



**Generierung und Evaluation von Mausmodellen für die auditorische  
Neuropathie**  
**Generation and evaluation of mouse models of auditory neuropathy**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

**Silke Frenz**

aus

**Berlin**

Würzburg **2018**



**Eingereicht am:** .....  
Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Sendtner**

**1. Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen**

**2. Betreuer: Prof. Dr. Georg Nagel**

**3. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sybille Jablonka**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

# Inhalt

<b>Inhalt</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>12</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1 Einführung	13
1.2 Genetische Defekte	13
1.3 Neurotrophine	14
1.4 <i>Cre/loxP</i>	16
1.5 Brn3.1	17
1.6 Auditorische Neuropathie	19
1.7 In vitro Kulturen	20
1.8 Zielsetzung	22
1.8.1 Elektrophysiologische Untersuchungen der verwendeten Mauslinien für Kreuzungsversuche und F1-Nachkommen jener Verkreuzungen	22
1.8.2 Expressionsverhalten von Cre Rekombinase unter dem Promotor Brn3.1	23
1.8.3 Evaluation des bestehenden Mausmodells pmn für den Einsatz zur Erforschung der auditorischen Neuropathie	23
1.8.4 Generierung einer gliazellfreien Kultur dissoziierter auditorischer Neurone für dosisabhängige Untersuchungen von Neurotrophinen im Rahmen einer AN-Therapie	24
<b>2 Material</b>	<b>25</b>
2.1 Technische Geräte	25
2.2 Labormaterialien	26
2.3 Primer zur Genotypisierung	27
2.4 Chemikalien	27
2.5 Anästhetika	29

2.6	Wachstumsfaktoren und Cytostatika	29
2.7	Enzyme	30
2.8	Antikörper	30
2.8.1	Erstantikörper	30
2.8.2	Zweitantikörper	30
2.9	Tierstämme	31
2.10	Selbsthergestellte Lösungen, Puffer und Medien	32
2.10.1	Zellkultur	32
2.10.2	Perfusion	32
2.10.3	Immuncytochemie und Immunhistochemie	32
2.10.4	Beschichtung von Zellkulturplättchen	34
2.10.5	Anästhetikum	34
2.11	Software	34
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	Genotypisierung	35
3.1.1	DNA-Extraktion	35
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und Gelelektrophorese	35
3.2	Elektrophysiologie	37
3.2.1	Narkose und Handling	37
3.2.2	Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen (DPOAE)	37
3.2.3	Hirnstammaudiometrie (BERA, brainstem evoked response audiometry)	38
3.3	Perfusionsfixierung	38
3.4	Einbettung und Anfertigung von Kryoschnitten	39
3.5	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten	39
3.6	Präparation und immunhistochemische Färbung von Wholemoutpräparaten des Corti'schen Organs	40
3.7	TUNEL-Assay zum Nachweis der Apoptose	41
3.8	Zellkultur	42

3.8.1	Anlegen einer Kultur dissoziierter auditorischer Neurone	42
3.8.2	Immunhistochemische Färbung von kultivierten auditorischen Neuronen	43
3.9	Auswertung und Statistik	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	Elektrophysiologische Untersuchungen der verwendeten Mauslinien für Kreuzungsversuche und F1-Nachkommen jener Verkreuzungen	46
4.1.1	Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels Hirnstammaudiometrie (BERA)	46
4.1.1.1	C57BL/6	46
4.1.1.2	Brn3.1 IRES Cre	47
4.1.1.3	R <sup>eYFP</sup>	47
4.1.1.4	R <sup>LacZ</sup>	48
4.1.1.5	Brn3.1 IRES Cre x R <sup>eYFP</sup>	49
4.1.1.6	Brn3.1 IRES Cre x R <sup>LacZ</sup>	49
4.1.2	Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen (DPOAE)	50
4.1.2.1	C57BL/6	51
4.1.2.2	Brn3.1 IRES Cre	51
4.1.2.3	R <sup>eYFP</sup>	51
4.1.2.4	R <sup>LacZ</sup>	51
4.1.2.5	Brn3.1 IRES Cre x R <sup>eYFP</sup>	52
4.1.2.6	Brn3.1 IRES Cre x R <sup>LacZ</sup>	52
4.2	Morphologischer Vergleich des Corti'schen Organes aller elektrophysiologisch untersuchten Linien	53
4.3	Expressionsverhalten von Cre Rekombinase unter dem Promotor Brn3.1	54
4.3.1	Expressionsverhalten von Brn3.1 Cre zu verschiedenen Zeitpunkten	54
4.3.2	Diskrepanz zwischen Genotypisierungsergebnissen und Expressionsverhalten	56
4.4	Evaluation des bestehenden Mausmodells pmn für den Einsatz zur Erforschung der auditorischen Neuropathie	58
4.4.1	Audiologische Evaluation der pmn Maus mittels Hirnstammaudiometrie (BERA)	58
4.4.2	Audiologische Evaluation der pmn-Maus mittels distorsiv produzierter otoakustischer Emissionen (DPOAE)	61

4.4.3	Morphologie des Corti'schen Organes der pmn-Maus	63
4.4.3.1	Quantitative Auswertung des Haarzellverlustes	63
4.4.3.2	TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Assay	64
4.4.4	TBCE-Nachweis im Corti'schen Organ	65
4.4.5	Gestörte $\beta$ -III Tubulin Immunreaktivität und reduzierte Mikrotubulinanzahl in zentralen Axonen der auditorischen Neurone von pmn-Mäusen	69
4.5	Generierung einer gliazellfreien Kultur dissoziierter auditorischer Neurone für dosisabhängige Untersuchungen von Neurotrophen	70
4.5.1	Medium	71
4.5.2	Beschichtung der Deckgläschen	73
4.5.3	Einsatz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und neurotrophen Faktoren	77
4.5.4	Einsatz des Zytostatikums AraC (Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid)	79
4.5.4.1	Dauer und Zeitraum der Applikation von AraC	79
4.5.4.2	Konzentration	83
4.5.5	Kombinierter Einsatz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC)	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
5.1	Die Insertion der IRES Cre Kasette in die 3' UTR des Brn3.1 Gens behinderte nicht die normale Hörentwicklung	89
5.2	Die Reporterlinien R <sup>eYFP</sup> und R <sup>LacZ</sup> zeigten normale Hörschwellen und eine unauffällige Morphologie des Innenohres	91
5.3	Mäuse, die sowohl transgen für Brn3.1 IRES Cre als auch R <sup>LacZ</sup> oder R <sup>eYFP</sup> sind, waren unauffällig in der Hirnstammaudiometrie und zeigten eine normale Morphologie des Innenohres	92
5.4	Nachweis der Expression von Cre Rekombinase unter dem Brn3.1 Promotor	93
5.5	Das Expressionsverhalten im Gewebe konnte nicht zuverlässig aufgrund von Genotypisierungsergebnissen aus Schwanzbiopsien vorhergesagt werden	95
5.6	Die pmn Maus zeigte sich als Modell für einen früh einsetzenden ausgeprägten Hörverlust	96
5.7	Apoptotische Degeneration der äußeren Haarzellen in der pmn-Maus	98
5.8	TBCE-Verteilung im Corti'schen Organ	100

5.9	Die Anzahl der Mikrotubuline in den Axonen des Hörnervs war in pmn- Mäusen signifikant reduziert	102
5.10	Auditorische Neurone zeigten eine Medienpräferenz beim Längenwachstum	103
5.11	Beschichtung mit Laminin wirkte sich positiv auf das Überleben von auditorischen Neuronen und deren Axonlänge aus	105
5.12	Das Längenwachstum von Axonen wurde durch Leukemia Inhibitory Factor (LIF) gefördert	108
5.13	Der Neuronenanteil einer Kultur dissoziierter auditorischer Neurone konnte durch Einsatz von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC) gesteigert werden	110
5.14	Kombinatorischer Einsatz der untersuchten Variablen führte zu gesteigertem Axonwachstum und einer Erhöhung des Neuronenanteils in der Kultur	114
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
8.1	<b>Abkürzungen</b>	123
8.2	<b>Literatur</b>	126
8.3	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	137
8.4	<b>Publikationsliste</b>	138
8.5	<b>Lebenslauf</b>	139
8.6	<b>Danksagungen</b>	140

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich des Corti'schen Organs Brn3.1-exprimierender Wildtypen (links, +/+) und Nullmutanten (rechts, -/-) zu P0 und P14.....	18
Abbildung 2: Nachweis von Brn3.1 mRNA im Corti'schen Organ zu E18, P14 und im adulten Tier und schematische Darstellung des Expressionsortes von POU4F3. ....	19
Abbildung 3: Hörschwellen der C57BL/6 Linie bei fünf Frequenzen. ....	46
Abbildung 4: Hörschwellen der Brn3.1 IRES Cre Linie bei fünf Frequenzen.....	47
Abbildung 5: Hörschwellen der R <sup>eYFP</sup> Linie bei fünf Frequenzen.....	48
Abbildung 6: Hörschwellen der R <sup>LacZ</sup> Linie bei fünf Frequenzen. ....	48
Abbildung 7: Hörschwellen der Brn3.1 IRES Cre x R <sup>eYFP</sup> Linie bei fünf Frequenzen.....	49
Abbildung 8: Hörschwellen der Brn3.1 IRES Cre x R <sup>LacZ</sup> Linie bei fünf Frequenzen. ....	50
Abbildung 9: Immunhistochemisch gefärbte Wholemoutpräparate des Corti'schen Organes aller elektrophysiologisch untersuchten Linien. ....	53
Abbildung 10: Expression von $\beta$ -Galactosidase in äußeren Haarzellen von Mäusen der F1-Generation der Verkreuzung Brn3.1 IRES Cre und R <sup>LacZ</sup> . ....	55
Abbildung 11: Auswertung der Cre Rekombinase Expression je äußerer Haarzellreihe.....	56
Abbildung 12: Ergebnisse von DNA-Genotypisierung und RNA RT-PCR desselben Wurfes zur Klärung geringer LacZ-Expression in Wholemoutpräparaten. ....	58
Abbildung 13: Hörschwellen von pmn- und WT-Mäusen im Alter von P21 bei fünf Frequenzen. ....	59
Abbildung 14: Hörschwellen von pmn- und WT-Mäusen im Alter von P28 bei fünf Frequenzen. ....	60
Abbildung 15: Hörschwellen von pmn- und WT-Mäusen im Alter von P35 bei fünf Frequenzen. ....	61



Abbildung 16: Vergleich von Wholemout-Präparationen des Corti'schen Organes der pmn-Maus zu den Zeitpunkten P21, P28 und P35 mit dem Wildtyp zum Zeitpunkt P35. ....	63
Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl äußerer Haarzellen pro 100 µm bei pmn-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur Wildtyp-Maus. ....	64
Abbildung 18: TUNEL-Assay an Wholemout-Präparaten des Corti'schen Organes von pmn- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt P35. ....	65
Abbildung 19: TBCE Nachweis im apikalen und basalen Teil des Corti'schen Organes bei pmn- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt P28. ....	66
Abbildung 20: TBCE Nachweis im Corti'schen Organ der pmn-Maus zum Zeitpunkt P28 im apikal-basalen Verlauf der Cochlea und Vergleich der TBCE-Verteilung zwischen pmn- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt P35. ....	68
Abbildung 21: Vergleich der Anzahl der auditorischen Neurone von WT- und pmn-Mäusen. ....	69
Abbildung 22: Vergleich der auditorischen Nervenfasern von WT- und pmn-Mäusen. ....	70
Abbildung 23: Vergleich der Anzahl der Mikrotubuli von WT- und pmn-Mäusen. ....	70
Abbildung 24: Mittlere Axonlänge bipolarer Neurone in µm auf in DMEM- bzw. NB-Medium gewachsenen Deckgläschen. ....	71
Abbildung 25: Mittlere Gesamtzellzahl auf in DMEM- bzw. NB-Medium gewachsenen Deckgläschen. ....	72
Abbildung 26: Anteil der Neurone in Prozent auf in DMEM- bzw. NB-Medium gewachsenen Deckgläschen. ....	73
Abbildung 27: Schemata der Deckgläschen in der Zellkulturschale mit den untersuchten Beschichtungsvarianten. ....	74
Abbildung 28: Mittlere Axonlänge bipolarer Neurone in µm auf mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin und Laminin beschichteten Deckgläschen. ....	74
Abbildung 29: Mittlere Gesamtzellzahl auf mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin und Laminin beschichteten Deckgläschen. ....	75

Abbildung 30: Anteil der Neurone in Prozent auf mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin und Laminin beschichteten Deckgläschen. ....	76
Abbildung 31: Reelle Anzahl von Neuronen bei verschiedenen Beschichtungsvarianten. ....	77
Abbildung 32: Mittlere Axonlänge in $\mu\text{m}$ in der Präsenz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) in der Konzentration 50 ng/ml. ....	78
Abbildung 33: Mittlere Gesamtzellzahl in der Präsenz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) in der Konzentration 50 ng/ml. ....	78
Abbildung 34: Anteil der Neurone in Prozent in der Präsenz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) in der Konzentration 50 ng/ml. ....	79
Abbildung 35: Schemata der Deckgläschen in der Zellkulturschale mit unterschiedlichen Applikationszeiträumen von AraC. ....	80
Abbildung 36: Mittlere Axonlänge in $\mu\text{m}$ bei drei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. ....	80
Abbildung 37: Gesamtzellzahl bei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. ....	81
Abbildung 38: Anteil der Neurone in Prozent bei drei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. ....	82
Abbildung 39: Reelle Anzahl von Neuronen bei drei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC). ....	83
Abbildung 40: Mittlere Axonlänge in $\mu\text{m}$ bei drei verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC). ....	84
Abbildung 41: Mittlere Gesamtzellzahl bei drei verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC). ....	84

Abbildung 42: Anteil der Neurone in Prozent bei drei verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC).....	85
Abbildung 43: Mittlere Axonlänge in $\mu\text{m}$ bei kombinierter Anwendung von Leukemia Inhibitory Factor und verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. ....	86
Abbildung 44: Gesamtzellzahl bei kombinierter Anwendung von Leukemia Inhibitory Factor und verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. ....	86
Abbildung 45: Anteil der Neurone in Prozent bei kombinierter Anwendung von Leukemia Inhibitory Factor und verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. ....	87
Abbildung 46: Brn3.1 Gen Lokus vor und nach Integration der IRES Cre Kasette. ....	90

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Hörschwellen der sechs verwendeten Linien bei fünf Frequenzen in dB SPL. ....	50
Tabelle 2: Auslöseschwellen für distorsiv produzierte otoakustische Emissionen in den sechs untersuchten Linien in dB SPL. ....	52
Tabelle 3: Auslöseschwellen von DPOAEs zum Zeitpunkt P21 in Wildtyp- und pmn-Mäusen. ...	62
Tabelle 4: Auslöseschwellen von DPOAEs zum Zeitpunkt P28 in Wildtyp- und pmn-Mäusen. ...	62
Tabelle 5: Auslöseschwellen von DPOAEs zum Zeitpunkt P35 in Wildtyp- und pmn-Mäusen. ...	62

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Die Schwerhörigkeit gehört zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen. Im Laufe ihres Lebens sind 60 % der Bevölkerung vorübergehend oder permanent von dieser Erkrankung betroffen [1]. Unterschieden wird dabei in eine sensorineurale Schwerhörigkeit und eine Schalleitungsschwerhörigkeit. Bei letzterer ist die Übertragung des Schalls vom äußeren Gehörgang zu den Sinneszellen im Innenohr gestört, meist durch eine Beeinträchtigung der Funktion der Gehörknöchelchen. Als sensorineurale Schwerhörigkeiten werden hingegen jene bezeichnet, bei denen die Sinneszellen des Innenohres und/oder dessen Neurone betroffen sind, da diese essentiell für die Schallwahrnehmung und Weiterleitung an das Gehirn sind. Deshalb werden sensorineurale Schwerhörigkeiten auch als Schallempfindungsschwerhörigkeiten bezeichnet. Ursachen für letztere sind mannigfaltig und können sowohl chronische Lärmeinwirkungen (z.B. im Beruf) [2], physiologische Alterungsprozesse (Altersschwerhörigkeit) [3], Hörsturz [4], Infektionen (CMV, Meningitits) [5] oder andere Erkrankungen (z.B. Akustikusneurinom) [6], bei denen sie als Symptom auftreten, umfassen.

## 1.2 Genetische Defekte

Ein weiterer Faktor für sensorineurale Schwerhörigkeit rückt in den letzten Jahren immer weiter in den Vordergrund: eine genetische Prädisposition. Bei genetisch bedingten Hörstörungen wird zwischen syndromalen und nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten unterschieden. Bei der syndromalen Form tritt die Schwerhörigkeit als Cosymptom auf, z.B. beim Usher-Syndrom [7], dem Waardenberg-Syndrom [8, 9] oder dem Pendred-Syndrom [10]. Nicht-syndromale Hörstörungen sind nicht mit weiteren Symptomen assoziiert und betreffen meist Gene, welche für Proteine kodieren, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Innenohres spielen. Dazu zählen unter anderem Strukturproteine (z.B. der Myosin-Familie [11, 12]) sowie Proteine, die im Ionentransport [13, 14], im interzellulärem Transport von Metaboliten [15] oder im Funktionserhalt der Cochlea [16] involviert sind. Hierbei betreffen Mutationen am häufigsten das *GJB2* Gen,

welches für das Protein Connexin26 codiert. Dieses Strukturprotein ist zur Bildung von Gap Junctions zwischen Zellen der Cochlea wichtig. Durch das Netzwerk der Gap Junctions zirkulieren die K<sup>+</sup>-Ionen, welche aus der Endolymphe durch die Haarzellen in den extrazellulären Raum gelangen, wieder in die Endolymphe zurück (K<sup>+</sup>-Homöostase) [17]. Die Störung des K<sup>+</sup>-Kreislaufes führt zu einer nicht-syndromalen Schwerhörigkeit. Dies war einer der ersten entdeckten Gendefekte, welcher zu solch einer nicht-syndromalen Schwerhörigkeit führt [18]. Mittlerweile ist bekannt, dass hierbei sowohl autosomal-dominante und -rezessive als auch X-chromosomale und mitochondriale Erbgänge auftreten, wobei die letzten beiden nur in unter 2 % der Fälle eine Rolle spielen. Vorrangig sind es autosomal-rezessive Erbgänge, welche bei nicht-syndromalen Hörstörungen auftreten.

In der Praxis ist die molekularbiologische Charakterisierung eines Hörschadens jedoch äußerst komplex. Genetische Faktoren spielen hierbei, wie bereits beschrieben, eine große Rolle, allerdings ist weder die Identifizierung des betroffenen Gens einfach noch basieren die Schwerhörigkeiten auf einem simplen „Ursache-Folge“-Prinzip. Viele verschiedene Gene sind in der Entwicklung des Hörorgans und der Erhaltung der Funktion involviert, allerdings ist deren Expression durchaus nicht nur auf cochleäre Strukturen beschränkt. Auch wenn weiter oben im Text zwischen syndromalen und nicht-syndromalen Erkrankungen unterschieden wurde, können durchaus dieselben Gene betroffen sein, z. B. kann eine Mutation in *USH1C* sowohl beim Usher-Syndrom vorkommen als auch bei einer nicht-syndromalen Schwerhörigkeit vom Typ DFNB18 [19, 20] und Mutationen im *MYO7A* Gen führen sowohl zu einem Usher-Syndrom Typ 1B als auch zu einer nicht-syndromalen rezessiven Schwerhörigkeit vom Typ DFNA11 [12]. Darüber hinaus können unterschiedliche Mutationen in demselben Gen zu verschiedenen Arten von Hörstörungen und deren Ausprägungen führen.

### 1.3 Neurotrophine

Neurotrophine sind körpereigene Signalstoffe, welche zur Bildung und Aufrechterhaltung von zielgerichteten neuronalen Verbindungen beitragen. Auch bewirken sie die Entwicklung und Aufrechterhaltung synaptischer Verbindungen. Das erste entdeckte Neurotrophin war der NGF (*nerve growth factor*, Nervenwachstumsfaktor) [21, 22], welcher

zusammen mit ähnlichen Substanzen während der frühen Entwicklung des Innenohres eine Rolle spielt [23, 24]. Weitere neurotrophe Faktoren sind BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) [25], NT-3 [26], NT-4 [27] und NT-5 [28], wobei die letzten beiden auf Grund ihrer ähnlichen Eigenschaften oft als NT-4/-5 zusammengefasst werden. Das Zielgewebe der Nervenverbindung sezerniert dabei die neurotrophen Faktoren [29].

Die Neurotrophine binden an membranständige Rezeptoren, von denen es zwei Typen gibt, die hochselektiven Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (TrkA, TrkB und TrkC) und den p75 Neurotrophinrezeptor (p75NTR) aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR). Jeder Rezeptor der Trk-Familie ist dabei selektiv für spezifische Neurotrophine: Trk A für NGF, Trk B für BDNF und NT-4/-5 und Trk C für NT-3. Der p75 Neurotrophinrezeptor bindet hingegen alle Mitglieder der Neurotrophinfamilie, jedoch nur mit geringer Affinität [30, 31]. Die Bindung von Neurotrophinen an den p75NTR bewirkt die Einleitung der Apoptose, den programmierten Zelltod der Zelle. Binden Neurotrophine hingegen an die Trk-Rezeptoren, wirkt die ausgelöste Kinase-Kaskade antiapoptotisch. Außerdem steuern sie die Expression anderer Proteine wie Ionenkanäle und Neurotransmitter, die für die Funktion des neuronalen Netzwerkes wichtig sind. Neurotrophine besitzen somit neuromodulatorische Eigenschaften. Es wird vermutet, dass ein Überschuss oder Mangel an BDNF in Zusammenhang mit einer Vielzahl an Erkrankungen stehen kann wie Depressionen [32, 33], Essstörungen [34], Demenz [35] und Schizophrenie [36].

Auch im Innenohr spielen Neurotrophine eine wichtige Rolle. Im Corti'schen Organ werden BDNF und NT-3 durch die inneren und äußeren Haarzellen sowie die Stützzellen synthetisiert und sorgen somit für ihren eigenen Erhalt [37]. Gleichfalls sind die auditorischen Neuronen des Ganglion spirale auf neurotrophische Unterstützung angewiesen [38, 39].

Neurotrophische Faktoren haben neben neuromodulatorischen Eigenschaften auch eine neuroprotektive Funktion [40], nicht nur im Innenohr, sondern auch in anderen Organen, da diese in vielen anderen Zelltypen ebenfalls exprimiert werden [41-43]. Mangelnde Expression von Neurotrophinen im Organismus kann zu schwerwiegenden Schädigungen oder sogar Letalität führen. Dies konnte durch Knockoutversuche bei Mäusen gezeigt werden, bei denen *BDNF* in sämtlichen Zellen ausgeknockt wurde. Diese

Tiere zeigten massive Entwicklungsdefizite im Gehirn und in sensorischen Neuronen und verstarben kurz nach der Geburt [44, 45].

#### 1.4 Cre/*loxP*

Lange Zeit wurden systemische Knockout-Modelle, wie das im vorhergehenden Abschnitt erwähnte BDNF<sup>-/-</sup> Modell, eingesetzt, um Genexpression und deren Effekte zu studieren. Nachteil dieser Methode war, dass das zu untersuchende Gen in allen Zellen des Organismus (systemweit) ausgeschaltet wurde und dadurch ungewollte Nebeneffekte bzw. Letalität auftreten konnten.

Dies machte es notwendig, Methoden zu entwickeln, bei denen Gene nur in bestimmten Geweben ausgeschaltet werden, um deren Einfluss auf spezifische Zelltypen untersuchen zu können. Meist bedient man sich dabei der Cre/*loxP*-Methode.

