WT-Gruppe bei fünf Pegeln eine signifikante Abnahme gab, in der HA-Gruppe jedoch nur bei

einem. Diese Ergebnisse zeigen einen deutlichen verdeckten Hörverlust bzw. cochleäre Synaptopathie bei 22 kHz beim WT im Vergleich zu einem schwachen bei den HA-Tieren. Die Unterschiede in den Amplituden vor und nach Trauma wären bei höheren Frequenzen (32 – 45,2 kHz) vermutlich größer ausgefallen, jedoch wird ein statistischer Vergleich durch die dort erhöhten Hörschwellen und die geringe Anzahl verwertbarer Datenpunkte erschwert.

Die Hypothese, dass die HA-Tiere durch das Trauma einen stärkeren Schaden erleiden und somit eine stärkere PTS (Abb. 20, 22) und eine stärkere Abnahme der Amplituden der Welle I als die WT-Tiere zeigen (Abb. 26), muss daher verworfen werden.

#### **5.4 Paradoxe Auswirkungen des Schalltraumas auf die HA-Mäuse**

HA-Mäuse haben normale f-ABR-Hörschwellen im Alter von 5 Wochen (Scharinger et al., 2015) und 3 Monaten (Abb. 18), obwohl ihre  $Ca_v1.3$ -Kanäle in IHZ 30 % höhere  $Ca^{2+}$ -Ströme leiten als bei den WT-Tieren. Die elektrischen Antworten von extrazellulär abgeleiteten SGN-Fasern der HA-Mäuse sind ebenfalls normal (Ohn et al., 2016). Es scheint, als ob sich die IHZ von HA-Mäusen an die höheren  $Ca^{2+}$ -Ströme in die IHZ angepasst haben, z.B. durch die erhöhte Produktion von  $Ca^{2+}$ -puffernden Proteinen wie dem  $Ca^{2+}$ -bindenden Protein 2 (CBP2), das in IHZ konzentriert vorkommt (Picher et al., 2017). Ein weiterer Anpassungsmechanismus könnte das verstärkte Vorhandensein der  $Ca^{2+}$ -ATPase PMCA1 sein, die  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem basolateralen Teil der IHZ herauspumpt (Fettiplace & Nam, 2019). Bei den HA-Mäusen müssten solche Anpassungen bis zum Alter von mindestens 3 Monaten funktionieren, da gegenüber dem WT keine Hörschwellerhöhung zu beobachten war (Abb. 18). Die Amplituden der ABR-Welle I bei 11,3 kHz und bei 22,6 kHz waren in diesem Alter ebenfalls normal und tendenziell sogar etwas größer als beim WT (Abb. 27, 28).

Die Hypothese, dass das Schalltrauma bei den HA-Tieren durch den erhöhten  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die IHZ einen größeren Schaden verursacht, und der permanente Schaden nach Schalltrauma größer sein müsste als bei WT-Tieren, hat sich nicht bestätigt. Nur am Tag 0 direkt nach dem Trauma gab es im tieffrequenten Bereich einen minimal größeren Hörschwellerhöhung (TTS) bei den HA-Tieren als bei den WT-Tieren (Abb. 19). Die Regeneration der Hörschwellen verlief jedoch bei den HA-Tieren besser als bei den WT-Tieren (Abb. 22B, Abb. 23), und die Amplituden der ABR-Welle I waren weniger betroffen (s.o.).

Eine neue Studie zu den zellspezifischen Änderungen des Transkriptionsprofils nach Schalltrauma zeigt die Vielzahl und die Komplexität der Veränderungen der Genexpression in der Cochlea (Milon et al., 2021). Neben einer basalen stärkeren Expression von  $Ca^{2+}$ -bindenden

Proteinen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen könnten auch andere  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse dafür sorgen, dass in IHZ der HA-Mäuse die Traumaschäden sehr gut repariert werden können. Erhöhungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnten über  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Bindung an CaMKinase II die Transkription verschiedener Gene ändern und Signalkaskaden effizienter aktivieren, die zu besserer Reparatur führen (Galdieri et al., 2023; Puri, 2020). IHZ exprimieren die CaMKinase II-delta (Meese et al., 2017). Die aktivierte, phosphorylierte Form des Enzyms reduziert die Aktivität von Otoferlin, einem zentralen Protein der Exozytosemaschinerie der IHZ, und könnte so an einem präsynaptischen Adaptationsmechanismus bei zu hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die IHZ beteiligt sein (Meese et al., 2017).