Der Name Cre/*loxP* setzt sich dabei aus den beiden Komponenten dieser Methode zusammen: Cre Rekombinase und *loxP*-Basensequenzen. Die Cre Rekombinase ist ein Enzym, welches die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA an spezifischen Basensequenzen katalysiert. Die Zielsequenz der Cre Rekombinase ist *loxP* (locus of X over P1), bestehend aus einer 8 bp langen Spacersequenz und zwei 13 bp langen palindromischen Erkennungssequenzen. Das Enzym bindet an diese Erkennungssequenzen und entfernt oder invertiert dazwischenliegende Genabschnitte. Hierbei ist es entscheidend, wie die *loxP*-Sequenzen zueinander orientiert sind. Bei Orientierung beider Sequenzen in gleicher Richtung (←←) wird der geflochte Abschnitt (**f**lanked by **loxP**, flankiert von *loxP*) herausgeschnitten, die verbliebenen *loxP*-Stellen wieder zusammengefügt und der dabei gebildete zirkuläre Rest, der exzidierte DNA-Abschnitt, von der Zelle verdaut. Sind die *loxP*-Sequenzen invertiert zueinander orientiert (→←), wird der dazwischenliegende Abschnitt herausgeschnitten und um 180° gedreht wieder an der gleichen Stelle ins Genom eingebaut [46]. Somit kann der Gen-Abschnitt aktiviert oder deaktiviert werden, je nach Anordnung der *loxP* Sequenz. Das Modell kommt vor allem bei Mäusen zum Einsatz, da bei diesen mittlerweile viele genetische Varianten mit geflochten Zielgenen bzw. promotorsensitiver Cre Expression existieren. Entscheidend für die gewebespezifische Expression von Cre Rekombinase ist der gewählte Promotor. Um gewebespezifisch ein Gen auszuschalten, wird ein Promotor



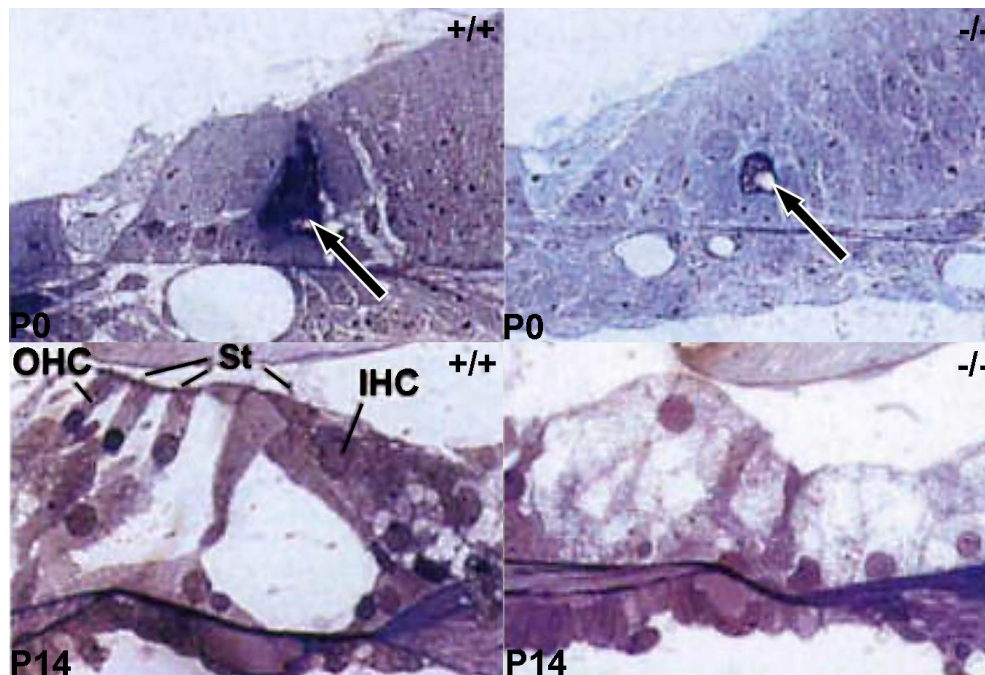
ausgewählt, der nur in diesem Gewebe vorkommt [47]. Das Cre Rekombinase Gen wird als Transgen in das Genom der Tierlinie eingebracht, sodass es unter der Kontrolle des gewählten Promotors steht und durch diesen exprimiert wird [48-50]. Nach Rekombination mit *loxP* ist in allen Zellen, die aus dieser genetisch veränderten Zelle hervorgehen, der gefloxt Gen-Abschnitt verändert. Die Wahl des richtigen Promotors ist umso wichtiger, da auch der zeitliche Aspekt berücksichtigt werden muss. Ist der Promotor frühzeitig während der Entwicklung aktiv, hat in allen Zellen, die aus den ursprünglichen Zellen hervorgegangen sind, die Exzision des geflochten Genes stattgefunden. Ist der gewählte Promotor hingegen erst spät in der Entwicklung oder nach Maturation aktiv, werden nur wenige Zellen die Exzision aufweisen, da die Zellteilung und -differenzierung bereits größtenteils abgeschlossen ist.

Dieses Expressionsverhalten von neu generierten Cre Mäusen wird mit sogenannten Reporterlinien überprüft. Diese Reportertiere tragen in allen Zellen ein Reporter-gen, meist *eGFP* oder *LacZ*. Weit verbreitete hierfür sind der *Rosa26* Locus und der *CAG* Promotor (eine Kombination des Cytomegalovirus Enhancers CMV mit dem chicken beta-actin Promotor CAT). In diesem Fall ist nicht das Reporter-gen gefloxt, sondern ein Stopcodon vor dem Gen, welches die Expression des Reporterproteins verhindert. Ist Cre Rekombinase in der Zelle präsent, wird das Stopcodon entfernt und der Reporter kann abgelesen werden. Zellen, in denen Cre Rekombinase aktiv war, und deren Nachkommen exprimieren dann das Reporterprotein. Dieses kann entweder mittels Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffen oder im Falle von Eigenfluoreszenz direkt nachgewiesen werden.

### 1.5 *Brn3.1*

Ein möglicher Promotor, um Gene selektiv im Innenohr auszuschalten, ist der des Gens *Brn3.1*, auch *Brn3.c* genannt, welches das murine Äquivalent zu *POU4F3*, einem von 15 humanen Transkriptionsfaktoren aus der POU-Familie, ist. Diese Faktoren interagieren mit anderen Transkriptions- und Cofaktoren, unter anderem aus der Sox- und Pax-Familie [51], welche für die Gewebedifferenzierung in frühen Entwicklungsstadien zuständig sind. Auch in der Cochlea spielen diese Faktoren eine Rolle. Eine Mutation von *POU4F3* führt zu einer nicht-syndromalen Schwerhörigkeit (*DFNA15*) [16]. Neben *Brn3.1*

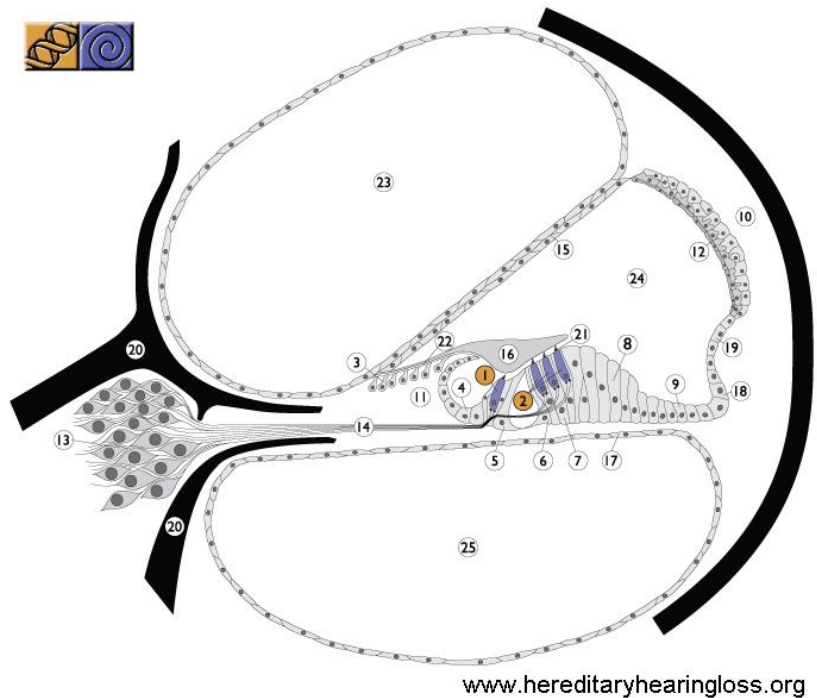
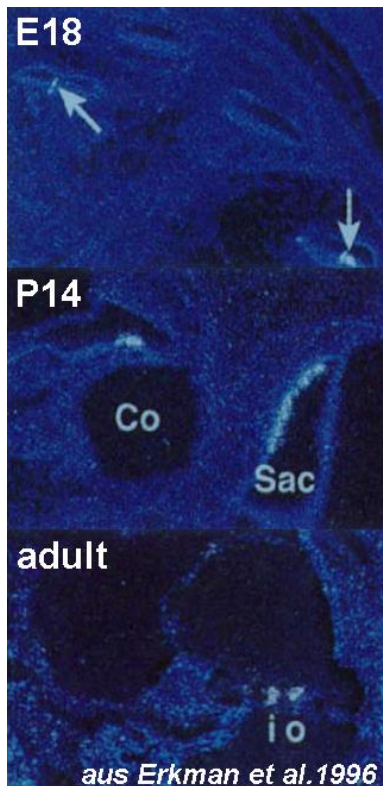
gehören noch Brn3.0 und Brn3.2 zur gleichen Proteinfamilie. Brn3.1 wird hauptsächlich in den inneren und äußeren Haarzellen der Cochlea exprimiert [52], findet sich jedoch auch in einigen Zellen im Bereich der Dorsalganglien und der Ganglienzellen der Retina [53].



**Abbildung 1: Vergleich des Corti'schen Organs Brn3.1-exprimierender Wildtypen (links, +/+) und Nullmutanten (rechts, -/-) zu P0 und P14.**

Modifiziert nach Erkman *et al.* [52]. OHC: Äußere Haarzellen, IHC: Innere Haarzellen, St: Stereozilienbündel, Pfeile: Corti'scher Tunnel

Die Expression von Brn3.1 und Brn3.2 im Innenohr ist eng miteinander verknüpft und folgt genauen örtlichen und zeitlichen Mustern. Brn3.1 kann ab Embryonaltag 13 im Innenohr nachgewiesen werden [52]. Es ist hierbei wichtig für späte Differenzierungsprozesse und das Überleben der Haarzellen (Abb. 1), da seine Expression erst nach der Differenzierung der Vorläuferzellen in Haarzellen beginnt [54]. Eine Regulation durch andere Transkriptionsfaktoren wie Atoh1 ist dabei sehr wahrscheinlich [55]. Die kontinuierliche Expression nach der Differenzierung hingegen wird vermutlich durch einen positiven Feedback-Loop ermöglicht, um das Überleben der Haarzellen und die eigene Expression zu garantieren [37] (Abb. 2).



1 innere Haarzellen  
2 äußere Haarzellen

nach Erkman et al. 1996

**Abbildung 2: Nachweis von Brn3.1 mRNA im Corti'schen Organ zu E18, P14 und im adulten Tier und schematische Darstellung des Expressionsortes von POU4F3.**

Expression von Brn3.1 beginnt basal im sich entwickelnden Corti'schen Organ in den inneren und äußeren Haarzellen (aus Erkman et al. [52], modifiziert nach Van Camp & Smith [56]), links: Co: Corti'sches Organ, Sac: Sacculus, i: innere Haarzelle, o: äußere Haarzellen, Pfeile: Brn3.1, rechts: 1: innere Haarzelle, 2: äußere Haarzellen

## 1.6 Auditorische Neuropathie

Die Innenohrforschung hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht, die Struktur, Funktionsweise und regulatorischen Mechanismen im Corti'schen Organ aufzuklären. Allerdings bleiben in vielen Bereichen immer noch offene Fragen. Insbesondere die genaue Pathogenese von bestimmten Hörstörungen, wie zum Beispiel der auditorischen Neuropathie, ist bisher noch ungeklärt, da nicht explizit bekannt ist, wo und wie diese Erkrankung entsteht.

Bei der auditorischen Neuropathie (AN) handelt es sich um eine Erkrankung der neuralen Strukturen der Hörbahn. Bei der cochleären Schwerhörigkeit kommt es primär zu einem

Verlust der äußeren Haarzellen, im weiteren Verlauf der Erkrankung auch der inneren Haarzellen und dadurch zu einer morphologischen Veränderung des Corti'schen Organs. Bei der auditorischen Neuropathie hingegen ist das Corti'sche Organ zunächst strukturell nicht beeinträchtigt, jedoch ist die Weiterleitung der akustischen Information über den Hörnerv zum Gehirn gestört. Die genaue Pathophysiologie der Störung ist jedoch größtenteils unbekannt. Es wird vermutet, dass die inneren Haarzellen, deren Synapsen, die Neurone des Ganglion spirale und der Hörnerv selbst betroffen sein können.

Bisher ist bekannt, dass Mutationen im *DFNB59* Gen, welches für das Protein Pejvakin kodiert und ein Paralog von *DFNA5* ist, zu einer auditorischen Neuropathie führen können [57]. Das Protein Pejvakin kommt in den Zellkörpern von Neuronen vor. Es scheint zusammen mit Peroxisomen eine Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress in Haarzellen und auditiven Neuronen zu spielen [58, 59].

Auch Proteine der Haarzellsynapse wie Otoferlin (*OTOF*) können mutiert sein und eine rezessive Form der auditorischen Neuropathie auslösen [60]. Otoferlin fungiert als Calciumsensor bei der Exocytose synaptischer Vesikel in Haarzellen [61, 62]. Außerdem interagiert es mit dem endozytotischen Adaptorprotein AP-2 [63], um den Spalt der Haarzellsynapse schnell von freigesetzten Botenstoffen zu klären.

Darüber hinaus können andere Faktoren für diese Erkrankung eine Rolle spielen, z. B. Probleme in der Tubulinassemblierung wie bei der *pnm* (progressive motor neuronopathy) Maus, einem Tiermodell für eine progrediente Erkrankung der Motoneuronen. Eine Mutation im *Tbce* Gen (Tubulin-spezifisches Chaperon E) führt zu einer inkorrekten Faltung des  $\beta$ -Tubulins [64]. Homozygot betroffene Tiere zeigen ab einem Alter von 2 Wochen eine progrediente Lähmung der Hinterläufe [65] und einen voranschreitenden Hörverlust [66]. Die Lebenserwartung dieser Tiere liegt bei 5-6 Wochen, da durch die Erkrankung auch die Atemmuskeln betroffen sind.

## 1.7 *In vitro* Kulturen

Die bisher beschriebenen Tiermodelle stellen mit der Möglichkeit für *in vivo* Untersuchungen nur eine Option dar, neue Erkenntnisse zu gewinnen. Auch *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen ermöglichen es, die Prozesse, welche bei der Ausbildung von Hörstörungen ablaufen, besser verstehen zu können. Zellkulturen

können als Explantate ganzer Gewebe oder aus Einzelzellen angelegt werden. Gewebeexplantate bieten dabei den Vorteil, dass die Struktur des zu untersuchenden Gewebes erhalten bleibt und diese Kulturen dadurch genauer die natürlichen Bedingungen abbilden. Einzelzellkulturen, bei denen man zwischen adhärennten Kulturen und Suspensionskulturen unterscheidet, sind hingegen geeigneter, den Einfluss einzelner Faktoren insbesondere auf separate Zellen zu untersuchen, da diese homogener in der Zusammensetzung als Explantatkulturen und einfacher manipulierbar sind. Die moderne Wissenschaft und Medizin wäre ohne Zellkulturen undenkbar, da diese unter anderem für die Herstellung medizinischer Produkte wie Vakzine, synthetische Hormone, Krebstherapeutika, monoklonale Antikörper und Enzyme verwendet werden. Auch in der Stammzelltherapie, beim Tissue Engineering, für Toxizitätstests und Expressionsstudien werden Zellkulturen eingesetzt. In der Grundlagenforschung dienen diese unter anderem dazu, Einflüsse auf Wachstum und Differenzierung zu untersuchen, z. B. über Dosisfindungsstudien. Zellkulturen, welche direkt aus Geweben von Spenderorganismen gewonnen werden (Primärzellkultur), sind im Gegensatz zu immortalisierten Zellkulturlinien wie z. B. HeLa-Zellen, allerdings häufig eine Mischung verschiedener Zelltypen.

In der Innenohrbiologie werden sowohl Explantate des Ganglion spirale als auch Einzelzellkulturen hieraus verwendet. An Explantatkulturen wird zum Beispiel zielgerichtetes axonales Wachstum untersucht [67], um z.B. die Kommunikation zwischen auditorischen Neuronen und Elektroden, wie sie bei Cochlea Implantaten eingesetzt werden, zu verbessern [68]. Die erhaltene physische Struktur in Explantatkulturen erlaubt daher andere Untersuchungsansätze als eine Einzelzellkultur auditorischer Neurone. Letztere bieten durch ihre homogenere Zusammensetzung eine bessere Möglichkeit, einzelne Faktoren und deren Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Neurone zu untersuchen. Studien zum Zusammenhang von Zelldepolarisation und Neurotrophinen auf das Überleben von Neuronen aus dem Ganglion spirale [39, 69] und Voltage Clamp-Ableitungen an Ionenkanälen [70] sind einige Arten von Untersuchungen, welche an Einzelzellkulturen von auditorischen Neuronen durchgeführt werden. Die gewählte Kulturform hängt jedoch in erster Linie von der Fragestellung der Studie ab.

Dabei muss zum Beispiel auch beachtet werden, dass nicht-neuronale Zellen wie Gliazellen neurotrophe Faktoren sekretieren, welche das Wachstum und die Erhaltung von neuronalen Zellen beeinflussen. Daher ist es wichtig, für Zellkulturstudien an auditorischen Neuronen, insbesondere in Bezug auf dosisabhängige Untersuchungen zum Einfluss von Neurotrophinen, den Neuronenanteil in der Kultur durch optimale Bedingungen zu erhöhen, um genaue Aussagen zu erhalten und unerwünschte Fremdeinwirkungen zu vermeiden.

## 1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, weitere Erkenntnisse zur Pathophysiologie der auditorischen Neuropathie zu gewinnen. Hierzu sollten verschiedene Tiermodelle erstmalig bzw. eingehender charakterisiert werden mit der grundlegenden Fragestellung, ob sie als Modelle für die auditorische Neuropathie geeignet sind.

Eines der untersuchten Modelle war die neue konditionelle Cre Rekombinase exprimierende Mauslinie Brn3.1 IRES Cre, welche in Bezug auf ihren möglichen Einsatz zur Ausschaltung von Neurotrophinen im Innenohr durch Verkreuzungen mit geflochtenen Mauslinien betrachtet werden sollte. Zusätzlich wurde ein bekanntes Mausmodell, die pmn Maus, hörelektrophysiologisch und histologisch eingehender charakterisiert, um neue Erkenntnisse über den bereits bekannten Hörverlust in diesem Modell zu gewinnen und zu überprüfen, ob die Pathophysiologie dieser Hörstörung der auditorischen Neuropathie entspricht. Darüber hinaus sollte eine Zellkultur etabliert werden, welche eine Kultivierung von auditorischen Neuronen ohne Gliazellen erlaubte.

### 1.8.1 Elektrophysiologische Untersuchungen der verwendeten Mauslinien für Kreuzungsversuche und F1-Nachkommen jener Verkreuzungen

Alle verwendeten Linien sowie die Nachkommen der Verkreuzungen von Linien sollten audiologisch untersucht werden, insbesondere die verwendeten Reporterlinien, da deren Eignung für den Einsatz in Hörstudien bisher nicht überprüft worden war. Reporterlinien sind für Untersuchungen an neu generierten Cre-exprimierenden Linien ein wichtiges Werkzeug. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass auch diese Tiere genetisch verändert sind und jede Veränderung des Genoms potentiell Schaden hervorrufen kann.

Inwiefern sich die Einbringung des Reporters in das Genom auf das Hörvermögen der Tiere auswirkt, war bisher noch nicht untersucht worden. Wenn diese Tiere mit der neu generierten Brn3.1 IRES Cre Linie verpaart werden und ein Hördefekt in der F1-Generation auftritt, kann so nicht ein einfacher Rückschluss auf die Vererbung des Defekts durch die Cre Linie gezogen werden, da dieser ebenfalls von der Reporterlinie vererbt sein könnte. Deshalb sollte in der vorliegenden Dissertation auch ein audiologisches Profil der beiden Reporterlinien erstellt werden.

Ziel war es, das Cre Rekombinase Expressionsmuster in Nachkommen der F1-Generation in Verpaarungen von Reporterlinien mit der neuen konditionellen Brn3.1 IRES Cre Mauslinie zu untersuchen in Bezug auf einen möglichen zukünftigen Einsatz letzterer mit geflochtenen Mauslinien zur Ausschaltung von Neurotrophen im Innenohr.

#### 1.8.2 Expressionsverhalten von Cre Rekombinase unter dem Promotor Brn3.1

Das zeitliche und örtliche Expressionsmuster von Brn3.1 Cre im Innenohr sollte in Nachkommen der F1-Generation einer Verpaarung der neu generierten transgenen Brn3.1 IRES Cre Mauslinie mit zwei Reporterlinien untersucht und dargestellt werden. Hierzu sollte die Brn3.1 IRES Cre Mauslinie mit zwei weit verbreiteten Reporterlinien C57BL/6-Tg(CAG-CAT-LacZ) (nachfolgend  $R^{LacZ}$  genannt) [71] und Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(EYFP)Cos</sup> (nachfolgend  $R^{eYFP}$  genannt) [72] verpaart und die Cochleae der Nachkommen zu verschiedenen Zeitpunkten, von neonatalen bis adulten Tieren, aufgearbeitet werden.

#### 1.8.3 Evaluation des bestehenden Mausmodells pmn für den Einsatz zur Erforschung der auditorischen Neuropathie

Darüber hinaus sollte die pmn Mauslinie, die bisher als Modell für Motoneuronenerkrankungen genutzt wird, eingehender untersucht werden. Eine vorherige Studie hatte gezeigt, dass homozygote Tiere einen progredienten Hörverlust aufweisen [73]. Diese Hörstörung sollte genauer charakterisiert werden, um zu sehen, ob sich das pmn Tiermodell als ein Modell für die Erkrankung auditorische Neuropathie eignet.

#### 1.8.4 Generierung einer gliazellfreien Kultur dissoziierter auditorischer Neurone für dosisabhängige Untersuchungen von Neurotrophinen im Rahmen einer AN-Therapie

Der Einfluss neurotropher Faktoren auf die Nervenzellen des Innenohres ist von großem Interesse. Problem bisheriger Zellkulturen war dabei die Mischung aus neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, wobei letztere in Kultur sowohl proliferieren als auch neurotrophe Faktoren sezernieren. Letzteres verhinderte zuverlässige Untersuchungen mit jenen Faktoren sowie die Möglichkeit, eindeutige Aussagen über deren Effekte zu treffen. Um dies zu umgehen, sollte eine neue Zellkultur von auditorischen Neuronen für *in vitro* Untersuchungen ohne Gliazellen etabliert werden. Verschiedene Aspekte der Zellkultur wie Medium, Beschichtung und Proliferationshemmer sollten getestet werden, um optimale Bedingungen für das Wachstum von auditorischen Neuronen zu finden und deren Anteil in der Kultur zu erhöhen.



## 2 Material

### 2.1 Technische Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
<b>16 Kanal Headstage</b>	RA16LI	Tucker Davis Technologies
<b>16 Kanal Medusa PreAmp</b>	RA16PA	Tucker Davis Technologies
<b>Absaugpumpe</b>	AP86	KNF
<b>Automatikpipetter</b>	Multipette plus	Eppendorf
<b>BioPhotometer</b>	6131 02083	Eppendorf
<b>Close-field Lautsprecher</b>	EC-1	Tucker Davis Technologies
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	CB220-230V-GO	Binder
<b>DG Holder</b>	DG61003	Noga Engineering & Technology Ltd
<b>EasyPhor Midi Gelelektrophorese Kammer, 10x10 cm</b>	615082	Biozym
<b>Einkanal-Pipetten</b>	Pipette research	Eppendorf
<b>Electrostatic Speaker Driver</b>	ED1	Tucker Davis Technologies
<b>Feinwaage</b>	PE626	Bosch
<b>Fluoreszenz Lichtquelle</b>	EL6000	Leica
<b>Inverses Fluoreszenzmikroskop</b>	DMI 4000B	Leica
<b>Kaltlichtquelle 200W</b>	KL1500	Schott
<b>Konfokal-Mikroskop</b>	SP2	Leica
<b>Kryostat</b>	CM1510S Cryostat	Leica
<b>Low-noise Aufnahme-Mikrofon</b>	ER•10B+	Etymotic Research
<b>Microphone Amplifier</b>	MA3	Tucker Davis Technologies
<b>Multi-I/O Processor</b>	RX8	Tucker Davis Technologies
<b>Multifunction Processor</b>	RX6	Tucker Davis Technologies
<b>Neubauer Zählkammer improved</b>	ZK06	Hartenstein
<b>Operationsmikroskop</b>	OPMI SH	Zeiss
<b>Pentusa Base Station</b>	RX5	Tucker Davis Technologies
<b>Pipettierhelfer</b>	Accujet pro	Brand
<b>Programmable Attenuator</b>	PA5	Tucker Davis Technologies

<b>Reagenzglasschüttler</b>	Lab Dance Vario	IKA Yellowline
<b>Rotator</b>	B7925	Agar Scientific
<b>Rückgekoppelte Heizdecke</b>	BC4	Thomas Wulf Elektronik
<b>Schlauchpumpe</b>	Reglo Analog MS	Ismatec, Cole-Parmer GmbH
<b>Silberdrahtelektroden</b>	-	A. Wiegner
<b>Sonden-Mikrofon</b>	4182	Brüel & Kjær
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer comfort	Eppendorf
<b>UV-Durchlichtschirm</b>	Kaiser RS 1	Bachhofer Laboratoriumsgeräte
<b>Vertical Laminar Flow Cabinet</b>	Biogard Hood B4000-2	The Baker Company, Inc.
<b>Wasserbad 1000W</b>	3042	Köttermann Labortechnik
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5810	Eppendorf
<b>Zentrifuge</b>	Mikroliter Zentrifuge 1029 GKO Q	Hettich

## 2.2 Labormaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Chirurgische Schere</b>	SN06	A. Hartenstein
<b>Combitips plus 2,5 ml</b>	0030 069.242	Eppendorf
<b>Deckgläschen quadratisch 18x18 mm</b>	01-1824/1	R. Langenbrinck
<b>Deckgläschen rechteckig 24x60 mm</b>	01-2465/1	R. Langenbrinck
<b>Deckgläschen rund Ø10 mm</b>	01-0010/1	R. Langenbrinck
<b>Feindosierungsspritze 1 ml</b>	9161465V	B. Braun Melsungen AG
<b>Fettstift</b>	Super PAP-Pen	Science Services
<b>Kanüle 20 G x 1 inch</b>	305175	Becton Dickinson
<b>Mikroskopierpinzette</b>	PZ03	A. Hartenstein
<b>Multipipetten</b>	Combitips Plus 5 ml	Eppendorf
<b>Parafilm M</b>	PM-996	Bemis
<b>Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl</b>	Pipette tip neutral	Sarstedt

<b>Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml</b>	CELLSTAR serological pipette	Greiner bio-one
<b>Splitterpinzette</b>	PZ01	A. Hartenstein
<b>SuperFrost® Plus Objektträger</b>	03-0060	R. Langenbrinck
<b>Standard Reaktionsgefäß</b>	Micro tube 1,5 ml	Sarstedt
<b>TT Cryomold® Biopsy 10x10x5mm</b>	SA62534-10	Sakura
<b>Zellkulturschalen 35 mm</b>	CELLSTAR cell culture dishes, 627160	Greiner bio-one
<b>Zellkulturschalen 35 mm (4-wells)</b>	CELLSTAR cell culture dishes, P7112	Greiner bio-one
<b>Zellkulturschalen 100 mm</b>	CELLSTAR cell culture dishes, 664160	Greiner bio-one
<b>Zellkulturschalen 145 mm</b>	CELLSTAR cell culture dishes, 639160	Greiner bio-one

### 2.3 Primer zur Genotypisierung

Linie	Kürzel	Sequenz
<b>Brn3.1 IRES Cre</b>	crebrn3.1screen1	5' - CTC AGT TTC CGG AAG GTC GAA G - 3'
	Neo2	5' - ATC TAT AGA TCT CTC GTG GGA TCA TTG - 3'
<b>C57BL/6-Tg(CAG-CAT-LacZ)</b>	lox Prev	5' - CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA - 3'
	Z3	5' - GGC CTC TTC GCT ATT ACG - 3'
<b>ROSA26<sup>eYFP</sup></b>	wt-883	5' - AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT - 3'
	wt-316	5' - GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG - 3'
	YFP-4982	5' - AAG ACC GCG AAG AGT TTG TC - 3'
<b>pmn/NMRI</b>	pmn-for	5' - TGA CCA ACC AAA TCA CTG TAG TG - 3'
	pmn-rev	5' - TAG CAT GCA CCA TCA GAT CG - 3'
Alle Primer wurden von Eurofins Genomics synthetisiert.		

### 2.4 Chemikalien

Bezeichnung	Artikel	Hersteller
<b>2-Propanol</b>	109634	Merck
<b>Aceton</b>	JTB-9005-03	J.T. Baker

<b>B27 Supplement with Vitamin A</b>	17504-044	Invitrogen
<b>Bovines Serum Albumin (BSA)</b>	A9418	Sigma
<b>Chloroform</b>	2445	Merck
<b>D(+)-Saccharose für die Molekularbiologie</b>	A2211,1000	AppliChem
<b>DEPC ≥97 % (NMR)</b>	D5758	Sigma-Aldrich
<b>Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)</b>	112533	Merck
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</b>	52100-039	Gibco
<b>EDTA-Dinatrium-Dihydrat</b>	ED2SS	Sigma-Aldrich
<b>Ethanol absolut</b>	8098	J.T. Baker
<b>Ethidiumbromid</b>	111.608	Merck
<b>GlutaMAX™ I Supplement</b>	35050-061	Invitrogen
<b>Glutardialdehyd</b>	820603	Merck
<b>Hank's Balanced Salt Solution without calcium and magnesium (HBSS)</b>	14170-088	Gibco
<b>In situ Cell Death fluorescein (TUNEL-Assay)</b>	11684795910	Roche
<b>Isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl)</b>	00809049	Fresenius Kabi
<b>Laminin, mouse</b>	354232	BD Biosciences
<b>Mowiol 40-88</b>	324590	Sigma Aldrich
<b>Natriumchlorid</b>	106404	Merck
<b>Natriumnitrit</b>	106549	Merck
<b>Neurobasal Medium</b>	21103	Invitrogen
<b>Penicillin-Streptomycin, liquid</b>	15140-122	Gibco
<b>Paraformaldehyd (PFA) reinst</b>	104005	Merck
<b>peqGOLD 50 bp DNA-Leiter</b>	25-2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH

<b>peqGOLD Universal Agarose</b>	35-1020	PEQLAB Biotechnologie GmbH
<b>Phosphate-Buffered Saline (PBS)</b>	DPBS with Ca & Mg, H15-001	PAA Laboratories
<b>Poly-D-Lysin 70000 Hbr reinst</b>	33224	SERVA Electrophoresis
<b>Poly-L-Ornithin 70000 Hbr reinst</b>	P3655	Sigma-Aldrich
<b>Salzsäure rauchend</b>	100317	Merck
<b>TaqMan™ Gene Expression Master Mix</b>	4369016	Applied Biosystems
<b>Tissue-Tek O.C.T. Compound and Cryomold</b>	4557	Sakura
<b>tri-Natriumcitrat-Dihydrat</b>	106448	Merck
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</b>	8382	Merck
<b>Triton™ X-100</b>	T8787	Sigma-Aldrich
<b>TRizol™ Reagent</b>	15596026	Invitrogen
<b>Trypanblau</b>	T8154	Sigma-Aldrich
<b>TWEEN® 20</b>	P9416	Sigma-Aldrich

## 2.5 Anästhetika

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zulassungsnummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ketavet® 100mg/ml</b>	6187926.00.00	Pfizer
<b>Xylavet® 20 mg/ml</b>	8-01049	Cp-Pharma

## 2.6 Wachstumsfaktoren und Cytostatika

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC)</b>	C1768	Sigma-Aldrich
<b>Leukemia Inhibitory Factor mouse (LIF)</b>	L5158	Sigma-Aldrich
<b>Recombinant Human BDNF</b>	248-BD	R&D Systems, Inc.
<b>Recombinant Human NT-3</b>	450-03	PeptoTech

## 2.7 Enzyme

Bezeichnung	Artikel	Hersteller
Accutase	L11-007	PAA Laboratories
Collagenase I	LS004194	Worthington
DNase I	LS002004	Worthington
MnI I	ER1072	Fermentas
Proteinase K	03115879001	Roche
RNase-Inhibitor RiboLock	EO0382	Fermentas
Trypsin	LS003708	Worthington
Trypsin-Inhibitor	T6522	Sigma-Aldrich

## 2.8 Antikörper

### 2.8.1 Erstantikörper

Antigen	Konz.	Klonalität	Host	Artikel	Hersteller
DAPI	1:1000	-	-	D9542	Sigma Aldrich
GFP	1:1000	polyklonal	rabbit	ab6556	Abcam
Parvalbumin	1:1000	monoklonal	mouse	MAB1572	Millipore
Tubulin beta	1:500	monoklonal	mouse	T 5168	Sigma Aldrich
Tubulin beta III (TU-20)	1:500	monoklonal	mouse	ab7751	Abcam
Tubulin beta III	1:500	polyklonal	rabbit	ab18207	Abcam
$\beta$ - Galactosidase	1:2000	monoklonal	mouse	Z378 A	Promega
TBCE	1:50	polyklonal	rabbit	12021-1- AP	ProteinTech Group

### 2.8.2 Zweitantikörper

Antigen	Konz.	Ziel-Antigen	Host	Artikel	Hersteller
Alexa Fluor 488 IgG	1:500	anti-mouse	goat	A-11001	Invitrogen

<b>Alexa Fluor A488 Phalloidin</b>	1:250	anti-mouse	-	A-12379	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 555 IgG</b>	1:500	anti-mouse	goat	A-21422	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 555 IgG</b>	1:500	anti-rabbit	goat	A-21428	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 647 IgG</b>	1:500	anti-mouse	goat	A-21236	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 647 IgG</b>	1:500	anti-rabbit	goat	A-21245	Invitrogen

## 2.9 Tierstämme

<b>Nomenklatur</b>	<b>Gattung</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Literatur</b>
<b>C57BL/6J</b>	Maus ( <i>Mus musculus</i> )	C57BL/6	Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg	The Jackson Laboratory, Stock. No. 000664
<b>NMRI-Tbce<sup>pmn</sup>/J</b>	Maus ( <i>Mus musculus</i> )	pmn	Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg	[65, 74]
<b>Brn3.1 IRES Cre</b>	Maus ( <i>Mus musculus</i> )	Brn3.1 IRES Cre	Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg	[75]
<b>C57BL/6-Tg(CAG-CAT-LacZ)</b>	Maus ( <i>Mus musculus</i> )	R <sup>LacZ</sup>	Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg	[71]
<b>Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(EYFP)Cos</sup></b>	Maus ( <i>Mus musculus</i> )	R <sup>eYFP</sup>	Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg	[72]

## 2.10 Selbsthergestellte Lösungen, Puffer und Medien

### 2.10.1 Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
<b>Differenzierungsmedium (DIF-Medium) auf DMEM Basis</b>	DMEM 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % GlutaMAX™ 2 % B27 Supplement with Vitamin A (alternative Differenzierungsfaktoren sind gesondert im Text vermerkt)
<b>Differenzierungsmedium (DIF-Medium) auf Neurobasal-Medium Basis</b>	Neurobasal Medium 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % GlutaMAX™ 2 % B27 Supplement with Vitamin A
<b>Ansatz zur enzymatischen Dissoziation des Ganglion spirale (Dissoziationsmix)</b>	160 µl HBSS mit Ganglion spirale 20 µl 1 % Trypsin 20 µl 1 % Collagenase I 2 µl DNase I

### 2.10.2 Perfusion

Puffer oder Lösung	Zusammensetzung
<b>Fixans</b>	125 ml 8 % Paraformaldehyd 4 ml 25 % Glutardialdehyd (= 0,2 %) 166,67 ml 0,3 M NaPP (= 0,1 M) ad 500 ml Aq. dem. pH 7,2 - 7,4
<b>Spüllösung</b>	2,25 g NaCl 25 mg Natriumcitrit In 25 ml Aq. dem. lösen

### 2.10.3 Immuncytochemie und Immunhistochemie

Puffer oder Lösung	Zusammensetzung
<b>Cal-Ex</b>	37,15 ml 37 % HCl (= 5,5 %) 2,02 ml 0,4 M EDTA (= 0,12 %) ad 250 ml Aq. dest.
<b>EDTA, 0,2 M</b>	74,45 g EDTA–Dinatrium-Dihydrat (MG 372,24) ad 800 ml Aq. dem.



	ca. 20 g NaOH-Plätzchen (vollständige Lösung bei pH 8) ad 1000 ml Aq. dem.
<b>Mowiol Eindecklösung</b>	10 g Mowiol 40-88 40 ml PBS 20 ml wasserfreies Glycerin
<b>PBS, 0,05 M</b>	83,33 ml 0,3 M NaPP ad 500 ml Aq. dem. 4,5 g NaCl pH 7,2 – 7,4
<b>PBS, 0,05 M mit 1 % Triton X100</b>	83,33 ml 0,3 M NaPP ad 500 ml Aq. dem. 5 ml Triton X 100 = 1 % 4,5 g NaCl = 0,9 % pH 7,2 – 7,4
<b>Paraformaldehyd (PFA) 4 %</b>	25 ml 8 % Paraformaldehyd 16,7 ml 0,3 M NaPP ad 50 ml Aq. dem. pH 7,2-7,4
<b>Saccharose-Lösung 30 %</b>	50 ml 0,1 M NaPP 15 g D(+)-Saccharose
<b>TBE 1X</b>	17,78 g TRIS 0,7 g EDTA-Na <sub>2</sub> 5,5 g Borsäure ad 1000 ml Aq. dem. pH 8,1-8,5
<b>TBST 1X</b>	1,21 g Tris-Base (MG 121,14) 4,0 g NaCl 350 ml Aq. dem. pH → 7,6 mit ca. 0,5 ml HCL (rauchend) ad 500 ml Aq. dem. (steril) + 0,5 ml Tween 20
<b>TUNEL-Mix</b>	90 µl Label Solution <i>in situ</i> cell death detection kit 10 µl Enzyme Solution des <i>in situ</i> cell death detection kit

#### 2.10.4 Beschichtung von Zellkulturplättchen

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Laminin-111</b>	PBS 0,05 M Laminin-111 (1:100)
<b>Poly-D-Lysin</b>	PBS 0,05 M Poly-D-Lysin (1:100)
<b>Poly-L-Ornithin</b>	PBS 0,05 M Poly-L-Ornithin (1:100)

#### 2.10.5 Anästhetikum

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Anästhetikumsansatz</b>	0,9 ml Ketavet® (100 mg/ml) 0,2 ml Xylazin® (20 mg/ml) 2 ml 0,9 % NaCl

#### 2.11 Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BioSigRZ</b>	Tucker Davis Technologies
<b>Graphpad Prism 5.0 &amp; 6.0</b>	Graphpad Software Inc.
<b>ImageJ</b>	Wayne Rasband
<b>LAS X</b>	Leica Microsystems CMS GmbH
<b>Living Image 4.5</b>	PerkinElmer
<b>Office 2010 &amp; 2013</b>	Microsoft
<b>Paint Shop Pro 9/ X9</b>	Jasc Software/Corel
<b>SigGenRZ</b>	Tucker Davis Technologies

## 3 Methoden

### 3.1 Genotypisierung

#### 3.1.1 DNA-Extraktion

Biopsien von Schwanzendstücken wurden in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen über Nacht bei 60 °C und 500 rpm in 500 µl Lysispuffer und 20 µl Proteinase K verdaut. Danach wurden 430 µl 5 % SDS und 170 µl 3 M NaCl hinzugegeben, die Mischung kurz gevortext und anschließend 700 µl Chloroform dazugeben. Das Gefäß wurde nochmals geschüttelt und gevortext, bis die Lösung weiß wurde und anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, erneut 750 µl Chloroform dazugeben und die Mischung wieder geschüttelt und gevortext, bis die Lösung weiß wurde. Die Schritte aus Zentrifugation, Überführung der oberen Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß und Zugabe von Chloroform wurden so oft wiederholt, bis die obere Phase klar bzw. durchsichtig war.

500 µl der oberen Phase wurden in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, 1 ml Ethanol (absolut) hinzugegeben und die Lösung gevortext, bevor sie bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Das Ethanol wurde abgegossen, das Pellet mit 300 µl Ethanol (absolut) gewaschen und erneut mit denselben Parametern zentrifugiert. Der Schritt aus Abgießen, Waschen und Zentrifugieren wurde noch einmal wiederholt und dann das Pellet nach dem Abgießen getrocknet. Das so aufgereinigte DNA-Pellet wurde für die folgende PCR in 100 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) für 30 min bei 37 °C und 500 rpm gelöst.

#### 3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) und Gelelektrophorese

Die aufgereinigten Proben wurden mit einem Photospektrometer auf den DNA-Gehalt und die Reinheit überprüft. Für die PCR wurden die Proben auf 0,15 µg/µl verdünnt. Alle Primer für die PCR-Reaktionen wurden von Eurofins Scientific SE synthetisiert.

Zur Genotypisierung der Brn3.1 IRES Cre Linie wurden die beiden Primer 5' - CTC AGT TTC CGG AAG GTC GAA G - 3' und 5' - ATC TAT AGA TCT CTC GTG GGA TCA TTG - 3' verwendet. Die PCR wurde mit den folgenden Konditionen durchgeführt: einführender Denaturationsschritt bei 98 °C für 2,5 min, dann 25 Zyklen von 98 °C, 60 °C

und 72 °C für jeweils 30 s. Der letzte Schritt wurde im letzten Zyklus für 10 min und zum Schluss der Ansatz bei 15 °C gehalten. Ein transgenes Allel zeigte sich in einem 500 bp großem PCR-Produkt.

Zur Genotypisierung der R<sup>LacZ</sup> Reporterlinie wurden die beiden Primer 5' - CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA - 3' und 5' - GGC CTC TTC GCT ATT ACG - 3' verwendet. Die PCR wurde mit den folgenden Konditionen durchgeführt: Einführender Denaturationschritt bei 98 °C für 2,5 min, dann 38 Zyklen von 98 °C und 55 °C für jeweils 30 s und 72 °C für 45 s. Der letzte Schritt wurde im letzten Zyklus für 10 min und zum Schluss der Ansatz bei 15 °C gehalten. Ein transgenes Allel zeigte sich in einem 500 bp großem PCR-Produkt.

Die R<sup>eYFP</sup> Reporterlinie wurde mit folgenden Primern genotypisiert: 5' - AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT - 3', 5' GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG - 3' und 5' - AAG ACC GCG AAG AGT TTG TC - 3'. Die PCR wurde mit den folgenden Konditionen durchgeführt: Einführender Denaturationschritt bei 98 °C für 2,5 min, dann 35 Zyklen von 98 °C, 58 °C und 72 °C für jeweils 30 s. Der letzte Schritt wurde im letzten Zyklus für 10 min und zum Schluss der Ansatz bei 15 °C gehalten. Ein transgenes Allel zeigte sich in einem 320 bp großem PCR-Produkt, ein Wildtyp-Allel in einem 600 bp großem Produkt.

Die pmn-Linie wurde mit folgenden Primern genotypisiert: 5' - TGA CCA ACC AAA TCA CTG TAG TG - 3' und 5' - TAG CAT GCA CCA TCA GAT CG - 3'. Die PCR wurde mit folgenden Konditionen durchgeführt: Einführender Denaturationschritt bei 94 °C für 2 min, dann 30 Zyklen von 94 °C für 10 s, 53 °C für 15 s und 72 °C für 30 s. Der letzte Schritt wurde im letzten Zyklus für 10 min und zum Schluss der Ansatz bei 15 °C gehalten. Eine erfolgreiche PCR zeigte sich in einem 450 bp PCR-Produkt. Dieses wurde dann über Nacht mit Mnl I verdaut und auf einem 2 % Agarose-Gel aufgetrennt. Ein Wildtyp-Allel führte zu zwei Produkten von 300 und 250 bp Größe. Ein mutiertes Allel wurde durch zwei Banden von 250 und 150 bp nachgewiesen.

## 3.2 Elektrophysiologie

### 3.2.1 Narkose und Handling

Alle audiophysiologischen Untersuchungen an den verwendeten Tieren fanden unter Narkose statt. Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin® (72,5 mg/kg) und Xylazin® (12,5 mg/kg) anästhetisiert. Während der Untersuchungen wurde die Körpertemperatur mit Hilfe eines rückgekoppelten Heizkissens auf 37 °C gehalten. Die Narkosetiefe wurde mit dem Zwischenzeh-Reflex überprüft und, falls notwendig, weitere Dosen des Narkosemittels im Umfang von 50 bis 75 % der Initialdosis verabreicht.

### 3.2.2 Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen (DPOAE)

DPOAEs wurden mit einem TDT III System und der dazugehörigen BioSigRZ Software aufgezeichnet, verarbeitet und graphisch dargestellt. Als akustische Stimuli dienten zwei gleich laute, fortlaufende, sinusförmige Töne mit den Primärfrequenzen  $f_1$  und  $f_2$  ( $f_2 > f_1$ ). Die Primärtöne wurden über zwei separate Lautsprecher ausgegeben (EC-1 close-field Lautsprecher). In das abgedichtete Ohr des Tieres wurden die Töne über das speziell für DPOAE-Aufnahmen konstruierte low-noise Aufnahme-Mikrofon (ER•10B+) eingespielt. Die Ausgabeleistung der Lautsprecher wurde mit einem Sonden-Mikrofon kalibriert. Wenn ein Ausschlag im Spektrum bei  $2f_1 - f_2$  das Grundrauschen um 3 dB $\mu$ V überstieg und bei dem nächst größeren Schalldruckpegel reproduzierbar war, wurde er als distorsiv produzierte otoakustische Emission gewertet. Die untersuchten Grundfrequenzen reichten von 8 bis 20 kHz in 4 kHz Schritten mit einer festgesetzten Frequenz-Ratio  $f_2/f_1$  von 1,2 und Stimuluspegeln von 0 bis 60 dB SPL in 5 dB Schritten. Der Primärtön  $f_1$  entsprach dabei dem 0,894-fachen und der Primärtön  $f_2$  dem 1,118-fachen der Grundfrequenz. Beispielsweise ergab das für 8 kHz eine Primärfrequenz  $f_1$  von 7,15 kHz und eine Primärfrequenz  $f_2$  von 8,94 kHz. Die Untersuchung der DPOAEs wurde immer vor der Ableitung der evozierten Potentiale durchgeführt, da sich gezeigt hatte, dass eine umgekehrte Vorgehensweise zu einer temporären Reduktion der DPOAE-Antwort führen kann [76]. Evozierte Potentiale hingegen sind unempfindlich gegenüber einer vorhergehenden DPOAE-Untersuchung. Der Nachweis von otoakustischen Emissionen kann sehr leicht durch äußere Einflussfaktoren (z. B. Sitz des Mikrofons) beeinträchtigt

werden. Deshalb ist das Wort Schwellenwert wie bei der Hirnstammaudiometrie nicht geeignet, DPOAEs akkurat zu beschreiben. DPOAEs sollten deshalb in diesem Zusammenhang nach dem Alles-oder-nichts Prinzip bewertet werden: Traten sie auf, wurde von einer Funktionsfähigkeit der äußeren Haarzellen ausgegangen; konnten keine DPOAEs gemessen werden, lag wahrscheinlich eine Schädigung oder ein Verlust der Haarzellen im untersuchten Frequenzbereich vor.

Die im Ergebnisteil für die separaten Linien aufgeführten Werte für die einzelnen Frequenzen sollten deshalb auch nur verdeutlichen ob, und wenn nachweisbar, ab welchem Schalldruckpegel DPOAEs registriert werden konnten.

### 3.2.3 Hirnstammaudiometrie (BERA, *brainstem evoked response audiometry*)

Elektrisch evozierte Potentiale wurden mit Silberdrahtelektroden abgeleitet. Hierzu wurde zur Erfassung der Antworten ein TDT III System und die dazugehörige BioSigRZ Software verwendet. Die Elektroden wurden folgendermaßen gesetzt: postaurikulär am untersuchten Ohr (aktiv), am Stirnbein (negativ/Referenz) und am unteren Rücken (Masse). Diese wurden über eine Headstage (RA16LI) mit dem Medusa Vorverstärker (RA16PA) verbunden. Die Signale wurden um den Faktor 20000 verstärkt und durch einen Bandfilter von 300 bis 3000 Hz geschickt. Stimuliert wurde mit sinusförmigen Tönen in den Frequenzen 4, 6, 8, 12 und 16 kHz. Die Antworten auf diese Töne wurden 10 ms lang aufgezeichnet und aus 512 Aufnahmen gemittelt. Die Level der Stimuli variierten von 100 bis 0 dB SPL in 5 dB Schritten. Nachdem sich in Vorstudien gezeigt hatte, dass keine links-rechts Asymmetrie bei den Tieren auftrat, wurde nachfolgend aus Effizienzgründen nur noch das rechte Ohr untersucht.