Eine erhöhte Glutamatfreisetzung von IHZ der HA-Mäuse würde aufgrund einer gewissen  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität der Glutamat-Rezeptoren der afferenten Boutons der SGN (Lozier et al., 2023; Rutherford et al., 2023) auch zu einer gegenüber dem WT erhöhten postsynaptischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen. Bei nicht zu stark erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den afferenten Boutons der HA-Tiere könnten ähnliche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transkriptionsänderungen verschiedener Gene stattfinden, die zu besserer Reparatur führen, wie oben für die IHZ beschrieben (Galdieri et al., 2023; Puri, 2020). Die SGN Typ Ia-Neurone exprimieren nach Lärmexposition besonders stark die mRNAs von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen ATF3/ATF4-Signalkaskaden, die die zelluläre Reparatur und das Überleben fördern (Milon et al., 2021).

Zusammengefasst könnten konstitutive oder durch das 100 dB SPL-Trauma hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adaptationsprozesse in den Haarzellen oder den SGN-Typ I von HA-Mäusen der Grund für den geringeren Schaden vier Wochen nach Trauma in Bezug auf die PTS und die geringere Abnahme der ABR-Welle I sein.

## 5.5 Übertragbarkeit auf den Menschen

Die hohe Prävalenz von Lärm-induziertem Hörverlust und Altersschwerhörigkeit beim Menschen (Natarajan et al., 2023) erfordert weitere Forschung, um Diagnostik, Therapie und Prävention zu verbessern. Auch wenn die Diskussion um die Existenz des versteckten Hörverlusts beim Menschen kontrovers geführt wird, mehren sich die Anzeichen, dass dieses Phänomen auch beim Menschen existiert (Bramhall et al., 2019; Kujawa & Liberman, 2019; Schaette & McAlpine, 2011). Studien an mit dem Menschen näher verwandten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zeigten, dass der versteckte Hörverlust und ein irreversibler Synapsenverlust bei diesen Tieren auftritt, jedoch höhere Lautstärken der Vertäubung als bei Mäusen benötigt (Valero et al., 2017). Um Mechanismen von Hörverlust zu identifizieren, sind weiterhin Studien an Modellorganismen, v.a. an genetisch modifizierten Mäusen, notwendig. Für den  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanal

wurden beim Menschen z.B. Mutationen gefunden, die mit einer Kanal-Überfunktion, ähnlich wie bei der hier untersuchten HA-Mutation bei der Maus, einhergehen (Ortner et al., 2020). In einem weiteren Schritt muss dann die Übertragbarkeit der Erkenntnisse an Mäusen auf den Menschen untersucht werden (Cousins, 2022; Early et al., 2022; Ohlemiller, 2006).

## 6 Literaturverzeichnis

1. Baig, S. M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M. J., Brandt, N., Engel, J., Mangoni, M. E., Farooq, M., Khan, H. U., Nürnberg, P., Striessnig, J., & Bolz, H. J. (2011). Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature Neuroscience*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nn.2694>
2. Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., & Wischmeyer, E. (2017). *Physiologie Duale Reihe* (3. Aufl.). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-004-132217>
3. Ben-Johny, M., Yang, P. S., Niu, J., Yang, W., Joshi-Mukherjee, R., & Yue, D. T. (2014). Conservation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulation across Na and Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*, *157*(7), 1657–1670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.035>
4. Boenninghaus, H.-G., & Lenarz, T. (2007). *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: Jetzt neu mit Fallquiz* (13. Aufl.). Springer.
5. Bramhall, N., Beach, E. F., Epp, B., Le Prell, C. G., Lopez-Poveda, E. A., Plack, C. J., Schaette, R., Verhulst, S., & Canlon, B. (2019). The search for noise-induced cochlear synaptopathy in humans: Mission impossible? *Hearing Research*, *377*, 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.02.016>
6. Buettner, U. W. (2005). Akustisch evozierte Potenziale (AEP). In *Evozierte Potenziale* (S. 369–431). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-26659-3\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-26659-3_4)
7. Butler, B. E., & Lomber, S. G. (2013). Functional and structural changes throughout the auditory system following congenital and early-onset deafness: Implications for hearing restoration. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *7*, 92. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00092>
8. Capri, K. M., Maroni, M. J., Deane, H. V., Concepcion, H. A., DeCoursey, H., Logan, R. W., & Seggio, J. A. (2019). Male C57BL6/N and C57BL6/J Mice Respond Differently to Constant Light and Running-Wheel Access. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*, 268. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00268>
9. Catterall, W. A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>
10. Cousins, R. (2022). Hearing loss drug discovery and medicinal chemistry: Current status, challenges, and opportunities. In *Progress in Medicinal Chemistry* (Bd. 61, S. 1–