## 3.3 Perfusionsfixierung

Zur immunhistologischen Aufarbeitung der Cochleae wurden alle untersuchten Tiere perfusionsfixiert. Die Narkose der Tiere wurde nach der Hirnstammaudiometrie fortgeführt. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz dargestellt. Eine Kanüle wurde in die linke Herzkammer eingeführt und über diese das Blut mit einer Spüllösung aus dem Körper gewaschen. Hierfür wurde die rechte Herzkammer mit einem Schnitt eröffnet und ein kontinuierlicher Fluss der Lösung mit

einer Schlauchpumpe gewährleistet. Über einen Dreiwegehahn wurde nach 2-5 Minuten, sobald erkennbar kein Blut mehr nachfloss, auf Fixierlösung umgestellt und das Tier für 10-15 Minuten fixiert.

Das fixierte Tier wurde dekapitiert und die Felsenbeine zur weiteren Darstellung der Cochleae in die Fixierlösung überführt. Die Bulla wurde unter einer Stereolupe eröffnet und die Cochlea freigelegt. Die Gehörknöchelchen wurden entfernt und rundes sowie ovales Fenster mit einer Pinzette eröffnet. Eine weitere Öffnung zur besseren Zirkulation der Fixierlösung wurde am Helikotrema gesetzt. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter Kanüle wurde die Cochlea mit der Fixierlösung gespült und 2 Tage in dieser auf einem Rotator nachfixiert.

### 3.4 Einbettung und Anfertigung von Kryoschnitten

Fixierte Cochleae wurden zweimal für mindestens 1 h mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (NaPP) gewaschen und entweder für 25-30 min in CalEx oder für 2 Wochen in 0,2 M EDTA entkalkt. Cochleae von Tieren jünger als 10 Tage wurden nicht entkalkt. Anschließend wurde erneut zweimal für mindestens 1 h mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer gewaschen und die Cochleae über Nacht in einer 30 %igen Saccharoselösung absinken gelassen. Das Medium wurde schrittweise von einer 1:1 Mischung aus 30 %iger Saccharoselösung und Tissue Tek® O.C.T.™ Compound zu einer 100 %igen Tissue Tek® Mischung gewechselt. Es wurde zwischen den Schritten jeweils abgewartet, bis die Cochleae abgesunken waren. Anschließend wurden diese in Tissue Tek® in 10 mm x 10 mm x 5 mm Kryomolds eingebettet. Die Cochleae wurden auf das runde Fenster gelegt und für Längsschnitte ausgerichtet. Das Tiefgefrieren erfolgte auf Metallblöcken, die auf -80 °C heruntergekühlt waren. Kryoeingebettete Cochleae wurden mit einem Kryostat in 10 µm dicke Schichten geschnitten und fortlaufend à 4 Stück auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 3.5 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Die Kryoschnitte wurden für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und alle folgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Schnitte wurden mit 0,05 M PBS bedeckt, um überschüssiges Tissue Tek® um den Schnitt herum zu entfernen.

Anschließend wurden die Schnitte für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer nachfixiert und mit 0,05 M PBS für 5 min gespült. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und für 30 min mit 10 % BSA in 0,1 % TX-100 zur Blockierung von unspezifischen Bindungen inkubiert. Das BSA wurde abgesaugt und die Schnitte mit den Erstantikörpern in 1 % BSA in 0,1 % TX-100 bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als Erstantikörper wurden folgende Antikörper eingesetzt:  $\beta$ -Tubulin mouse monoklonal,  $\beta$ III-Tubulin rabbit polyklonal, anti- $\beta$ -Galactosidase mouse monoklonal, anti-GFP rabbit polyklonal, anti-Parvalbumin mouse monoklonal und anti-TBCE rabbit polyklonal. Die verwendeten Konzentrationen aller Antikörper finden sich in den entsprechenden Tabellen im Abschnitt Material.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3 x 5 min mit 1X TBST gespült und anschließend die Zweitantikörper hinzugegeben. Als Zweitantikörper wurden folgende Antikörper verwendet: DAPI, Alexa Fluor 488 anti-mouse und Alexa Fluor 555 anti-rabbit.

Die Zweitantikörper wurden in 1 % BSA in 0,1 % TX-100 gelöst und die Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur darin inkubiert. Final wurde 3 x 5 min mit 1X TBST gespült und die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

### 3.6 Präparation und immunhistochemische Färbung von Wholemoutpräparaten des Corti'schen Organs

Für Wholemoutpräparate des Corti'schen Organs wurde die knöcherne Kapsel entfernt und die innere Struktur (Modiolus mit Corti'schem Organ) im Ganzen mit Pinzetten herausgelöst. Das Corti'sche Organ wurde mit einer Kanüle vom Modiolus abgelöst und in eine Zellkulturschale (35 mm x 10 mm mit 4 Innenringen, 4-well) mit 75  $\mu$ l 4 % PFA in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer transferiert und 1 h nachfixiert. Das Gewebe wurde 3 x 5 min in 1X TBST gewaschen, für 30 min mit 10 % BSA in 0,1 % TX-100 gegen unspezifische Bindungen geblockt und anschließend erneut 3 x 5 min mit 1x TBST gewaschen, um überschüssiges BSA zu entfernen. Als Erstantikörper wurden folgende Antikörper verwendet:  $\beta$ III-Tubulin rabbit polyklonal,  $\beta$ III-Tubulin mouse monoklonal, anti-TBCE rabbit polyklonal, anti- $\beta$ -Galactosidase mouse monoklonal, anti-GFP rabbit polyklonal und anti-Parvalbumin mouse monoklonal. Die Antikörper wurden in 1 % BSA in 0,1 % TX-100 gelöst und das Gewebe über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.



Am nächsten Tag wurde das Gewebe 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen und die Zweitantikörper hinzugegeben. Als Zweitantikörper wurden verwendet: DAPI, Alexa Fluor 488 Phalloidin, Alexa Fluor 555 anti-mouse, Alexa Fluor 555 anti-rabbit und Alexa Fluor 647 anti-mouse. Die Zweitantikörper wurden in 1 % BSA in 0,1 % TX-100 gelöst und das Gewebe für 1 h bei Raumtemperatur darin inkubiert. Zum Abschluss wurde das Gewebe nochmals 3 x 5 min in 1X TBST gewaschen und in Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

### 3.7 TUNEL-Assay zum Nachweis der Apoptose

Perfusionsfixierte Cochleae wurden geöffnet, das cortische Organ vom Modiolus abgelöst, in eine Zellkulturschale (35 mm x 10 mm mit 4 Innenringen, 4-well) mit 75 µl 4 % Paraformaldehyd übertragen und für 1 h nachfixiert. Für eine Positivkontrolle wurde ein kurzer Abschnitt des Explantats abgetrennt und separat weitergeführt. Die Gewebe wurde 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen und anschließend für 15 min in 0,5 % Triton-X in 0,1 % Natriumcitratpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 1X TBST à 5 min. Die Positivkontrolle wurde anschließend für 10 min mit 400 U/µl DNase I in 0,1 % Natriumcitratpuffer bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut 2 x 5 min mit 1X TBST gewaschen. Es erfolgte die lichtgeschützte Inkubation im TUNEL-Mix in jeweils 50 µl für Wholemounts bzw. 25 µl für Kryoschnitte für 1 h bei 37 °C. Der TUNEL-Mix wurde durch 3 Waschschrte à 5 min mit 1X TBST entfernt und die Gewebe für 30 min mit 10 % BSA in 0,1 % TX-100 gegen unspezifische Bindungen geblockt und erneut 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen. Als Erstantikörper wurden folgende Antikörper verwendet: anti-Parvalbumin mouse monoklonal und anti-TBCE rabbit polyklonal. Die Antikörper wurden in 1 % BSA in 0,1 % TX-100 gelöst und das Gewebe über Nacht bei 4 °C darin inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Gewebe 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen und die Zweitantikörper hinzugegeben. Als Zweitantikörper wurden verwendet: DAPI, Alexa Fluor 555 anti-mouse und Alexa Fluor 647 anti-rabbit. Die Zweitantikörper wurden in 1 % BSA in 0,1 % TX-100 gelöst, die Gewebe für 1 h bei Raumtemperatur darin inkubiert und abschließend nochmals für 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen. Die Gewebe wurden in Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

Der TUNEL-Assay an Kryoschnitten folgte demselben Ablauf, wobei hier ein Schnitt pro Objektträger als Positivkontrolle verwendet und mit DNase I behandelt wurde. Zusätzlich

wurde der Antikörper  $\beta$ -Tubulin mouse monoklonal ebenfalls als Erstantikörper eingesetzt.

### 3.8 Zellkultur

#### 3.8.1 Anlegen einer Kultur dissoziierter auditorischer Neurone

Für die Kultivierung von auditorischen Neuronen wurden C57BL/6 Mäuse im Alter vom postnatalen Tag 4 bis 6 verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert und die Felsenbeine in DPBS-Puffer überführt. Die knöchernen Kapsel wurde geöffnet und die innere Struktur inklusive Modiolus herausgelöst. Das Corti'sche Organ wurde mit Pinzetten vom Modiolus getrennt, das Ganglion spirale vom Modiolus abgezogen und in ein Mikroreaktionsgefäß mit 160  $\mu$ l HBSS überführt. Die Ganglia spiralia beider Cochleae eines Tieres wurden in einem Gefäß gepoolt.

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten an einer Sicherheitswerkbank. Es folgte eine enzymatische Dissoziation der Ganglia spiralia. Zu jeder Probe wurden 42  $\mu$ l Dissoziationsmix hinzugegeben und mit einer 200  $\mu$ l Pipette die Lösung trituriert. Die Proben wurden für 3 x 10 min bei 550 rpm auf einem ThermoMixer® bewegt und in den Pausen erneut trituriert.

Nach 30 min wurde die enzymatische Dissoziation durch Zugabe von 22  $\mu$ l 1 %igem Trypsin-Inhibitor (Endkonzentration 0,1 %) abgestoppt. Die Proben wurden trituriert und anschließend für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Zellen in 400  $\mu$ l 37 °C warmem HBSS resuspendiert. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Die Zellen wurden in 410  $\mu$ l 37 °C warmem Differenzierungsmedium aufgenommen und resuspendiert.

Vor dem Ausplattieren wurde die Zellzahl jeder Probe mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. 10  $\mu$ l Zellsuspension und 10  $\mu$ l Trypanblau wurden gemischt und in die Zellkammer gegeben. Die Anzahl der lebenden Zellen in 8 Großquadraten (GQ) wurde bestimmt und aus dieser Zahl die Gesamtzellzahl anhand der Formel Zellanzahl in 8 GQ x 1000 bestimmt. Währenddessen wurden die Proben im 37 °C Wasserbad aufbewahrt. Die Zellen wurden auf sterilen, runden Deckgläschen (10 mm) ausplattiert. Hierfür wurden Zellkulturschalen mit 4 Innenringen (4-well) verwendet. Diese wurden einen Tag vor dem

Ausplattieren vorbereitet. Ein Deckgläschen wurde in jeden der 4 Innenringe der Zellkulturschale gelegt und anschließend mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet. Die Zellkulturschalen wurden mit Parafilm umschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Am Tag der Zellkultur wurden die Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen morgens zusätzlich mit 100 µl Laminin beschichtet und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor die auditorischen Neurone darauf ausplattiert wurden. Als Beschichtungsmedium wurde alternativ bei einigen Deckgläschen Poly-L-Ornithin verwendet, sowie bei einigen PLO- und PDL-beschichteten Deckgläschen keine Zweitbeschichtung mit Laminin vorgenommen.

Pro Deckglas wurden 6000 bis 8000 Zellen ausplattiert. Falls Faktoren getestet werden sollten, wurde das Medium nach 1 h gewechselt und hierbei die Faktoren hinzugegeben. Andernfalls erfolgte der Mediumwechsel an Tag 2 (d2) nach Anlegen der Kultur (d0).

Die Zellen wurden an Tag 4 mit 4 % 37 °C warmem PFA fixiert. Zuerst wurde für 2 min 25 µl PFA pro Deckglas zum Medium hinzugegeben, dann abgesaugt und anschließend 75 µl PFA für 30 min zum Fixieren auf jedes Deckglas gegeben. Zum Schluss wurde das PFA wieder abgesaugt und 2 x 5 min mit 1X TBST gewaschen. Zum kurzfristigen Aufbewahren der Deckgläschen bis zur immunhistochemischen Färbung, wurden diese mit 1 ml TBST übergossen, die Zellkulturschalen mit Parafilm umwickelt und diese bei 4 °C gelagert.

### 3.8.2 Immunhistochemische Färbung von kultivierten auditorischen Neuronen

Die Färbung der fixierten auditorischen Neurone erfolgte in einer feuchten Kammer. Die Kammer wurde mit Parafilm ausgelegt und die Deckgläschen mit einer Pinzette auf den Parafilm gesetzt und mit 50 µl 1X TBST feucht gehalten. Der Puffer wurde abgesaugt und 50 µl kaltes Aceton zum Zellaufschluss für maximal 5 min auf jedes Deckglas gegeben und bei Bedarf nachgetropft. Danach wurde 2 x 5 min mit 1X TBST gewaschen und anschließend für 30 min mit 10 %igem BSA in 1X TBST unspezifische Bindungen geblockt. Als Erstantikörper wurden folgende Antikörper verwendet:  $\beta$ -Tubulin mouse monoklonal und  $\beta$ III-Tubulin rabbit polyklonal. Die Antikörper wurden in 1 % BSA in 1X TBST gelöst und 25 µl Erstantikörperansatz auf jedes Deckgläschen gegeben. Die

Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen und dann die Zweitantikörper dazugegeben. Als Zweitantikörper wurden verwendet: DAPI, A488 anti-mouse monoklonal und A555 anti-rabbit polyklonal. Die Antikörper wurden in 1 % BSA in 1X TBST gelöst und 25 µl Zweitantikörperansatz auf jedes Deckgläschen gegeben. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

### 3.9 Auswertung und Statistik

Die individuellen Hörschwellen jedes Tieres bei der BERA und den DPOAEs wurden für jede Frequenz 2-3 Mal gemessen und der Mittelwert gebildet. Diese Werte von 3-5 Tieren pro beschriebener Linien wurden gemittelt und sind als Hörschwellen  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Bei der Untersuchung der Zellkulturen wurden die Gesamtzellzahl sowie der prozentuale Anteil bipolarer Neurone und deren Axonlänge ermittelt. Ein Neuron galt als bipolar, wenn erkennbar war, dass es zwei axonale Auswüchse aufwies, wobei keine Untergrenze für die Axonlänge festgelegt wurde. Die Bestimmung der Axonlänge erfolgte mit dem Programm ImageJ. Für die Mittelwertberechnung wurde das jeweils längere Axon vermessen und gewertet.

Zum Vergleich des Einflusses verschiedener Faktoren auf den Neuronanteil wurden die Neuron- und Gesamtzellzahl von jeweils mind. 3 Deckgläschen der gleichen Kondition bestimmt und gemittelt.

Zum Vergleich der Axonlänge in unterschiedlichen Konditionen wurden alle Neurone eines Deckgläschens vermessen und daraus ein Mittelwert gebildet. Die dargestellten Werte repräsentieren den Durchschnitt dieser Werte von mind. 3 Deckgläschen pro Kondition.

Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte in GraphPad Prism. Zur Feststellung der Normalverteilung wurde eine Spaltenanalyse durchgeführt. Im Falle einer Gauss'schen Verteilung wurde eine ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Post-Test durchgeführt und der Mittelwert sowie der Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) bestimmt. Falls die Werte nicht normal verteilt waren, wurde der Kruskal-

Wallis Test und der Dunn's Multiple Comparison Post-Test durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung (*standard deviation*, SD) bestimmt. Ein p-Wert von weniger als 0,05 galt als signifikant. Alle dargestellten Daten sind Mittelwert und SEM, falls nicht anders vermerkt.

## 4 Ergebnisse

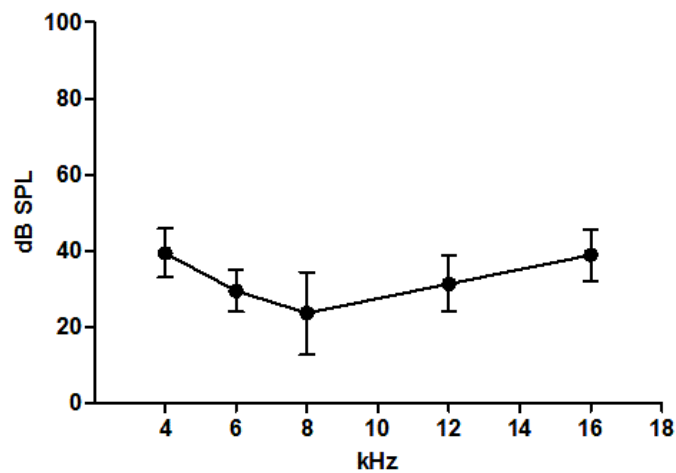
### 4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen der verwendeten Mauslinien für Kreuzungsversuche und F1-Nachkommen jener Verkreuzungen

#### 4.1.1 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels Hirnstammaudiometrie (BERA)

Alle untersuchten Mauslinien zeigten normale Hörschwellen in der Hirnstammaudiometrie bei den fünf untersuchten Frequenzen. Die Ergebnisse der C57BL/6 Linie wurden als Vergleichswerte für alle anderen Linien herangezogen. Die Hörschwellen der Linien werden im Folgenden einzeln dargestellt. Alle Linien zeigten ein charakteristisches Audiogramm, welches aus der Ermittlung der Hörschwellen der BERA-Antworten der Einzelfrequenzen erstellt wurde. Die höchste Schwelle fand sich in allen Linien bei 4 kHz, die niedrigste bei 8 kHz. Die untersuchten Tiere waren im Alter von 2-4 Monaten.

##### 4.1.1.1 C57BL/6

Tiere dieser Linie zeigten folgende Hörschwellen mit Standardabweichung für die einzelnen Frequenzen: 4 kHz:  $39,5 \pm 6,4$  dB SPL (sound pressure level, Schalldruckpegel), 6 kHz:  $29,6 \pm 5,5$  dB SPL; 8 kHz:  $23,8 \pm 10,8$  dB SPL; 12 kHz:  $31,4 \pm 7,3$  dB SPL; 16 kHz:  $39,0 \pm 6,8$  dB SPL (n=5, Abb. 3).

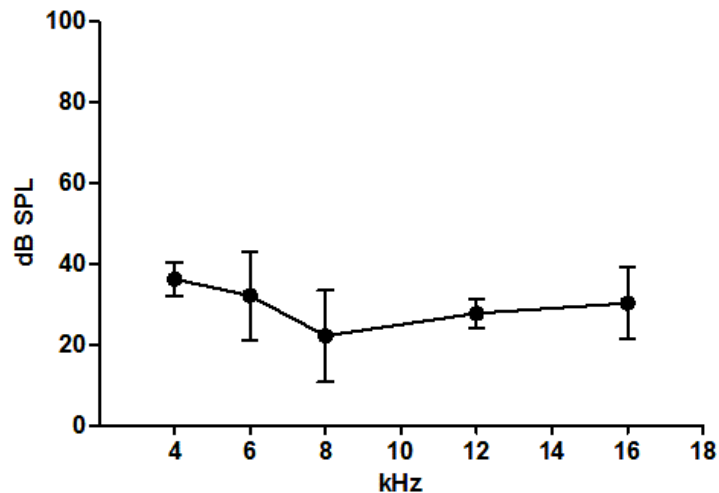


**Abbildung 3: Hörschwellen der C57BL/6 Linie bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.1.1.2 Brn3.1 IRES Cre

Die Hörschwellen bei Brn3.1 IRES Cre Tieren zeigten keinen Unterschied zur Hintergrundlinie C57BL/6. Die Werte für die Frequenzen waren: 4 kHz:  $36,3 \pm 4,2$  dB SPL; 6 kHz:  $32,2 \pm 11,0$  dB SPL; 8 kHz:  $22,2 \pm 11,4$  dB SPL; 12 kHz:  $27,8 \pm 3,6$  dB SPL; 16 kHz:  $30,3 \pm 8,9$  dB SPL (n=4, Abb. 4).

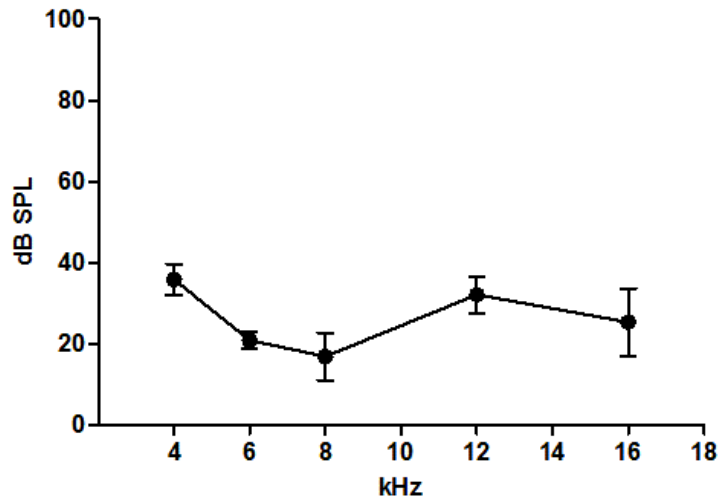


**Abbildung 4: Hörschwellen der Brn3.1 IRES Cre Linie bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.1.1.3 R<sup>eYFP</sup>

Diese Reporterlinie zeigte ebenfalls unauffällige Hörschwellen mit den jeweils höchsten Schwellen bei 4 kHz und den niedrigsten bei 8 kHz. Für die einzelnen Frequenzen wurden folgende Schwellen festgestellt: 4 kHz:  $36,0 \pm 3,8$  dB SPL; 6 kHz:  $21,0 \pm 2,1$  dB SPL; 8 kHz:  $17,0 \pm 5,9$  dB SPL; 12 kHz:  $32,3 \pm 4,5$  dB SPL; 16 kHz:  $25,5 \pm 8,3$  dB SPL (n=5, Abb. 5).

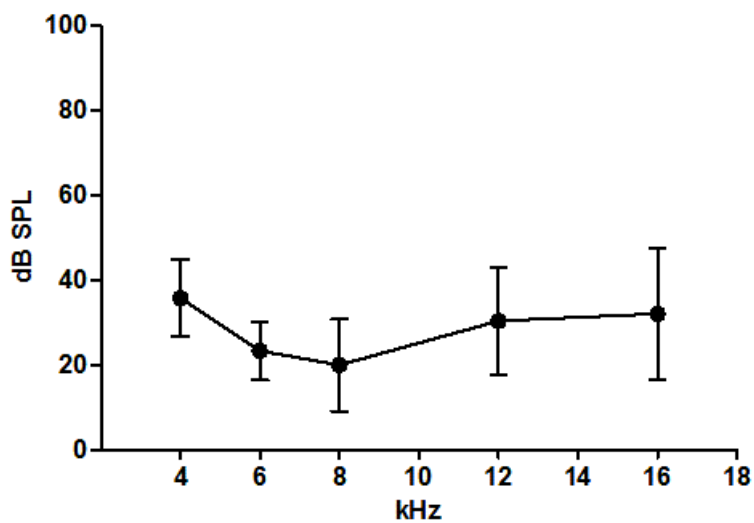


**Abbildung 5: Hörschwellen der R<sup>eYFP</sup> Linie bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.1.1.4 R<sup>LacZ</sup>

Bei der zweiten Reporterlinie ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede in den Hörschwellen zu den anderen Linien, insbesondere der Vergleichslinie C57BL/6. Die Hörschwellen im Einzelnen lauteten: 4 kHz: 35,8  $\pm$  9,0 dB SPL; 6 kHz: 23,3  $\pm$  6,9 dB SPL; 8 kHz: 20,0  $\pm$  10,9 dB SPL; 12 kHz: 30,4  $\pm$  12,8 dB SPL; 16 kHz: 32,1  $\pm$  15,5 dB SPL (n=3, Abb. 6).



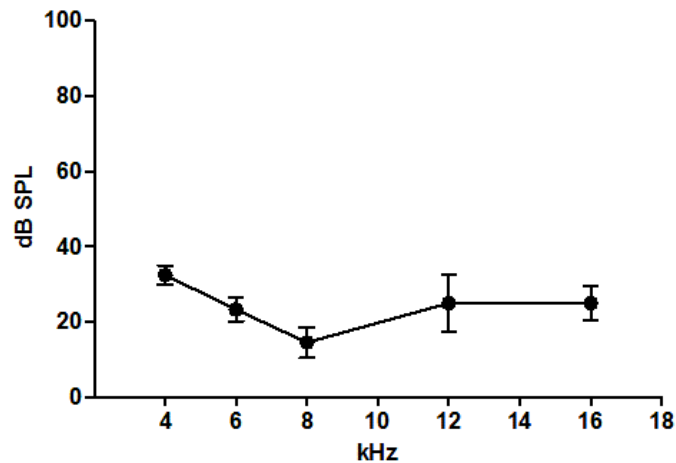
**Abbildung 6: Hörschwellen der R<sup>LacZ</sup> Linie bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung



#### 4.1.1.5 Brn3.1 IRES Cre x R<sup>eYFP</sup>

Die F1-Generation aus der Verkreuzung der neuen konditionellen Brn3.1 IRES Cre Linie mit der ersten Reporterlinie R<sup>eYFP</sup> zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten in den BERA-Antworten und unterschied sich nicht von jenen der C57BL/6 Linie. Es wurden folgende Hörschwellen für die fünf untersuchten Frequenzen ermittelt: 4 kHz: 32,5 ± 2,5 dB SPL; 6 kHz: 23,3 ± 3,2 dB SPL; 8 kHz: 14,6 ± 4,0 dB SPL; 12 kHz: 25,0 ± 7,5 dB SPL; 16 kHz: 25,0 ± 4,5 dB SPL (n=3, Abb. 7).

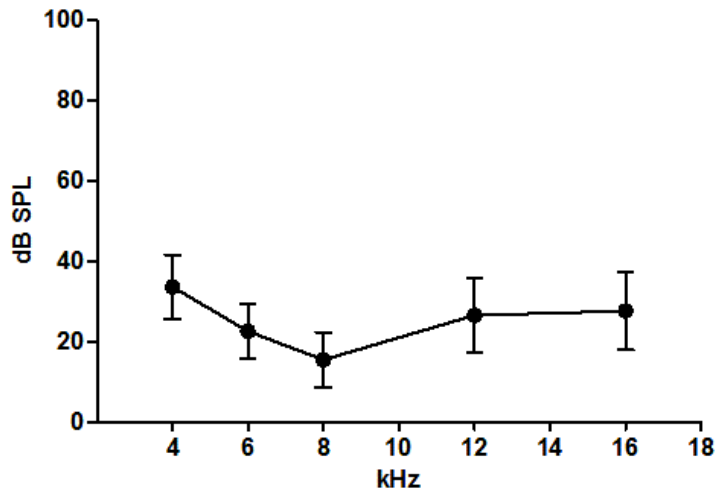


**Abbildung 7: Hörschwellen der Brn3.1 IRES Cre x R<sup>eYFP</sup> Linie bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL ± Standardabweichung

#### 4.1.1.6 Brn3.1 IRES Cre x R<sup>LacZ</sup>

Auch Nachkommen der Verkreuzung der konditionellen Cre Linie mit der zweiten Reporterlinie präsentierten normale BERA-Antworten und die Hörschwellen waren charakteristisch am höchsten bei 4 kHz und am niedrigsten bei 8 kHz. Die ermittelten Schwellen für die einzelnen Frequenzen sind im Folgenden gelistet: 4 kHz: 33,7 ± 7,9 dB SPL; 6 kHz: 22,6 ± 6,8 dB SPL; 8 kHz: 15,5 ± 6,9 dB SPL; 12 kHz: 26,6 ± 9,2 dB SPL; 16 kHz: 27,7 ± 9,8 dB SPL (n=5, Abb. 8).



**Abbildung 8: Hörschwellen der Brn3.1 IRES Cre x R<sup>LacZ</sup> Linie bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL ± Standardabweichung

Die Hörschwellen aller verwendeten Linien bei den einzelnen Frequenzen sind in der folgenden Tabelle nochmals zusammengefasst.

**Tabelle 1: Hörschwellen der sechs verwendeten Linien bei fünf Frequenzen in dB SPL.**

	4 kHz	6 kHz	8 kHz	12 kHz	16 kHz
<b>C57BL/6</b>	39,5 ± 6,4	29,6 ± 5,5	23,8 ± 10,8	31,4 ± 7,3	39,0 ± 6,8
<b>Brn3.1 IRES Cre</b>	36,3 ± 4,2	32,2 ± 11,0	22,2 ± 11,4	27,8 ± 3,6	30,3 ± 8,9
<b>R<sup>eYFP</sup></b>	36,0 ± 3,8	21,0 ± 2,1	17,0 ± 5,9	32,3 ± 4,5	25,5 ± 8,3
<b>R<sup>LacZ</sup></b>	35,8 ± 9,0	23,3 ± 6,9	20,0 ± 10,9	30,4 ± 12,8	32,1 ± 15,5
<b>Brn3.1 IRES Cre x R<sup>eYFP</sup></b>	32,5 ± 2,5	23,3 ± 3,2	14,6 ± 4,0	25,0 ± 7,5	25,0 ± 4,5
<b>Brn3.1 IRES Cre x R<sup>LacZ</sup></b>	33,7 ± 7,9	22,6 ± 6,8	15,5 ± 6,9	26,6 ± 9,2	27,7 ± 9,8

Mittelwerte in dB SPL ± Standardabweichung

#### 4.1.2 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen (DPOAE)

Alle Linien wurden ebenfalls auf das Auftreten von distorsiv produzierten otoakustischen

Emissionen hin untersucht. Diese konnten in allen Linien bei allen getesteten Frequenzen ausgelöst werden. Die expliziten Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

#### 4.1.2.1 C57BL/6

In dieser Linie konnten bei allen vier untersuchten Frequenzen distorsiv produzierte otoakustische Emissionen ausgelöst werden. Beginnend in dieser Linie zeigte sich, dass für das Auslösen von DPOAEs bei 8 kHz und 16 kHz niedrigere Schalldruckpegel nötig waren als bei 12 kHz bzw. 20 kHz. Die expliziten Auslöse-SPL waren für die einzelnen Frequenzen die Folgenden: 8 kHz:  $29,1 \pm 17,8$  dB SPL; 12 kHz:  $44,8 \pm 17,5$  dB SPL; 16 kHz:  $35,7 \pm 18,4$  dB SPL; 20 kHz:  $53,5 \pm 12,5$  dB SPL (n=4, Tab. 2).

#### 4.1.2.2 Brn3.1 IRES Cre

Auch in der konditionellen Cre Rekombinase-Linie zeigte sich, dass DPOAEs bei 8 kHz und 16 kHz mit niedrigeren SPL ausgelöst werden konnten, als bei den anderen beiden Frequenzen. DPOAEs konnten aber in allen Frequenzen registriert werden. Im Einzelnen waren folgende SPL dazu nötig: 8 kHz:  $23,1 \pm 5,5$  dB SPL; 12 kHz:  $30,6 \pm 18,6$  dB SPL; 16 kHz:  $25,0 \pm 12,1$  dB SPL; 20 kHz:  $44,7 \pm 8,4$  dB SPL (n=4, Tab. 2).

#### 4.1.2.3 R<sup>eYFP</sup>

Wie bereits in der Hirnstammaudiometrie unterschieden sich die beiden untersuchten Reporterlinien nicht von der C57BL/6 Linie. DPOAEs konnten bei allen Frequenzen ausgelöst werden; bei 12 kHz und 20 kHz waren dafür höhere SPL nötig als bei 8 kHz und 16 kHz. Die Auslöseschwellen waren wie folgt: 8 kHz:  $21,6 \pm 10,3$  dB SPL; 12 kHz:  $47,5 \pm 17,6$  dB SPL; 16 kHz:  $27,2 \pm 9,7$  dB SPL; 20 kHz:  $42,2 \pm 7,8$  dB SPL (n=4, Tab. 2).

#### 4.1.2.4 R<sup>LacZ</sup>

Die zweite Reporterlinie zeigte ebenfalls keine Unterschiede im DPOAE-Verhalten zu den anderen Linien. In allen Frequenzen waren diese auszulösen, nach demselben Muster wie bereits in den anderen Linien gezeigt. Im Einzelnen ergaben sich folgende

Auslöseschwellen: 8 kHz:  $24,4 \pm 17,1$  dB SPL; 12 kHz:  $47,1 \pm 16,5$  dB SPL; 16 kHz:  $31,8 \pm 25,9$  dB SPL; 20 kHz:  $39,2 \pm 22,7$  dB SPL (n=3, Tab. 2).

#### 4.1.2.5 Brn3.1 IRES Cre x R<sup>eYFP</sup>

Die F1-Nachkommen aus der Verkreuzung der neuen konditionellen Cre Rekombinase-Linie und der R<sup>eYFP</sup>-Linie zeigten ebenfalls ein unauffälliges Antwortverhalten bei den distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen. In allen Frequenzen konnten DPOAEs ab den folgenden SPLs ausgelöst werden: 8 kHz:  $16,3 \pm 11,3$  dB SPL; 12 kHz:  $42,5 \pm 19,5$  dB SPL; 16 kHz:  $26,3 \pm 7,6$  dB SPL; 20 kHz:  $46,3 \pm 3,3$  dB SPL (n=3, Tab. 2).

#### 4.1.2.6 Brn3.1 IRES Cre x R<sup>LacZ</sup>

Auch die F1-Nachkommen aus der Verkreuzung der Brn3.1 IRES Cre Linie mit der zweiten Reporterlinie R<sup>LacZ</sup> präsentierten sich unauffällig in ihrem DPOAE-Antwortverhalten. Wie in allen vorherigen Linien zeigte sich auch hier, dass bei 8 kHz und 16 kHz geringere dB SPL nötig waren, um eine Antwort auszulösen. Die Auslöseschwellen lauteten im Einzelnen: 8 kHz:  $22,2 \pm 11,5$  dB SPL; 12 kHz:  $39,6 \pm 9,1$  dB SPL; 16 kHz:  $29,7 \pm 10,0$  dB SPL; 20 kHz:  $50,4 \pm 12,5$  dB SPL (n=5, Tab. 2).

Alle Werte sind in der folgenden Tabelle nochmal zusammengefasst.

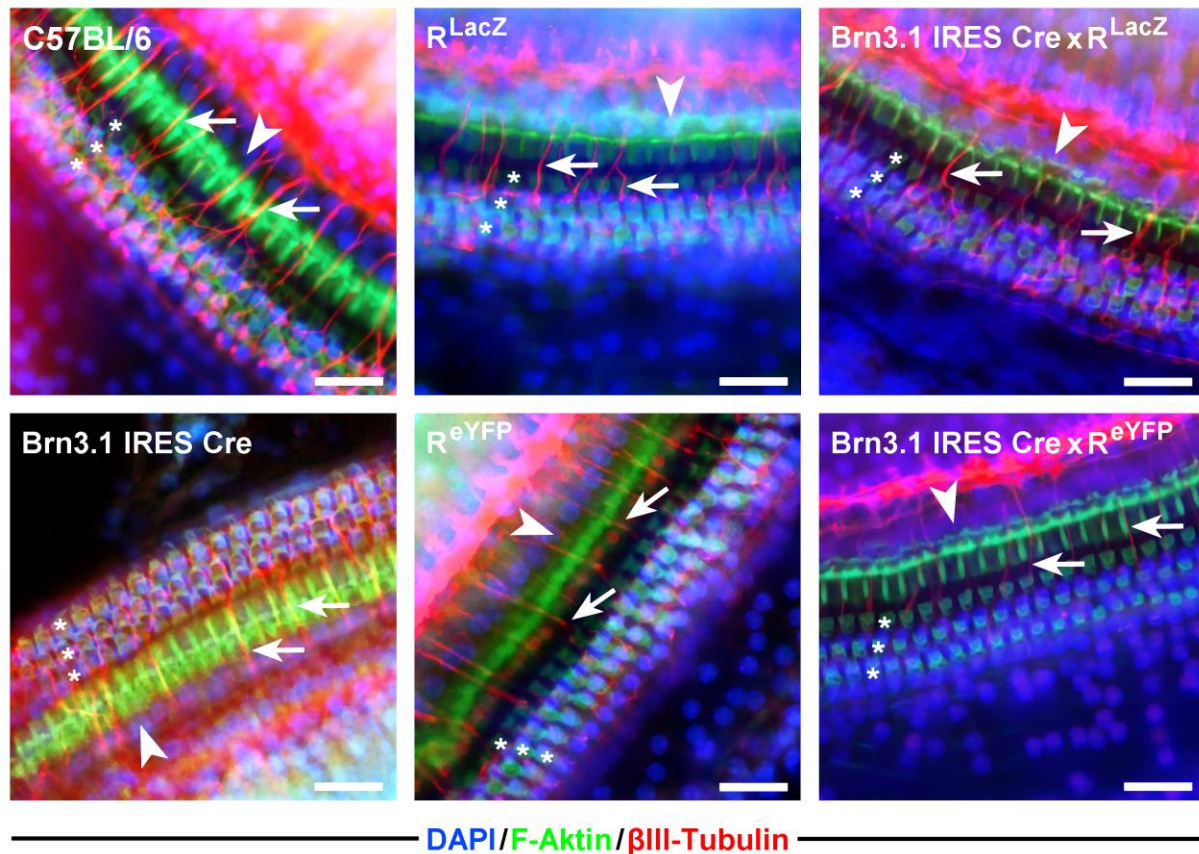
**Tabelle 2: Auslöseschwellen für distorsiv produzierte otoakustische Emissionen in den sechs untersuchten Linien in dB SPL.**

	8 kHz	12 kHz	16 kHz	20 kHz
<b>C57BL/6</b>	$29,1 \pm 17,8$	$44,8 \pm 17,5$	$35,7 \pm 18,4$	$53,5 \pm 12,5$
<b>Brn3.1 IRES Cre</b>	$23,1 \pm 5,5$	$30,6 \pm 18,6$	$25,0 \pm 12,1$	$44,7 \pm 8,4$
<b>R<sup>eYFP</sup></b>	$21,6 \pm 10,3$	$47,5 \pm 17,6$	$27,2 \pm 9,7$	$42,2 \pm 7,8$
<b>R<sup>LacZ</sup></b>	$24,4 \pm 17,1$	$47,1 \pm 16,5$	$31,8 \pm 25,9$	$39,2 \pm 22,7$
<b>Brn3.1 IRES Cre x R<sup>eYFP</sup></b>	$16,3 \pm 11,3$	$42,5 \pm 19,5$	$26,3 \pm 7,6$	$46,3 \pm 3,3$
<b>Brn3.1 IRES Cre x R<sup>LacZ</sup></b>	$22,2 \pm 11,5$	$39,6 \pm 9,1$	$29,7 \pm 10,0$	$50,4 \pm 12,5$

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

## 4.2 Morphologischer Vergleich des Corti'schen Organes aller elektrophysiologisch untersuchten Linien

Von allen elektrophysiologisch untersuchten Linien wurden Wholemoundpräparate des Corti'schen Organes angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Alle Linien zeigten keine Pathophysiologien des Corti'schen Organes. Es waren jeweils eine Reihe innerer Haarzellen (Abb. 9, Pfeilspitzen) und drei Reihen äußerer Haarzellen (Asteriske), sowie die Axone der auditorischen Neurone, welche den Corti-Tunnel durchspannen (Pfeile), zu erkennen.



**Abbildung 9: Immunhistochemisch gefärbte Wholemoundpräparate des Corti'schen Organes aller elektrophysiologisch untersuchten Linien.**

Alle untersuchten Linien zeigten drei Reihen äußerer Haarzellen (Asteriske) und eine Reihe innerer Haarzellen (Pfeilspitzen). Die Axone der Typ II auditorischen Neurone (Pfeile) durchzogen den Corti-Tunnel und innervierten die äußeren Haarzellen. Maßstab: 25  $\mu$ M

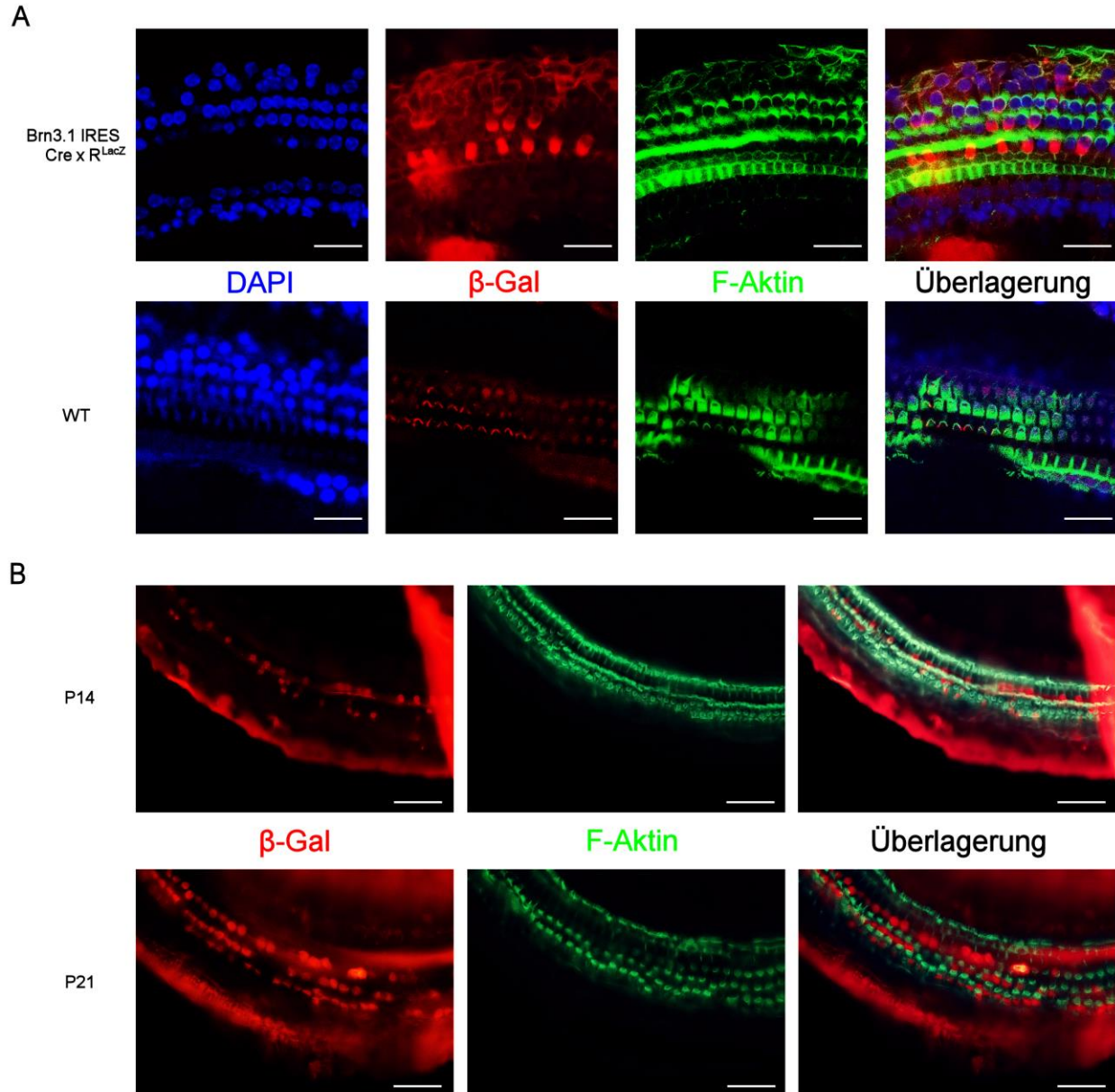
### 4.3 Expressionsverhalten von Cre Rekombinase unter dem Promotor Brn3.1

#### 4.3.1 Expressionsverhalten von Brn3.1 Cre zu verschiedenen Zeitpunkten

Das Expressionsverhalten von Brn3.1 Cre sollte sowohl im zeitlichen Verlauf als auch in der örtlichen Verteilung untersucht werden. Hierfür wurden Mäuse transgen für Brn3.1 IRES Cre mit den beiden Reporterlinien  $R^{eYFP}$  und  $R^{LacZ}$  verkreuzt.

Die F1-Nachkommen aus diesen Verpaarungen wurden zu unterschiedlichen postnatalen Zeitpunkten aufgearbeitet. Die F1-Nachkommen der Verkreuzung Brn3.1 IRES Cre x  $R^{eYFP}$  wurden postnatal an Tag P2, P6, P8, P11, P23, P28, P83, P85 und die F1-Nachkommen von Brn3.1 IRES Cre x  $R^{LacZ}$  an Tag P3, P9, P11, P12, P14, P15, P21, P73, P74 und P81 untersucht.

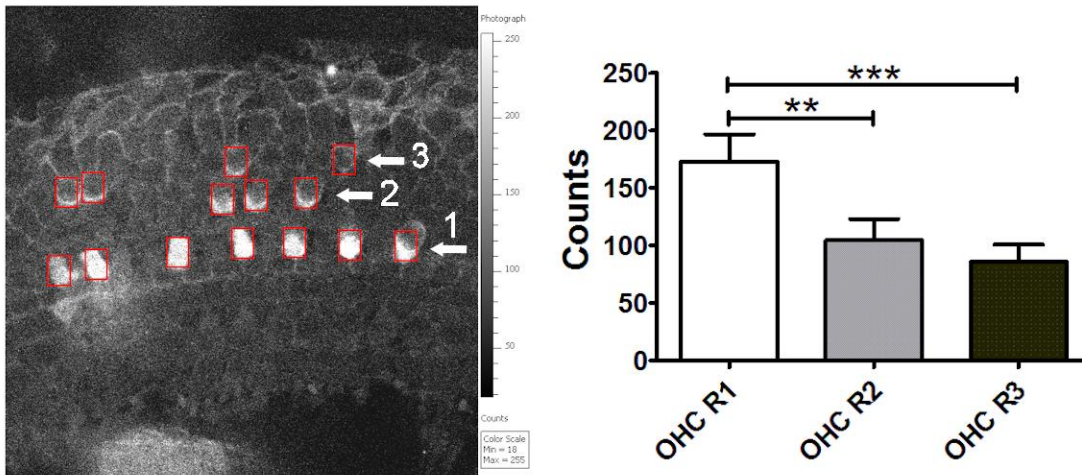
Es konnte nur zu zwei verschiedenen postnatalen Zeitpunkten (P14 und P21) durch Verkreuzung mit der  $R^{LacZ}$  Linie eine Aktivität des *LacZ* Reportergens gezeigt werden (Abb. 10 B). Zu beiden Zeitpunkten konnte das Reporterprotein in mosaikartiger Form in einzelnen Zellen der drei äußeren Haarzellreihen, jedoch nicht in den inneren Haarzellen nachgewiesen werden (Abb. 10 A & B). Die Expression des Reporterproteins konnte postnatal nicht früher als P14 aufgezeigt werden. In Brn3.1 IRES Cre x  $R^{eYFP}$  Verkreuzungen war es nicht möglich, eine Expression des Reporterproteins nachzuweisen.



**Abbildung 10: Expression von  $\beta$ -Galactosidase in äußeren Haarzellen von Mäusen der F1-Generation der Verkreuzung Brn3.1 IRES Cre und R<sup>LacZ</sup>.**

A)  $\beta$ -Galactosidase Aktivität war in einigen äußeren Haarzellen in F1-Nachkommen, welche transgen sowohl für Brn3.1 IRES Cre als auch den LacZ-Reporter sind, zu beobachten. In inneren Haarzellen und anderen Strukturen des Corti'schen Organes war keine  $\beta$ -Galactosidase nachweisbar. Wildtyp-F1-Nachkommen zeigten keine  $\beta$ -Galactosidase Aktivität. B)  $\beta$ -Galactosidase konnte in Wholemoundpräparaten des Corti'schen Organes bei Mäusen transgen für Brn3.1 IRES Cre und den LacZ-Reporter postnatal nur zu den Zeitpunkten P14 und P21 durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.  $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galactosidase, WT: Wildtyp, Maßstab: A) 20  $\mu$ m, B) 25  $\mu$ m

Auch erschien die Expression des Reporterproteins zwischen den einzelnen Zellen unterschiedlich kräftig ausgeprägt (siehe Abb. 11). Eine Analyse der Fluoreszenzcounts der Cre exprimierenden Zellen der äußeren Haarzellen je Reihe bestätigte dies. Die exprimierenden Zellen der innersten der drei äußeren Haarzellreihen (Abb. 11 ←1 bzw. OHC R1) zeigten dabei signifikant ( $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ ) höhere Werte ( $172,9 \pm 24,2$ ) als die Haarzellen der Reihen R2 ( $104,7 \pm 18,6$ ) und R3 ( $85,8 \pm 15,3$ ).