- 91). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2022.05.001>
11. Early, S., Du, E., Boussaty, E., & Friedman, R. (2022). Genetics of noise-induced hearing loss in the mouse model. *Hearing Research*, 425, 108505. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2022.108505>
12. Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Comprehensive Physiology*, 7(4), 1197–1227. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>
13. Fettiplace, R., & Nam, J.-H. (2019). Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells. *Hearing Research*, 376, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.002>
14. Furman, A. C., Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2013). Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *Journal of Neurophysiology*, 110(3), 577–586. <https://doi.org/10.1152/jn.00164.2013>
15. Galdieri, J., Adams, C., Padilla, M., & Stawicki, T. M. (2023). The role of calcium, Akt and ERK signaling in cadmium-induced hair cell death. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 124, 103815. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2023.103815>
16. Huppelsberg, J., & Walter, K. (Hrsg.). (2009). *Kurzlehrbuch Physiologie: 42 Tabellen* (3., überarb. Aufl.). Thieme.
17. Kane, K. L., Longo-Guess, C. M., Gagnon, L. H., Ding, D., Salvi, R. J., & Johnson, K. R. (2012). Genetic background effects on age-related hearing loss associated with *Cdh23* variants in mice. *Hearing Research*, 283(1), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.11.007>
18. Klugbauer, N., Welling, A., Specht, V., Seisenberger, C., & Hofmann, F. (2002). L-type Ca<sup>2+</sup> channels of the embryonic mouse heart. *European Journal of Pharmacology*, 447(2), 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01850-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01850-2)
19. Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2009). Adding Insult to Injury: Cochlear Nerve Degeneration after „Temporary“ Noise-Induced Hearing Loss. *Journal of Neuroscience*, 29(45), 14077–14085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009>
20. Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2019). Translating animal models to human therapeutics in noise-induced and age-related hearing loss. *Hearing Research*, 377, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.03.003>
21. *Kujawa und Liberman—2009—Adding Insult to Injury Cochlear Nerve Degenerati.pdf*. (o. J.).
22. Lavinsky, J., Mendonça, A., Bressan, M., da Silva, V. A. R., Kasperbauer, G., Wang, J., Salehi, P., Boussaty, E. C., & Friedman, R. A. (2021). Large-scale phenotyping of ABR P1-N1 amplitudes before and after exposure to noise in 69 strains of mice.