**Abbildung 11: Auswertung der Cre Rekombinase Expression je äußerer Haarzellreihe.**

OHC: outer hair cell (äußere Haarzelle), rote Kästchen: ROIs (*region of interest*) der Fluoreszenzcounts, R: Reihe. Werte  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.3.2 Diskrepanz zwischen Genotypisierungsergebnissen und Expressionsverhalten

Eine Auffälligkeit zeigte sich bei der Untersuchung der Verkreuzungen aus der Brn3.1 IRES Cre Linie mit den Reporterlinien. Diese Tiere wurden parallel zur Aufarbeitung der Cochleae mittels Schwanzbiopsien, welche unmittelbar vor der Immersions- bzw. Perfusionsfixierung genommen wurden, sowohl auf Brn3.1 IRES Cre als auch den entsprechenden Reporter genotypisiert. Die für die Auswertung infrage kommenden Tiere mussten transgen für beide Gene sein.

Die Auswertung der Wholemountexplantate des Corti'schen Organes dieser doppelt transgenen Tiere ergab jedoch, dass trotz des über die Biopsie ermittelten positiven Genotyps die Mehrzahl dieser Tiere keine Expression des jeweiligen Reporterproteins zeigten. Der in der Genotypisierung bestätigte Genotyp war kein Garant für eine entsprechend nachzuweisende Expression im untersuchten Gewebe. Wie weiter oben

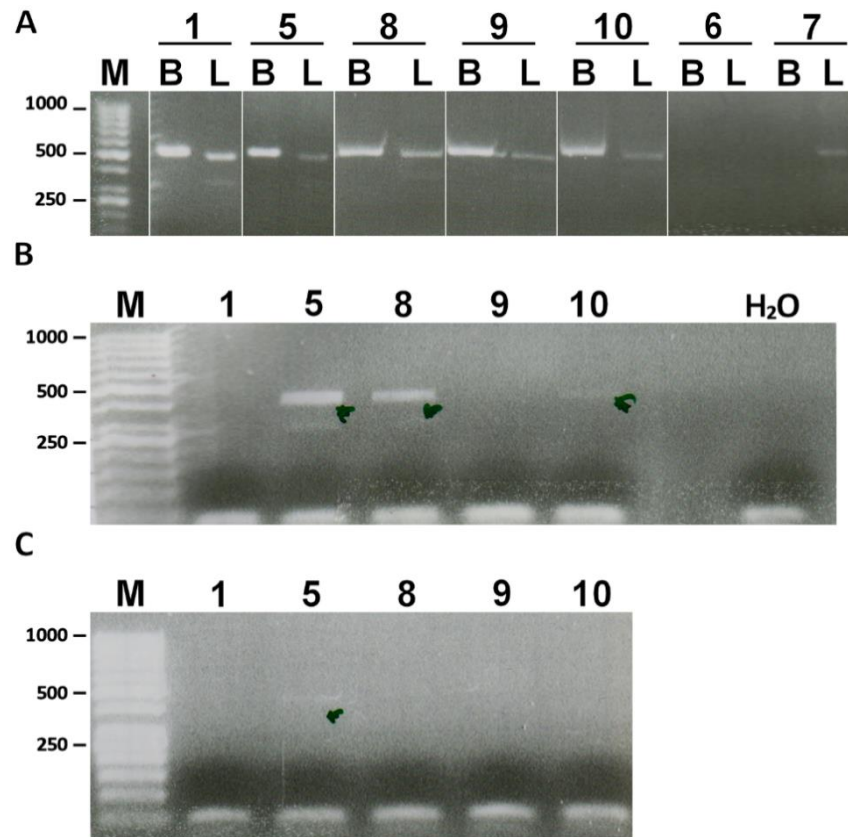


erläutert, war dieser Nachweis nur zu P14 und P21 möglich und auch in diesen Würfen zeigten nicht alle Tiere, die laut Genotypisierung doppelt transgen waren, die entsprechende Expression des Reporterproteins in den Haarzellen.

Diese Diskrepanz zwischen der tatsächlich beobachteten Aktivität von Cre Rekombinase im Gewebe und dessen über die Genotypisierung gefolgerte Aktivität sollte mit Hilfe einer Reverse-Transkriptase-PCR nachgewiesen werden. Die Transkription eines Genes kann nachgewiesen werden, indem die dabei entstandene RNA untersucht wird. Damit diese durch DNA-Polymerasen bei einer PCR amplifiziert werden kann, muss sie zuerst mit Hilfe der Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) umgeschrieben werden.

Es wurden Schwanzbiopsien eines Wurfes Brn3.1 IRES Cre x R<sup>LacZ</sup> genommen und aus ihnen DNA für die Genotypisierung isoliert. Die Corti'schen Organe beider Cochleae jedes Tieres wurden gepoolt und aus ihnen RNA isoliert. Die RNA wurde revers transkribiert in cDNA und eine RT-PCR mit den Primern für *LacZ* durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgeführt, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Die entstandenen Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 12).

Die Genotypisierung der Schwanzbiopsien zeigte fünf Tiere (Abb. 12 A, 1, 5, 8, 9, 10), welche transgen sowohl für Brn3.1 IRES Cre als auch den LacZ-Reporter waren. Von diesen fünf Tieren zeigten nur zwei Tiere (Abb. 12 B, 5 und 8) auch in der RT-PCR LacZ-Expression, also RNA-Transkripte des Gens im Gewebe. In Probe 5 konnte eine leichte Verunreinigung durch genomische DNA festgestellt werden (Abb. 12 C).



**Abbildung 12: Ergebnisse von DNA-Genotypisierung und RNA RT-PCR desselben Wurfes zur Klärung geringer LacZ-Expression in Wholemoutpräparaten.**

A) DNA-Genotypisierungsergebnis aus Schwanzbiopsien eines Wurfes Brn3.1 IRES Cre x  $R^{LacZ}$ . Tier 1, 5, 8, 9 und 10 zeigten in beiden Spuren Banden bei 500 bp und waren somit transgen für Brn3.1 (B) und LacZ (L). Zum Vergleich: Tier 7 zeigte nur in der LacZ-Spur eine 500 bp Bande und Tier 6 zeigte weder in der Spur für Brn3.1 noch LacZ eine Bande. B) RT-PCR Ergebnis von RNA isoliert aus den Corti'schen Organen derselben Tiere unter A). Von den doppelt transgenen Tieren (1, 5, 8, 9, 10) zeigten nur 5 und 8 500 bp Banden für LacZ Expression im Corti'schen Organ. C) RT-PCR Ansatz ohne Reverse Transkriptase zur Kontrolle der Verunreinigung mit gDNA. In Spur 5 war eine 500 bp Bande zu erkennen, was auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA hinwies. B: Brn3.1 IRES Cre, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, L: LacZ, M: Marker

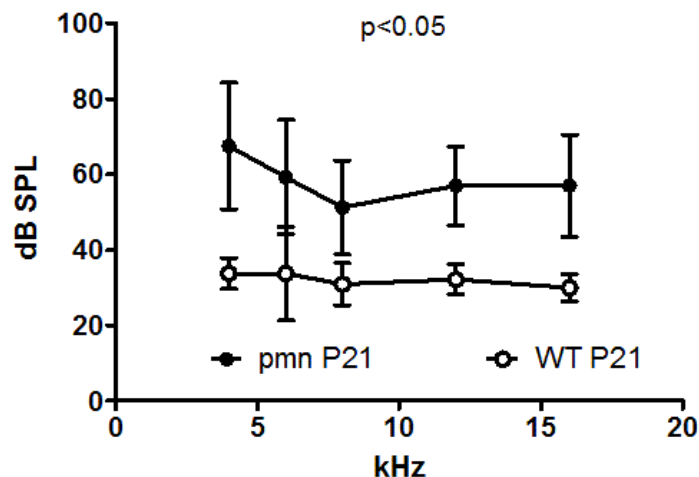
#### 4.4 Evaluation des bestehenden Mausmodells pmn für den Einsatz zur Erforschung der auditorischen Neuropathie

##### 4.4.1 Audiologische Evaluation der pmn Maus mittels Hirnstammaudiometrie (BERA)

Ein Hörverlust bei der pmn Maus war in einer vorangegangenen Studie durch eine Untersuchung mit einer click-BERA gezeigt worden [73]. Die jetzige Untersuchung wurde

durchgeführt, um zu evaluieren, ob dieser Hörverlust frequenzspezifisch ist. Pmn-Tiere und Wildtypen wurden dafür zu drei Zeitpunkten mit einer BERA bei fünf Frequenzen untersucht. Mäuse zeigen ab P14 adulte Antwortschwellen und Tuningkurven, wobei sich bis P18 die Latenz der Antworten verkürzt und die Cochlea sowie der Nucleus Cochlearis bis zum Ende des zweiten Lebensmonats morphologischen Änderungen unterworfen ist [77, 78]. Als Untersuchungszeitpunkte wurden deshalb P21, P28 und P35 gewählt. Längere Untersuchungsperioden waren durch die kurze Lebensdauer der pmn Maus nicht möglich [65].

Bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt P21 zeigten pmn-Tiere gegenüber Wildtyp-Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte Hörschwellen in allen fünf getesteten Frequenzen. Die Schwellen lagen in allen Frequenzen bei den pmn-Tieren über 50 dB SPL (n=5, 4 kHz:  $67,5 \pm 16,8$  dB SPL; 6 kHz:  $59,3 \pm 15,1$  dB SPL, 8 kHz:  $51,3 \pm 12,4$  dB SPL; 12 kHz:  $57,0 \pm 10,4$  dB SPL; 16 kHz:  $57,0 \pm 13,5$  dB SPL), während die Kontrollen in denselben Frequenzen Hörschwellen zwischen 30 und 35 dB SPL (n=5, 4 kHz:  $33,8 \pm 4,2$  dB SPL; 6 kHz:  $33,8 \pm 12,5$  dB SPL; 8 kHz:  $30,9 \pm 5,6$  dB SPL; 12 kHz:  $32,2 \pm 4,0$  dB SPL; 16 kHz:  $30,0 \pm 3,6$  dB SPL) zeigten (Abb. 13).

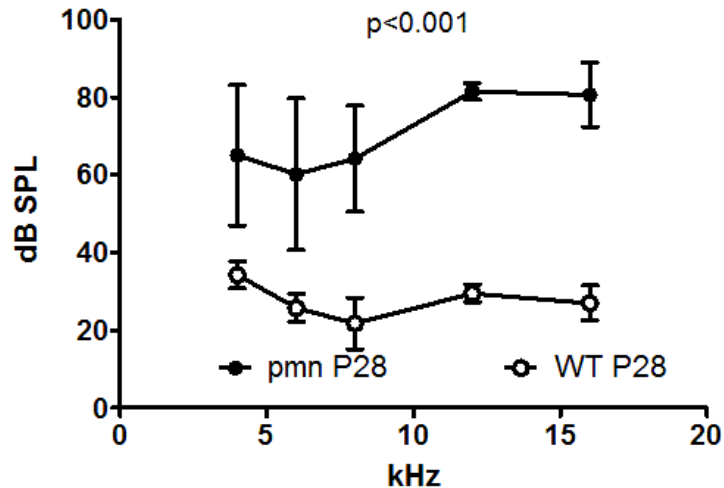


**Abbildung 13: Hörschwellen von pmn- und WT-Mäusen im Alter von P21 bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

Dieser Unterschied im Hörvermögen zwischen Wildtyp und pmn-Maus zeigte sich zu den späteren Zeitpunkten noch ausgeprägter ( $p < 0,001$ ). Zum Zeitpunkt P28 lagen die Hörschwellen in pmn-Mäusen für die drei Frequenzen 4, 6 und 8 kHz bei über 60 dB SPL

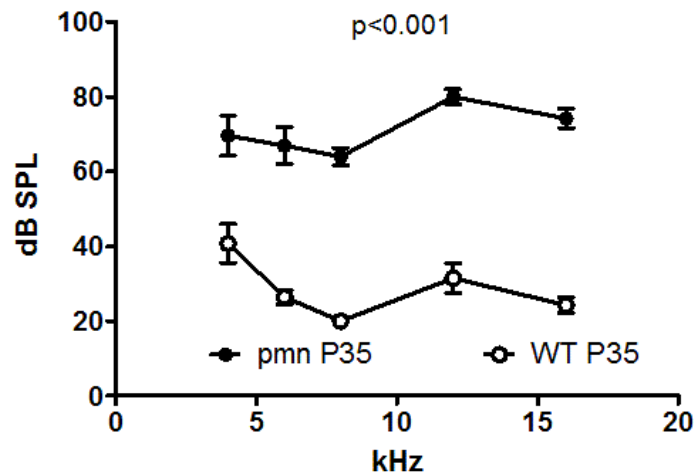
(n=6, 4 kHz:  $65,0 \pm 18,1$  dB SPL; 6 kHz  $60,2 \pm 19,5$  dB SPL; 8 kHz:  $64,2 \pm 13,7$  dB SPL) und für 12 und 16 kHz im Mittel bei über 80 dB SPL (12 kHz:  $81,5 \pm 2,2$  dB SPL; 16 kHz  $80,6 \pm 8,2$  dB SPL). Wildtyp-Kontrollen hingegen zeigten deutlich niedrigere Hörschwellen in allen Frequenzen, die zwischen 20 und 35 dB SPL lagen (n=5, 4 kHz:  $34,3 \pm 2,2$  dB SPL; 6 kHz:  $25,8 \pm 3,6$  dB SPL; 8 kHz:  $21,8 \pm 6,6$  dB SPL; 12 kHz:  $29,5 \pm 2,3$  dB SPL; 16 kHz:  $27,0 \pm 4,5$  dB SPL) (Abb. 14).



**Abbildung 14: Hörschwellen von pmn- und WT-Mäusen im Alter von P28 bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

Zwischen P28 und P35 veränderten sich die Hörschwellen in der pmn-Maus kaum und lagen im Alter von 5 Wochen bei etwa denselben Werten wie bei P28 (n=6, 4 kHz:  $69,6 \pm 13,0$  dB SPL; 6 kHz:  $66,9 \pm 12,0$  dB SPL; 8 kHz:  $64,0 \pm 5,7$  dB SPL; 12 kHz:  $80,0 \pm 4,7$  dB SPL; 16 kHz:  $74,2 \pm 6,2$  dB SPL). Dasselbe Bild zeigte sich bei den Wildtyp-Kontrollen, die ebenfalls ähnliche Hörschwellen wie bei P28 aufwiesen (n=5, 4 kHz:  $40,8 \pm 11,4$  dB SPL; 6 kHz:  $26,5 \pm 4,3$  dB SPL; 8 kHz:  $20,0 \pm 3,1$  dB SPL; 12 kHz:  $31,5 \pm 8,9$  dB SPL; 16 kHz:  $24,3 \pm 4,6$  dB SPL) (Abb. 15).



**Abbildung 15: Hörschwellen von pmn- und WT-Mäusen im Alter von P35 bei fünf Frequenzen.**

Mittelwerte in dB SPL  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.4.2 Audiologische Evaluation der pmn-Maus mittels distorsiv produzierter otoakustischer Emissionen (DPOAE)

Pmn-Mäuse und Wildtyp-Kontrollen wurden ebenfalls auf das Auftreten von distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen untersucht. DPOAEs ließen sich bei pmn-Mäusen kaum auslösen. Zum Zeitpunkt P21 war dies nur bei 8 kHz ( $46,8 \pm 12,4$  dB SPL,  $n=6$ ) und 16 kHz ( $55,6 \pm 8,3$  dB SPL) möglich. Zu den beiden späteren Zeitpunkten war dies nur noch bei 8 kHz möglich (P28:  $52,9 \pm 12,2$  dB SPL,  $n=6$ ; P35:  $54,8 \pm 12,2$  dB SPL,  $n=6$ ). Wildtyp-Kontrollen zeigten hingegen bei allen drei Zeitpunkten (P21, P28 und P35) in allen vier untersuchten Frequenzen DPOAEs. Die Auslöseschwellen waren wie folgt für P21: 8 kHz:  $21,7 \pm 11,5$  dB SPL; 12 kHz:  $34,1 \pm 6,7$  dB SPL; 16 kHz:  $26,8 \pm 7,6$  dB SPL; 20 kHz  $33,3 \pm 7,1$  dB SPL ( $n=5$ , Tab. 3). Zum Zeitpunkt P28 (8 kHz:  $17,8 \pm 4,4$  dB SPL; 12 kHz:  $30,5 \pm 4,8$  dB SPL; 16 kHz:  $20,2 \pm 4,9$  dB SPL; 20 kHz:  $30,0 \pm 7,1$  dB SPL) ( $n=5$ , Tab. 4) und P35 (8 kHz:  $25,0 \pm 5,9$  dB SPL; 12 kHz:  $41,1 \pm 10,7$  dB SPL; 16 kHz:  $22,9 \pm 6,6$  dB SPL; 20 kHz:  $31,2 \pm 6,2$  dB SPL) ( $n=6$ , Tab. 5) waren die Auslösewerte ähnlich wie zum ersten Zeitpunkt.

**Tabelle 3: Auslöseschwellen von DPOAEs zum Zeitpunkt P21 in Wildtyp- und pmn-Mäusen.**

Postnataler Tag 21		8 kHz	12 kHz	16 kHz	20 kHz
WT	OAE	+	+	+	+
	dB SPL	21,7 ± 11,5	34,1 ± 6,7	26,8 ± 7,6	33,3 ± 7,1
pmn	OAE	+	-	+	-
	dB SPL	46,8 ± 12,4	-	55,6 ± 8,3	-

Mittelwerte in dB SPL ± Standardabweichung

**Tabelle 4: Auslöseschwellen von DPOAEs zum Zeitpunkt P28 in Wildtyp- und pmn-Mäusen.**

Postnataler Tag 28		8 kHz	12 kHz	16 kHz	20 kHz
WT	OAE	+	+	+	+
	dB SPL	17,8 ± 4,4	30,5 ± 4,8	20,2 ± 4,9	30,0 ± 7,1
pmn	OAE	+	-	-	-
	dB SPL	52,9 ± 12,2	-	-	-

Mittelwerte in dB SPL ± Standardabweichung

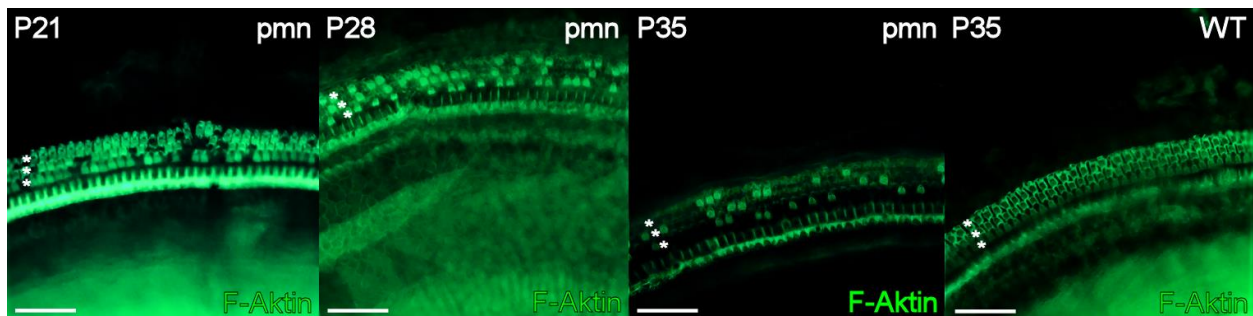
**Tabelle 5: Auslöseschwellen von DPOAEs zum Zeitpunkt P35 in Wildtyp- und pmn-Mäusen.**

Postnataler Tag 35		8 kHz	12 kHz	16 kHz	20 kHz
WT	OAE	+	+	+	+
	dB SPL	25,0 ± 5,9	41,1 ± 10,7	22,9 ± 6,6	31,5 ± 6,2
pmn	OAE	+	-	-	-
	dB SPL	54,8 ± 12,2	-	-	-

Mittelwerte in dB SPL ± Standardabweichung

#### 4.4.3 Morphologie des Corti'schen Organes der pmn-Maus

In Wholemoundpräparaten des Corti'schen Organes von drei Wochen alten pmn-Mäusen zeigte sich bereits ein deutlicher Verlust von äußeren Haarzellen in allen drei Reihen in mosaikartiger Weise, während die Reihe der inneren Haarzellen davon nicht betroffen war (Abb. 16). Im Alter von vier Wochen manifestierte sich dieser Haarzellschaden der drei äußeren Reihen deutlich. Bei fünf Wochen alten Tieren waren nur noch wenige der äußeren Haarzellen präsent. Bei den inneren Haarzellen gab es ebenfalls verlorengegangene Zellen, allerdings in weit weniger ausgeprägtem Maße als bei den äußeren Haarzellen. Wildtyp-Kontrollen zeigten zu allen drei Zeitpunkten eine normale morphologische Erscheinung des Corti'schen Organes mit intakten drei Reihen äußerer Haarzellen und einer Reihe innerer Haarzellen (Abb. 16).

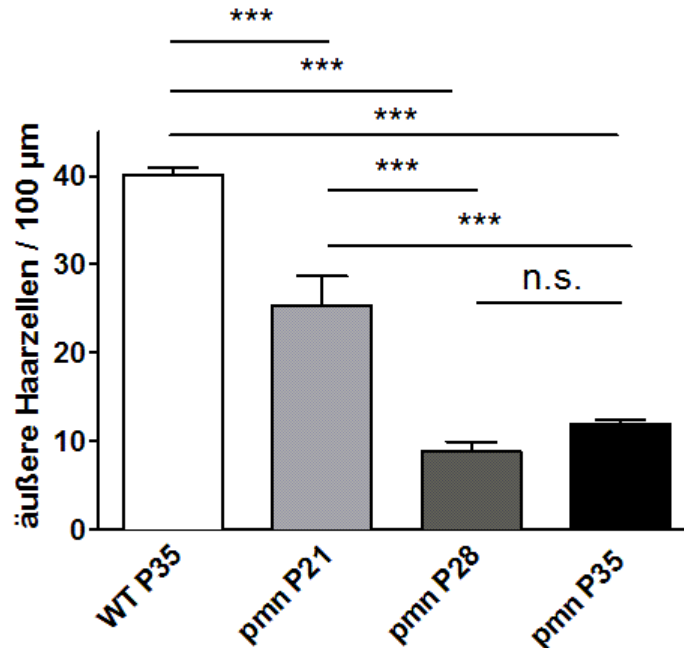


**Abbildung 16: Vergleich von Wholemound-Präparationen des Corti'schen Organes der pmn-Maus zu den Zeitpunkten P21, P28 und P35 mit dem Wildtyp zum Zeitpunkt P35.**

\*: äußere Haarzellreihen, Maßstab: 50 µm.

##### 4.4.3.1 Quantitative Auswertung des Haarzellverlustes

Zum Zeitpunkt P21 war die Anzahl der äußeren Haarzellen in pmn-Mäusen ( $25,39 \pm 3,318/100\mu\text{m}$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $40,11 \pm 0,79/100\mu\text{m}$ ) signifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert. Mit zunehmendem Alter der pmn-Tiere verringerte sich die Anzahl der äußeren Haarzellen weiterhin. Zum Zeitpunkt P28 betrug die Anzahl der äußeren Haarzellen in pmn-Tieren nur noch  $8,81 \pm 1,16/100\mu\text{m}$ . Dies war eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Verminderung im Vergleich zum Zeitpunkt P21 und zum Wildtyp (P28). Auch zum letzten Zeitpunkt P35 war die Anzahl der äußeren Haarzellen in pmn-Mäusen ( $11,99 \pm 0,40/100\mu\text{m}$ ) signifikant ( $p < 0,001$ ) verringert verglichen mit Wildtyp und P21 (Abb. 17).



**Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl äußerer Haarzellen pro 100  $\mu\text{m}$  bei pmn-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur Wildtyp-Maus.**

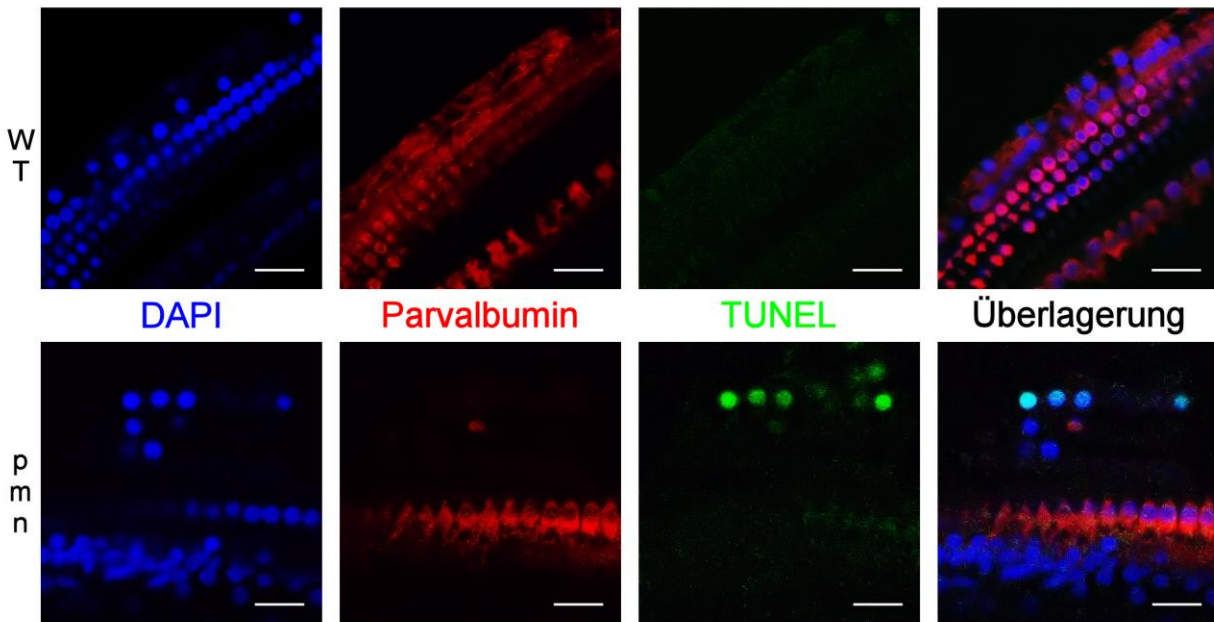
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.4.3.2 TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Assay

Eine Untersuchung mit Hilfe des TUNEL-Assays sollte zeigen, ob der beobachtete Verlust der äußeren Haarzellen in homozygoten pmn-Mäusen durch Apoptose zustande kommt. Hierzu wurde der Assay mit einem *in situ* cell death detection kit an Wholamount-Explantaten und Kryoschnitten des Corti'schen Organes dieser Tiere durchgeführt

In den homozygoten Mäusen konnte eine TUNEL-Färbung in den äußeren Haarzellen beobachtet werden. Die mit Parvalbumin angefärbten inneren Haarzellen hingegen zeigten keine TUNEL-Färbung (Abb. 18).





**Abbildung 18: TUNEL-Assay an Wholemount-Präparaten des Corti'schen Organes von pmn- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt P35.**

Mit dem TUNEL-Assay konnte in den äußeren Haarzellen der pmn-Maus (untere Reihe) Apoptose nachgewiesen werden, wohingegen in WT-Kontrollen keine Färbung auftrat. Die Zellkerne wurden mit DAPI und die inneren Haarzellen mit Parvalbumin angefärbt. Maßstab: 20 µm.

#### 4.4.4 TBCE-Nachweis im Corti'schen Organ

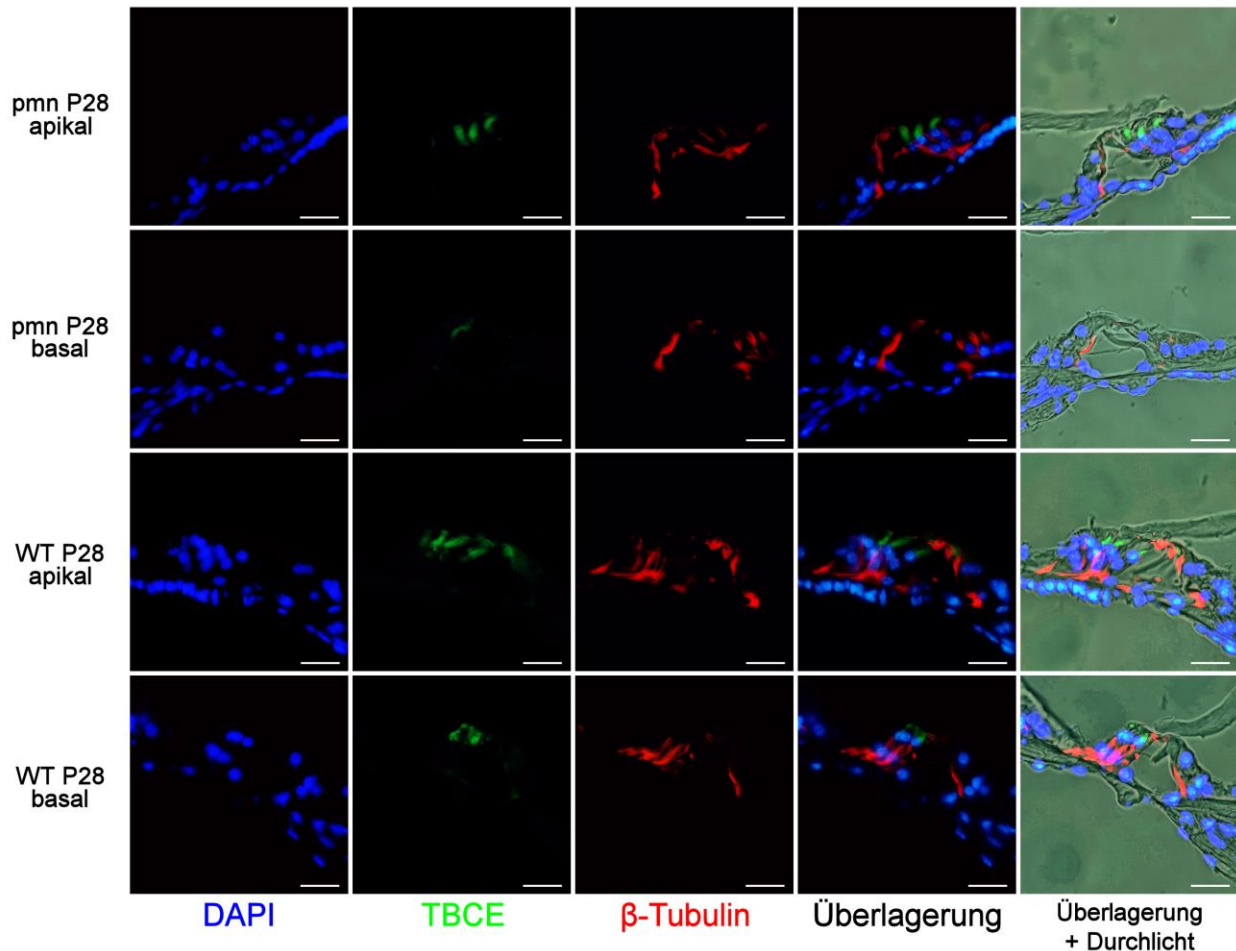
Die Mutation im *TBCE* Gen bewirkt eine Aminosäuresubstitution im fertigen Protein, welches dadurch instabiler ist als die Wildtypform und zu einer Reduktion des Proteingehalts in bestimmten Geweben von betroffenen Tieren führt [79]. Im Zusammenhang mit dem beobachteten Haarzellverlust sollte die genaue Verteilung dieses Proteins in der Cochlea untersucht werden. Zusätzlich sollte evaluiert werden, ob sich das Verteilungsmuster des Proteins durch die Mutation ändert.

Die TBCE-Protein Expression war in der pmn-Maus und im Wildtyp tier auf das Corti'sche Organ und dort auf spezifische Strukturen beschränkt. Im Hörnerv und in den Neuronen des Ganglion spirale konnte das Protein nicht nachgewiesen werden.

Im Cortischen Organ von Wildtyp Tieren wurde das TBCE-Protein spezifisch in den äußeren Haarzellen und in den inneren Stützzellen exprimiert. In den inneren Haarzellen konnte keine Expression des TBCE-Proteins beobachtet werden.

TBCE war in den äußeren Haarzellen in der gesamten Zelle nachzuweisen (Abb. 19 &

20 B WT). In den inneren Stützzellen war die TBCE-Expression auf die Region des transzellulären Bündels beschränkt und kolokalisierte dort mit den Tubulinbündeln im apikalen Bereich (Abb. 19 & 20 B WT).



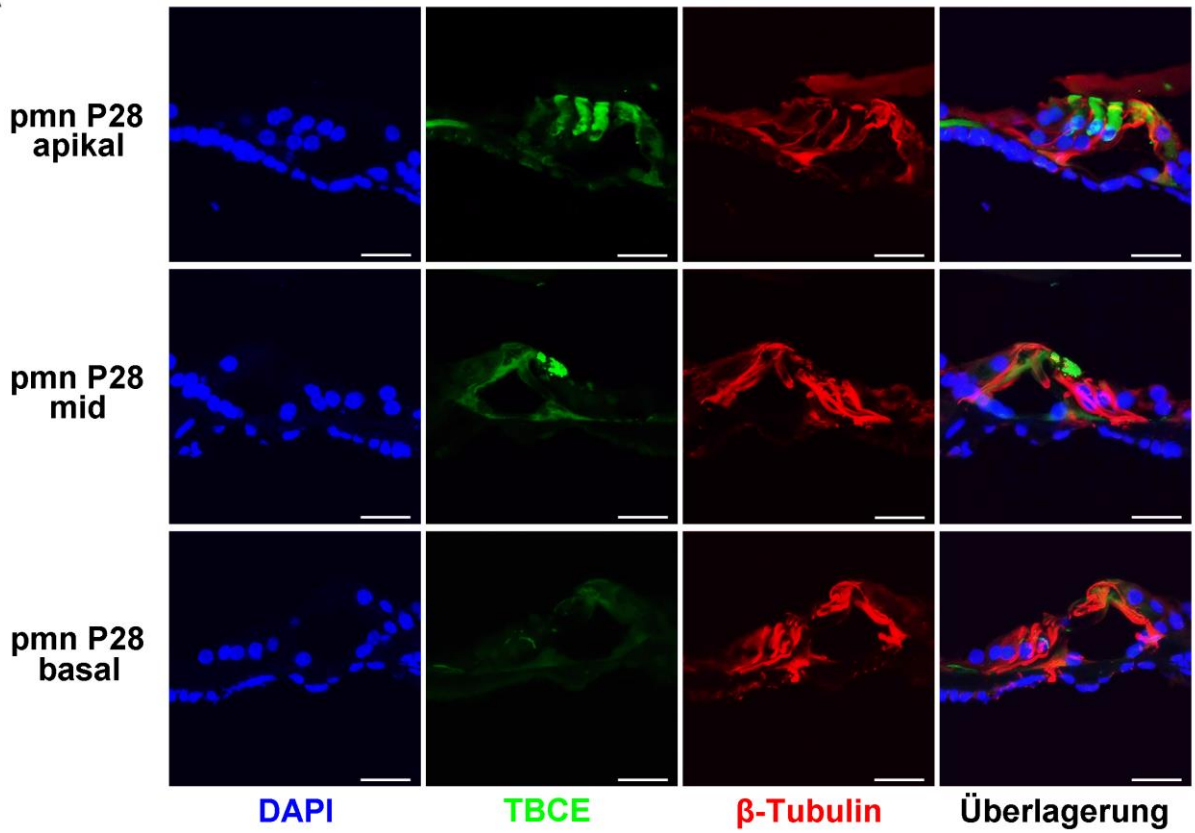
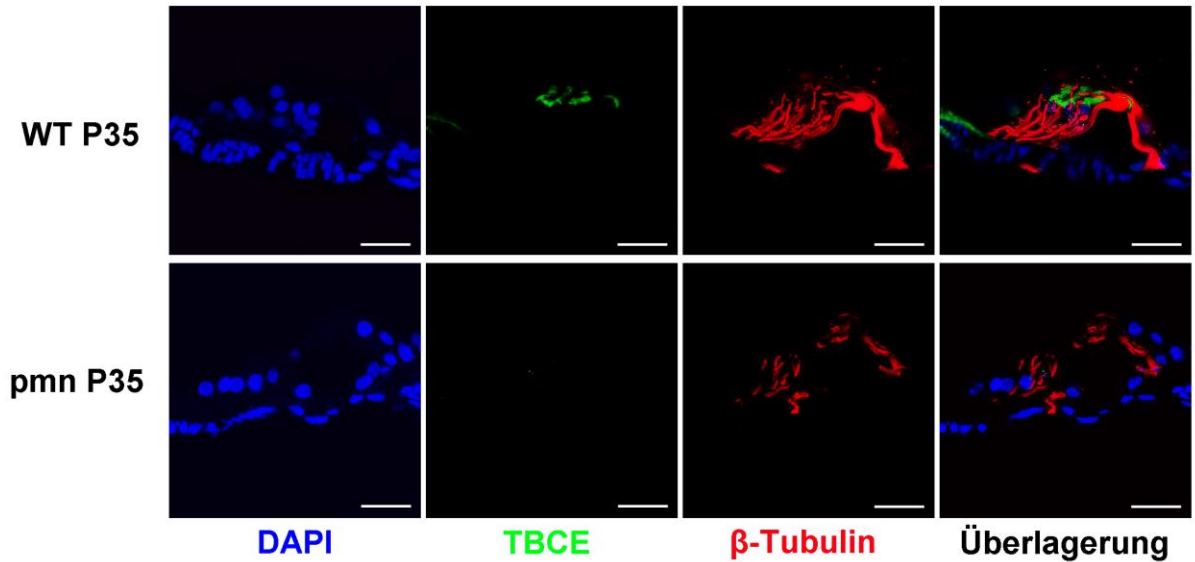
**Abbildung 19: TBCE Nachweis im apikalen und basalen Teil des Corti'schen Organes bei pmn- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt P28.**

TBCE war bei pmn- und WT-Tieren in den äußeren Haarzellen und den inneren Stützzellen nachweisbar. Während bei pmn-Mäusen zum Zeitpunkt P28 im apikalen Bereich der Cochlea TBCE in den äußeren Haarzellen exprimiert wurde, waren im basalen Bereich die äußeren Haarzellen bereits degeneriert und es hatte sich ein flaches Epithel ausgebildet. Es waren nur noch die Zellkerne der Deiters-Zellen zu erkennen, auf denen die äußeren Haarzellen aufsaßen. Maßstab: 25  $\mu$ m

Der Nachweis von TBCE in pmn-Mäusen war durch die Degeneration der Strukturen im Corti'schen Organ beeinträchtigt (Abb. 19 pmn P28 basal). In den verbliebenen äußeren Haarzellen ließ sich das TBCE-Protein jedoch nachweisen. Zum letzten untersuchten Zeitpunkt P35 waren die äußeren Haarzellen, wie bereits beschrieben, weitestgehend

degeneriert und an deren Stelle hatte sich ein flaches Epithel ausgebildet (Abb. 20 B). Dieses wurde durch die tubulären Strukturen der Deiters-Zellen gebildet, auf denen die Haarzellen vormals aufsaßen. Die Kolo-kalisation von TBCE mit den apikalen Tubulinbündeln der inneren Stützzellen war zu diesem Zeitpunkt weiterhin zu beobachten (Abb. 20 A & B).

Untersuchungen an Cochlea-Schnitten zu P28 zeigten ein differenzierteres Bild der Proteinverteilung. Diese ging einher mit dem apikal-basalen Verlauf der Degeneration des Corti'schen Organes (Abb. 20 A). In der apikalen Windung war TBCE in der pmn-Maus wie im Wildtyp in den äußeren Haarzellen und in den inneren Stützzellen nachzuweisen. In der mittleren Windung gab es sowohl Bereiche mit normaler TBCE-Verteilung, wie in der apikalen Windung, als auch Bereiche mit akut apoptotischen Haarzellen. Dort kolokalisierte das TBCE mit den kondensierten Nuclei der apoptotischen Zellen. In der basalen Windung waren die äußeren Haarzellen bereits komplett degeneriert und es hatte sich ein flaches Epithel ausgebildet (Abb. 20 A). Dort war TBCE nur noch im apikalen Bereich der inneren Stützzellen nachzuweisen.

**A****B**

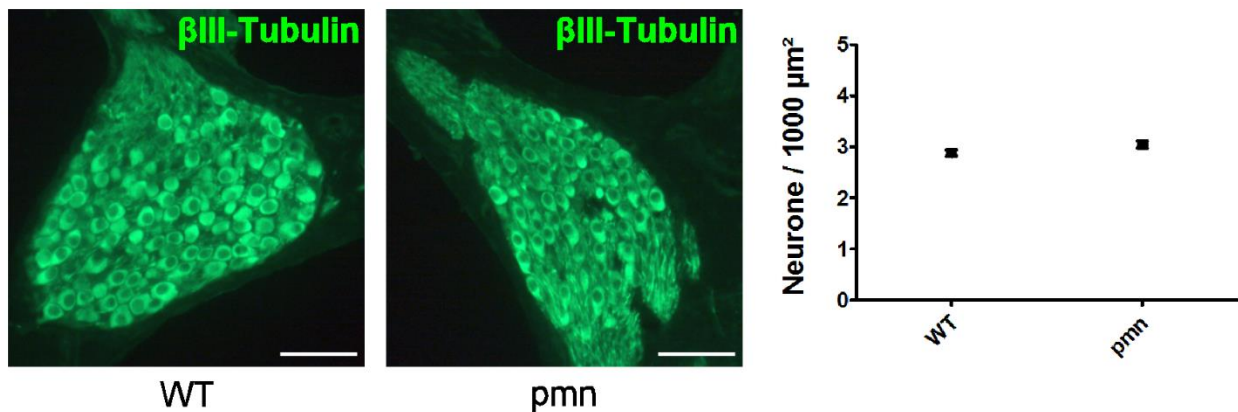
**Abbildung 20: TBCE Nachweis im Corti'schen Organ der pmn-Maus zum Zeitpunkt P28 im apikal-basalen Verlauf der Cochlea und Vergleich der TBCE-Verteilung zwischen pmn- und WT- Mäusen zum Zeitpunkt P35.**

A) In der apikalen Windung konnte TBCE in der pmn-Maus in den äußeren Haarzellen und dem apikalen Bereich der inneren Stützzellen nachgewiesen werden. Bereiche mit normaler TBCE-Verteilung, wie in der

apikalen Windung, und Bereiche mit apoptotischen Haarzellen wechselten sich in der mittleren Windung ab. In der basalen Windung waren die äußeren Haarzellen komplett degeneriert, stattdessen hatte sich ein flaches Epithel ausgebildet. B) Zum Zeitpunkt P35 konnte TBCE nur in WT-Mäusen nachgewiesen werden. In pmn-Tieren waren die äußeren Haarzellen in allen Windungen degeneriert. Maßstab: A: 25  $\mu$ M, B: 25  $\mu$ M.

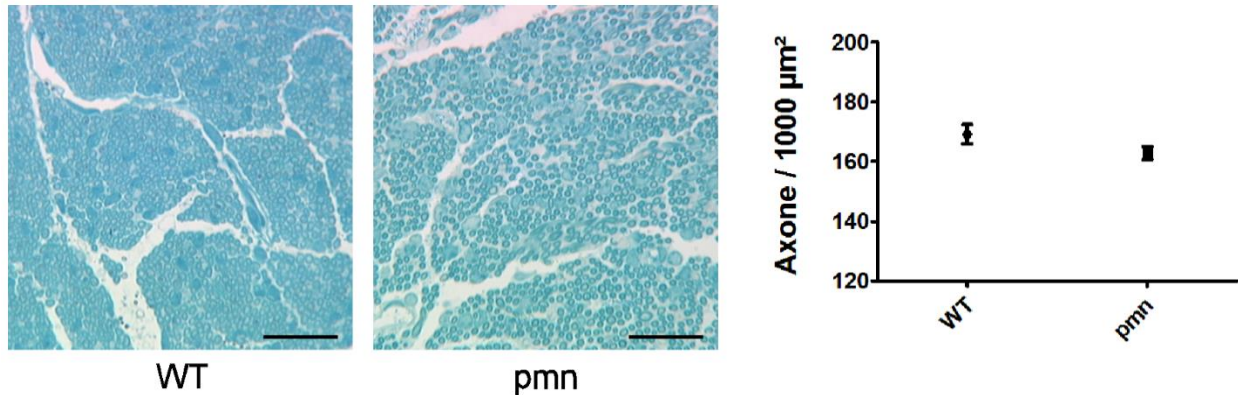
#### 4.4.5 Gestörte $\beta$ -III Tubulin Immunreaktivität und reduzierte Mikrotubulinanzahl in zentralen Axonen der auditorischen Neurone von pmn-Mäusen

Histologische Untersuchungen sollten zeigen, ob der im vorigen Abschnitt beschriebene Verlust von TBCE-Aktivität Einfluss auf den Hörnerv und die auditorischen Neurone hatte, da morphologische Defekte in der pmn-Maus bisher vorherrschend in Neuronen beschrieben worden waren [74, 80]. Die Somata der auditorischen Neurone zeigten keine morphologischen Unterschiede zwischen pmn- und Wildtyp-Tieren (Abb. 21). Die Anzahl der auditorischen Neurone bei pmn-Maus ( $3,04 \pm 0,07/1000\mu\text{m}^2$ ) und Wildtyp ( $2,88 \pm 0,06/1000\mu\text{m}^2$ ) war vergleichbar (Abb. 21). Ebenfalls unterschied sich die Anzahl der auditorischen Nervenfasern zwischen Wildtyp ( $169,2 \pm 11,35/1000\mu\text{m}^2$ ) und pmn-Maus nicht ( $162,9 \pm 7,58/1000\mu\text{m}^2$ ) (Abb. 22).



**Abbildung 21: Vergleich der Anzahl der auditorischen Neurone von WT- und pmn-Mäusen.**

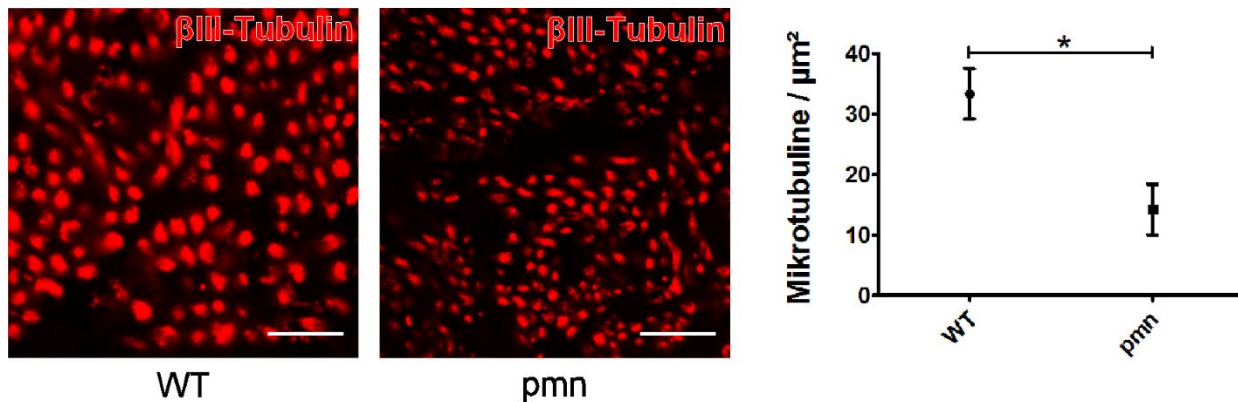
Die Morphologie und Anzahl der auditorischen Neurone war zwischen pmn- und WT-Mäusen gleich.



**Abbildung 22: Vergleich der auditorischen Nervenfasern von WT- und pmn-Mäusen.**

Die Anzahl der auditorischen Nervenfasern war zwischen pmn- und WT-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich.

Die Anzahl der Mikrotubuli in den Axonen war bei pmn-Mäusen signifikant reduziert, ( $14,24 \pm 4,190 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,05$ ) verglichen zum Wildtyp ( $33,35 \pm 4,212 \mu\text{m}^2$ ) (Abb. 23).



**Abbildung 23: Vergleich der Anzahl der Mikrotubuli von WT- und pmn-Mäusen.**

Die Anzahl der Mikrotubuli in den Axonen des Hörnervs waren in der pmn-Maus signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp.