- Mammalian Genome*, 32(6), 427–434. <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09913-0>
23. Lozier, N. R., Muscio, S., Pal, I., Cai, H.-M., & Rubio, M. E. (2023). Sex differences in glutamate AMPA receptor subunits mRNA with fast gating kinetics in the mouse cochlea. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 17, 1100505. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2023.1100505>
24. Maurer, K., Lang, N., & Eckert, J. (2005). *Praxis der evozierten Potentiale: SEP, AEP, MEP, VEP; mit 60 Tabellen* (2., überarb. Aufl). Steinkopff.
25. McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>
26. Meese, S., Cepeda, A. P., Gahlen, F., Adams, C. M., Ficner, R., Ricci, A. J., Heller, S., Reisinger, E., & Herget, M. (2017). Activity-Dependent Phosphorylation by CaMKII $\delta$  Alters the Ca<sup>2+</sup> Affinity of the Multi-C2-Domain Protein Otoferlin. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2017.00013>
27. Mekada, K., & Yoshiki, A. (2021). Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Experimental Animals*, 70(2), 145–160. <https://doi.org/10.1538/expanim.20-0158>
28. Meyer, A. C., & Moser, T. (2010). Structure and function of cochlear afferent innervation. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 18(5), 441–446. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e328333e0586>
29. Mianné, J., Chessum, L., Kumar, S., Aguilar, C., Codner, G., Hutchison, M., Parker, A., Mallon, A.-M., Wells, S., Simon, M. M., Teboul, L., Brown, S. D. M., & Bowl, M. R. (2016). Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair. *Genome Medicine*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0273-4>
30. Milon, B., Shulman, E. D., So, K. S., Cederroth, C. R., Lipford, E. L., Sperber, M., Sellon, J. B., Sarlus, H., Pregernig, G., Shuster, B., Song, Y., Mitra, S., Orvis, J., Margulies, Z., Ogawa, Y., Shults, C., Depireux, D. A., Palermo, A. T., Canlon, B., ... Hertzano, R. (2021). A cell-type-specific atlas of the inner ear transcriptional response to acoustic trauma. *Cell Reports*, 36(13), 109758. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109758>
31. Møller, A. R., Jho, H. D., Yokota, M., & Jannetta, P. J. (1995). Contribution from crossed and uncrossed brainstem structures to the brainstem auditory evoked potentials: A study in humans. *The Laryngoscope*, 105(6), 596–605. <https://doi.org/10.1288/00005537-199506000-00007>
32. Moser, T., & Starr, A. (2016). Auditory neuropathy—Neural and synaptic mechanisms. *Nature Reviews Neurology*, 12(3), 135–149. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.10>



33. Natarajan, N., Batts, S., & Stankovic, K. M. (2023). Noise-Induced Hearing Loss. *Journal of Clinical Medicine*, 12(6), 2347. <https://doi.org/10.3390/jcm12062347>
34. Ohlemiller, K. K. (2006). Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Research*, 1091(1), 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.017>
35. Ohn, T.-L., Rutherford, M. A., Jing, Z., Jung, S., Duque-Afonso, C. J., Hoch, G., Picher, M. M., Scharinger, A., Strenzke, N., & Moser, T. (2016). Hair cells use active zones with different voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> influx to decompose sounds into complementary neural codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(32), E4716–E4725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605737113>
36. Ortner, N. J., Kaserer, T., Copeland, J. N., & Striessnig, J. (2020). De novo CACNA1D Ca<sup>2+</sup> channelopathies: Clinical phenotypes and molecular mechanism. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 472(7), 755–773. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02418-w>
37. Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. (Hrsg.). (2014). *Physiologie* (7. Aufl.). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-98019>
38. Perkins, R. E., & Morest, D. K. (1975). A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *The Journal of Comparative Neurology*, 163(2), 129–158. <https://doi.org/10.1002/cne.901630202>
39. Picher, M. M., Gehrt, A., Meese, S., Ivanovic, A., Predoehl, F., Jung, S., Schrauwen, I., Dragonetti, A. G., Colombo, R., Van Camp, G., Strenzke, N., & Moser, T. (2017). Ca<sup>2+</sup>-binding protein 2 inhibits Ca<sup>2+</sup>-channel inactivation in mouse inner hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), E1717–E1726. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617533114>
40. Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., & Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell*, 102(1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00013-1)
41. Puri, B. K. (2020). Calcium Signaling and Gene Expression. In Md. S. Islam (Hrsg.), *Calcium Signaling* (S. 537–545). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_22)
42. Rutherford, M. A. (2015). Resolving the structure of inner ear ribbon synapses with STED microscopy. *Synapse*, 69(5), 242–255. <https://doi.org/10.1002/syn.21812>
43. Rutherford, M. A., Bhattacharyya, A., Xiao, M., Cai, H.-M., Pal, I., & Rubio, M. E. (2023). GluA3 subunits are required for appropriate assembly of AMPAR GluA2 and GluA4

- subunits on cochlear afferent synapses and for presynaptic ribbon modiolar-pillar morphology. *ELife*, 12, e80950. <https://doi.org/10.7554/eLife.80950>
44. Schaette, R., & McAlpine, D. (2011). Tinnitus with a normal audiogram: Physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(38), 13452–13457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2156-11.2011>
45. Scharinger, A., Eckrich, S., Vandael, D. H., Schönig, K., Koschak, A., Hecker, D., Kaur, G., Lee, A., Sah, A., Bartsch, D., Benedetti, B., Lieb, A., Schick, B., Singewald, N., Sinnegger-Brauns, M. J., Carbone, E., Engel, J., & Striessnig, J. (2015). Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>-channels by a C-terminal automodulatory domain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00309>
46. Scharinger A, Kuhn S, Schönig K, Sah A, Singewald N, Lee A, Gebhart M, Bartsch D, Koschak A, Sinnegger-Brauns M, Engel J, Striessnig J (2013) In vivo tagging of Cav1.3 L-type calcium channels reveals C-terminal modulation of gating properties in cochlear inner hair cells. Poster Abstract 35.17/E18, Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013
47. Scharinger et al. - 2015—Cell-type-specific tuning of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>-channels .pdf. (o. J.).
48. Schmidt, R. F. (2013). *Physiologie kompakt*. Springer-Verlag.
49. Singh, A., Gebhart, M., Fritsch, R., Sinnegger-Brauns, M. J., Poggiani, C., Hoda, J.-C., Engel, J., Romanin, C., Striessnig, J., & Koschak, A. (2008). Modulation of Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent Gating of CaV1.3 L-type Calcium Channels by Alternative Splicing of a C-terminal Regulatory Domain \*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20733–20744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802254200>
50. Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 3(2), 15–38. <https://doi.org/10.1002/wmts.102>
51. Valero, M. D., Burton, J. A., Hauser, S. N., Hackett, T. A., Ramachandran, R., & Liberman, M. C. (2017). Noise-induced cochlear synaptopathy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hearing Research*, 353, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.07.003>
52. Wolff, R., Hommerich, J., Riemsma, R., Antes, G., Lange, S., & Kleijnen, J. (2010). Hearing screening in newborns: Systematic review of accuracy, effectiveness, and effects of interventions after screening. *Archives of Disease in Childhood*, 95(2), 130–135. <https://doi.org/10.1136/adc.2008.151092>

53. Zenner, H. P. (2010). Die Kommunikation des Menschen: Hören und Sprechen. In *Physiologie des Menschen* (S. 315–335). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01651-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01651-6_16)
54. Zheng, J., Shen, W., He, D. Z. Z., Long, K. B., Madison, L. D., & Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, *405*(6783), Article 6783. <https://doi.org/10.1038/35012009>
55. Zheng, Q. Y., Johnson, K. R., & Erway, L. C. (1999). Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing Research*, *130*(1–2), 94–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00003-9)

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Prof. Dr. Jutta Engel und PD. Dr. Simone Kurt für ihre kritischen wie hilfreichen Anregungen und die ständige Unterstützung während des gesamten Betreuungszeitraums. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank geht auch an die Mitglieder der AG Engel, die mich bei jedem Schritt und jederzeit mit Worten und Taten motivierten und meine Dissertation damit wesentlich mitprägten.

Ein herzlicher Dank gilt der Familie meines Onkels und Freunden, die für mich stets eine große Hilfe und in den schwierigen Zeiten eine Ersatzfamilie waren.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meiner Schwester und meinen Brüdern für den motivierenden, liebevollen Beistand.

Für die zwei Sterne, die mein Leben tags und nachts beleuchteten. Für die Sonne und den Mond, den Körper und die Seele, die Macht und die Liebe, die mir mein Studium durch ihre moralische Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten, meinen Eltern ist diese Arbeit gewidmet.

## 8 Publikation

Blum\* K, Schepsky P\*, **Nasri F**, Schätzle P, Derleder P, Fischer P, Engel J#, Kurt S#: Noise-induced cochlear synaptopathy in C57BL/6N mice as a function of trauma strength. Manuskript in Vorbereitung.

Blum K, Fischer P, **Nasri F**, Kurt S, Engel J. Effects of increased  $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{2+}$  currents in inner hair cells of  $\text{Ca}_v1.3\text{-DCRD}^{\text{HA/HA}}$  mice on hearing and synapses and consequences of an acoustic trauma. Manuskript in Vorbereitung.

Posterbeitrag:

**Nasri F.**, Blum K, Engel J, Kurt S: Accelerated recovery of ABR hearing thresholds after mild acoustic trauma in  $\text{Ca}_v1.3\text{-DCRD}^{\text{HA/HA}}$  mice. Posterbeitrag auf dem 13. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, 2019.

## **9 Lebenslauf**

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