#### 4.5 Generierung einer gliazellfreien Kultur dissoziierter auditorischer Neurone für dosisabhängige Untersuchungen von Neurotrophenen

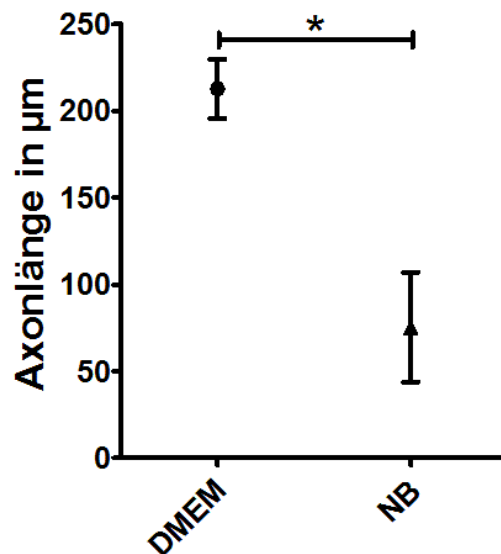
Während *in vitro* Modelle die Möglichkeit bieten, ganzheitliche Veränderung im Organismus direkt zu erforschen, können einzelne Aspekte wie dosisabhängige Veränderungen einfacher in Zellkulturen untersucht werden. Dabei bietet sich die Möglichkeit, Prozesse, welche bei vorhandenen Hörstörungen ablaufen, besser verstehen zu können.

Hierzu sollten mehrere Variablen untersucht werden, um deren Einfluss auf die Generierung einer gliazellfreien Kultur von dissoziierten auditorischen Neuronen zu klären. Dabei handelte es sich bei diesen Kulturen meist um einen Mix verschiedener Zelltypen, was zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. Verglichen wurden in allen Untersuchungen drei Aspekte: Die Gesamtzellzahl, die Axonlänge der bipolaren Neurone in  $\mu\text{m}$  und deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl. In einzelnen Fällen werden weitere Daten zur genaueren Erläuterung der Ergebnisse dargestellt.

#### 4.5.1 Medium

Als erste Variable wurde die Wahl des Wachstumsmediums untersucht. Hierfür wurden Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Neurobasal-Medium (NB) miteinander verglichen. Die Ausplattierung erfolgte dabei versuchstechnisch bedingt generell in DMEM. Der Wechsel zum jeweiligen Testmedium erfolgte nach 1 h, sobald die Zellen sich gesetzt hatten.

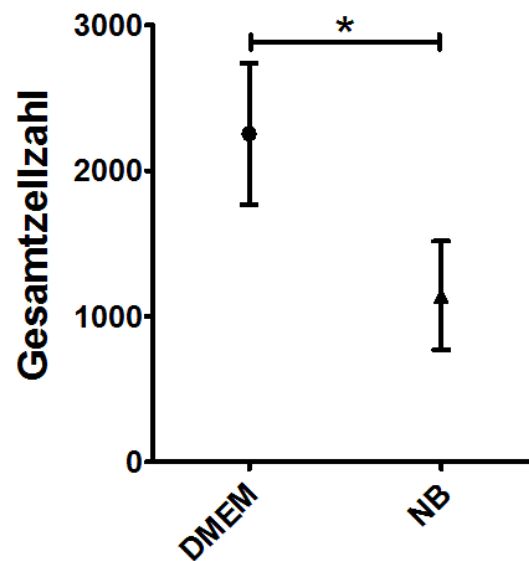
Bei der Evaluation der Länge der Axone zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den beiden Medien. Während in DMEM die Axone eine mittlere Länge von  $212,7 \pm 17,1 \mu\text{m}$  erreichten, betrug die durchschnittliche Länge in NB  $75,4 \pm 31,6 \mu\text{m}$  (Abb. 24,  $n=4$ ).



**Abbildung 24: Mittlere Axonlänge bipolarer Neurone in  $\mu\text{m}$  auf in DMEM- bzw. NB-Medium gewachsenen Deckgläschen.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Ein Unterschied zeigte sich auch in der Gesamtzahl der Zellen nach 4 Tagen in Kultur. In DMEM war diese mit  $2254,0 \pm 486,8$  Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) größer als bei NB-Kulturen ( $1144,0 \pm 373,4$ ) (Abb. 25,  $n=4$ ).

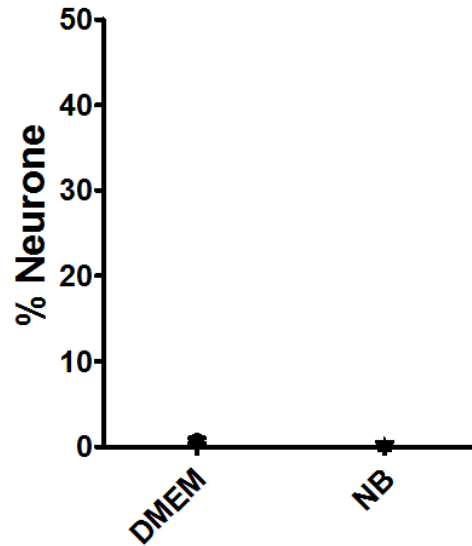


**Abbildung 25: Mittlere Gesamtzellzahl auf in DMEM- bzw. NB-Medium gewachsenen Deckgläschen.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Auf den Anteil der Neurone hatte keines der beiden Medien einen Einfluss. Der Anteil der Neurone war sowohl in DMEM-Kultur mit  $0,7 \pm 0,3$  % als auch in NB-Kultur mit  $0,3 \pm 0,2$  % an der Gesamtzellzahl gering, und es zeigte sich in diesem Punkt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medien (Abb. 26,  $n=4$ ).



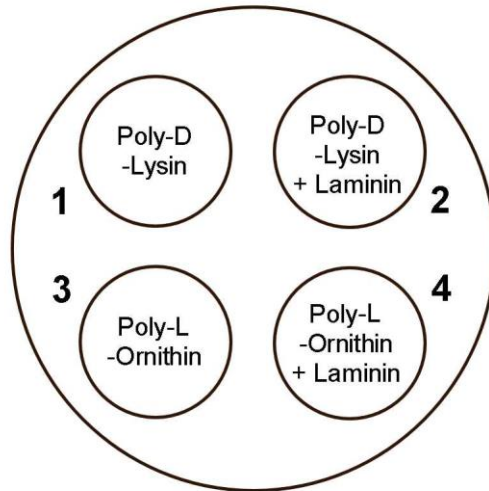


**Abbildung 26: Anteil der Neurone in Prozent auf in DMEM- bzw. NB-Medium gewachsenen Deckgläschen.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.5.2 Beschichtung der Deckgläschen

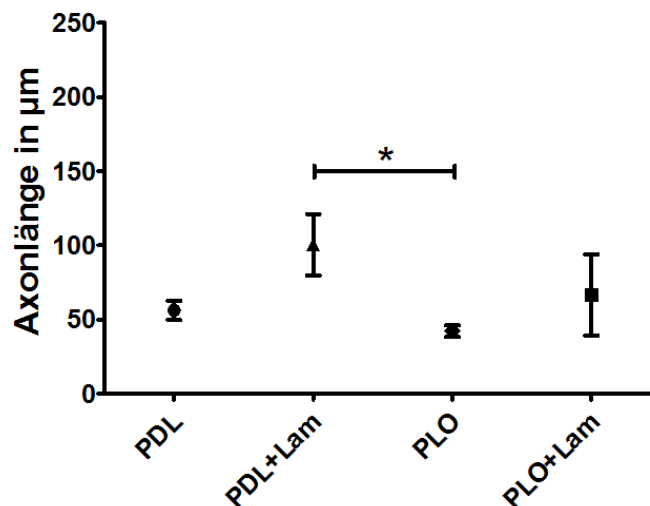
Zur Untersuchung des Einflusses der Beschichtung auf das Wachstum und den Anteil von Neuronen wurden vier verschiedene Beschichtungsvarianten getestet. Als Grundbeschichtung wurden für Deckgläschen 1 und 2 Poly-D-Lysin, für Deckgläschen 3 und 4 Poly-L-Ornithin verwendet. Zusätzlich wurden Deckgläschen 2 und 4 mit Laminin beschichtet (Abb. 27). Die Kultivierung erfolgte hierbei sowie in allen nachfolgenden Versuchsreihen in DMEM.



**Abbildung 27: Schemata der Deckgläschen in der Zellkulturschale mit den untersuchten Beschichtungsvarianten.**

Es zeigte sich, dass für das Längenwachstum die Art der Beschichtung unerheblich war. Alleinige Poly-D-Lysin- ( $56,2 \pm 6,4 \mu\text{m}$ ) oder Poly-L-Ornithin-Beschichtung ( $42,1 \pm 3,9 \mu\text{m}$ ) zeigte eine Tendenz zu kürzeren Axonen als mit zusätzlicher Laminin-Beschichtung (PDL+Lam:  $100,3 \pm 20,8 \mu\text{m}$ ; PLO+Lam:  $66,6 \pm 27,4 \mu\text{m}$ ), wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren.

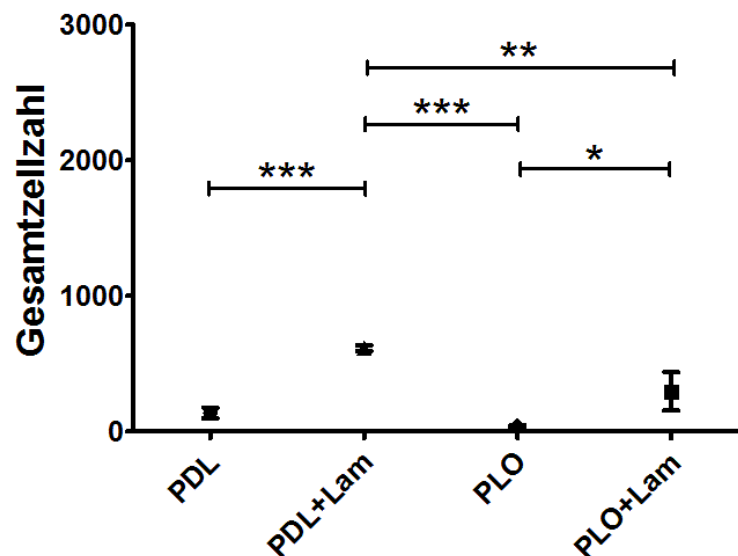
Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) war nur zwischen Poly-D-Lysin- + Laminin- und Poly-L-Ornithin-Beschichtung zu sehen (Abb. 28,  $n=3$ ).



**Abbildung 28: Mittlere Axonlänge bipolarer Neurone in  $\mu\text{m}$  auf mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin und Laminin beschichteten Deckgläschen.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

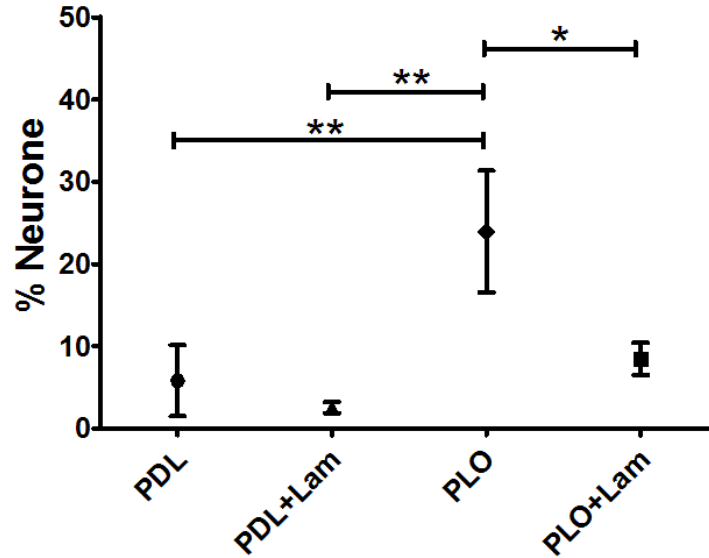
Im Vergleich der Gesamtzellzahl bei den verschiedenen Beschichtungsvarianten zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede. Dies ist in Abbildung 29 dargestellt (n=3). Die Anzahl überlebender Zellen auf Poly-D-Lysin ( $139,0 \pm 40,3$ ) und Poly-L-Ornithin ( $34,7 \pm 14,6$ ) war signifikant geringer als mit zusätzlicher Lamininbeschichtung (PDL+Lam  $615,3 \pm 21,5$ ; PLO+Lam  $297,7 \pm 141,9$ ). Auf Poly-D-Lysin + Laminin überlebten signifikant mehr Zellen als auf allen anderen Varianten (verglichen zu PDL und PLO  $p < 0,001$ , zu PLO+Lam  $p < 0,01$ ). Auch bei Poly-L-Ornithin überlebten mit zusätzlicher Lamininbeschichtung signifikant mehr Zellen ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 29: Mittlere Gesamtzellzahl auf mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin und Laminin beschichteten Deckgläschen.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Beim Vergleich des Neuronenanteils an der Gesamtzellzahl zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede. Poly-D-Lysin- + Laminin-beschichtete Deckgläschen wiesen einen Neuronenanteil von  $2,5 \pm 0,7$  % auf. Poly-D-Lysin- ( $5,8 \pm 4,3$  %) oder Poly-L-Ornithin- + Laminin-Beschichtung ( $8,5 \pm 2,0$  %) zeigten tendenziell einen höheren Neuronenanteil. Allein Poly-L-Ornithin-Beschichtung ( $23,9 \pm 7,3$  %) führte zu einem signifikant erhöhten Neuronenanteil (verglichen zu PDL und PDL+Lam:  $p < 0,01$ ; zu PLO:  $p < 0,05$ ) gegenüber allen anderen Beschichtungsvarianten (Abb. 30, n=3).



**Abbildung 30: Anteil der Neurone in Prozent auf mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin und Laminin beschichteten Deckgläschen.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

Abbildung 31 zeigt, wie sich dieser prozentuale Anteil sich in der reellen Anzahl der Neurone widerspiegelt (n=3). Während mit Poly-L-Ornithin-Beschichtung wie im vorherigen Abschnitt beschrieben der höchste prozentuale Anteil von Neuronen erreicht wurde, fanden sich mit  $26,7 \pm 18,0$  die höchste Zahl überlebender Neurone auf Poly-L-Ornithin- + Laminin-beschichteten Deckgläschen. Tendenziell führte eine zusätzliche Lamininbeschichtung zu einer höheren reellen Anzahl von Neuronen, wie sich auch bei Poly-D-Lysin- + Laminin zeigte ( $15,7 \pm 4,5$ ). Bei Beschichtung nur mit Poly-D-Lysin ( $7,0 \pm 3,6$ ) oder Poly-L-Ornithin ( $7,7 \pm 1,5$ ) überlebten tendenziell weniger Neurone.

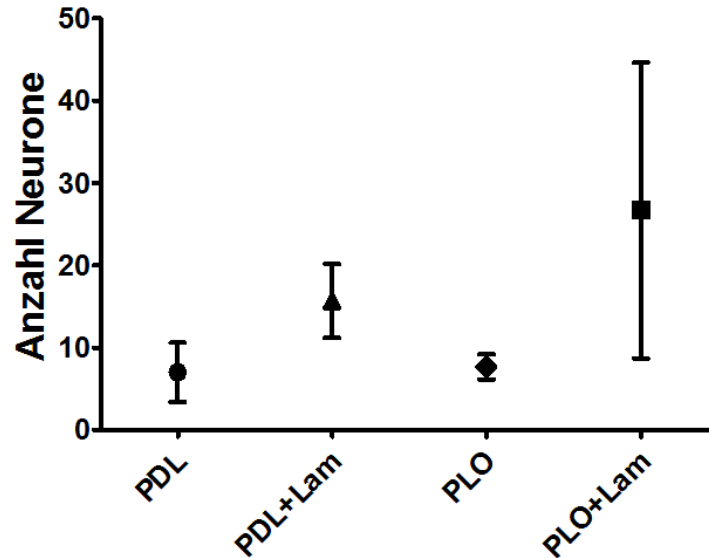


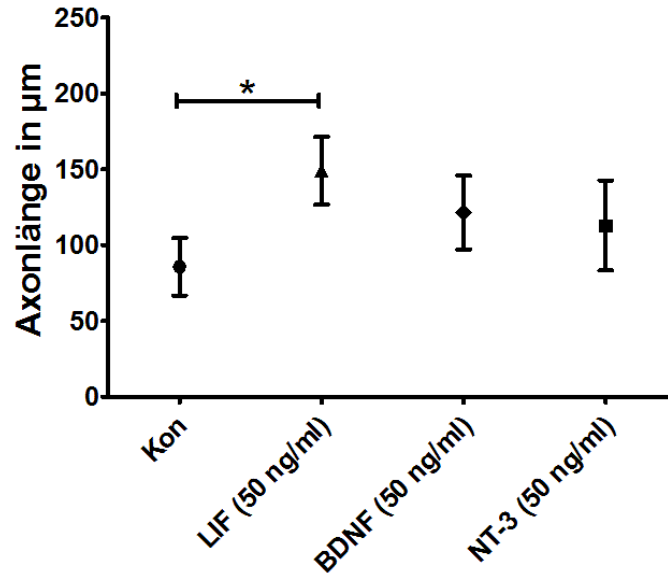
Abbildung 31: Reelle Anzahl von Neuronen bei verschiedenen Beschichtungsvarianten.

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.5.3 Einsatz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und neurotrophen Faktoren

In diesem Versuchsteil sollte getestet werden, welchen Einfluss die Applikation von Leukemia Inhibitory Factor bzw. der neurotrophen Faktoren Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) in einer Konzentration von 50 ng/ml auf die zu untersuchenden Variablen hatte. Als Kontrolle (Kon) wurden Zellen auf einem Deckgläschen in DMEM-Kultur mit PDL + Laminin ohne weitere Zusätze kultiviert.

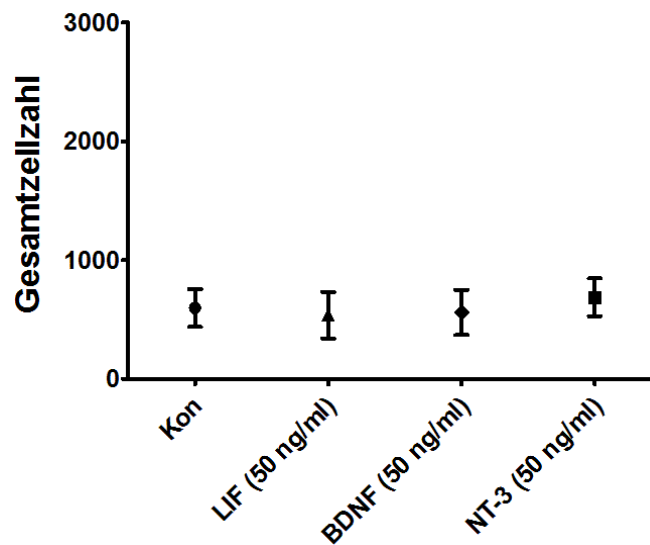
Die Kontrolle zeigte eine mittlere Axonlänge von  $85,7 \pm 19,0 \mu\text{m}$ , während die Gabe von BDNF zu einer Länge von  $121,5 \pm 24,3 \mu\text{m}$  und von NT-3 zu einer Länge von  $113,0 \pm 29,7 \mu\text{m}$  führte. Die mittlere Länge unter Gabe von LIF ( $149,1 \pm 22,4 \mu\text{m}$ ) war signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle, jedoch nicht gegenüber BDNF und NT-3 (Abb. 32,  $n=3$ ).



**Abbildung 32: Mittlere Axonlänge in µm in der Präsenz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) in der Konzentration 50 ng/ml.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

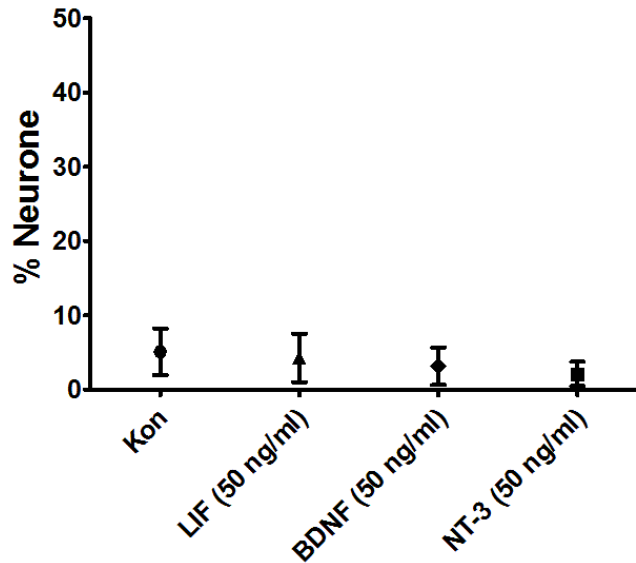
Auf die Gesamtzellzahl hatte keiner der untersuchten Faktoren einen Einfluss. Weder mit LIF ( $536,0 \pm 195,7$ ), noch mit BDNF ( $559,0 \pm 190,5$ ) oder NT-3 ( $686,0 \pm 158,9$ ) war die Gesamtmenge der Zellen signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ( $597,0 \pm 159,0$ ) (Abb. 33,  $n=3$ ).



**Abbildung 33: Mittlere Gesamtzellzahl in der Präsenz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) in der Konzentration 50 ng/ml.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

Auf den Prozentsatz der Neuronen hatte ebenfalls keiner der Faktoren einen signifikanten Einfluss. Die Kontrolle zeigte mit  $5,1 \pm 3,1$  % den höchsten Anteil an Neuronen, gefolgt von LIF ( $4,3 \pm 3,3$  %), BDNF ( $3,1 \pm 2,5$  %) und NT-3 ( $2,1 \pm 1,6$  %) (Abb. 34, n=3).



**Abbildung 34: Anteil der Neurone in Prozent in der Präsenz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Neurotrophin-3 (NT-3) in der Konzentration 50 ng/ml.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

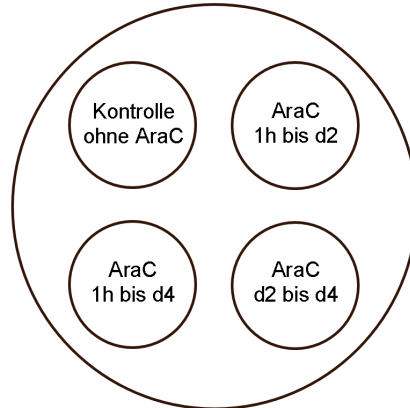
#### 4.5.4 Einsatz des Zytostatikums AraC (Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid)

Das Zytostatikum Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid hemmt die Zellteilung, indem es als „falsches“ Nukleosid in die DNA integriert wird und zusätzlich die DNA-Reparaturmechanismen hemmt. Daher kann Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid zur Proliferationshemmung von z.B. Gliazellen eingesetzt werden und dadurch den Neuronenanteil einer Zellkultur erhöhen.

##### 4.5.4.1 Dauer und Zeitraum der Applikation von AraC

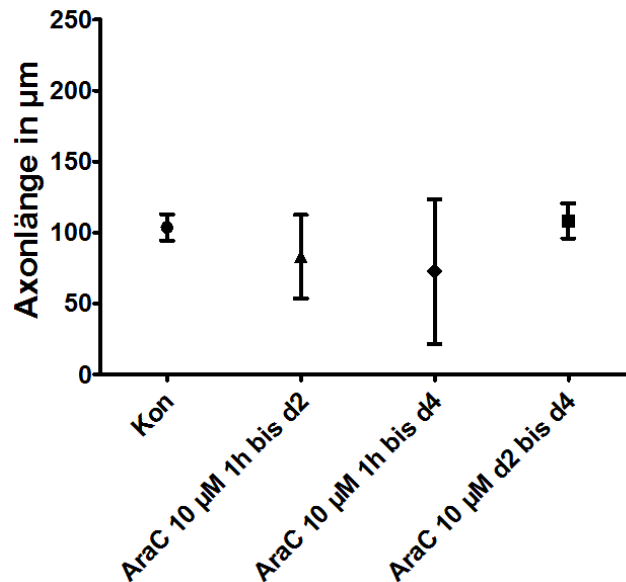
Die Dauer und der ideale Zeitraum nach dem Ausplattieren für die Applikation von AraC (10  $\mu$ M) sollte getestet werden. Folgende Zeiträume wurden gewählt: ab 1 h nach Ausplattieren der Zellen bis zum Mediumwechsel nach zwei Tagen (1 h bis d2), ab 1 h nach Ausplattieren bis zum Fixieren der Zellen nach 4 Tagen (1 h bis d4) und vom

Mediumwechsel nach 2 Tagen bis zum Fixieren nach 4 Tagen (d2 bis d4) (Abb. 35). Als Kontrolle dienten erneut Zellen auf einem Deckgläschen in DMEM-Kultur ohne weitere Zusätze.



**Abbildung 35: Schemata der Deckgläschen in der Zellkulturschale mit unterschiedlichen Applikationszeiträumen von AraC.**

Auf die mittlere Axonlänge hatten Zeitraum und Dauer der AraC-Gabe keinen Einfluss. Im Vergleich zur Kontrolle (Kon,  $103,5 \pm 9,3 \mu\text{m}$ ) waren die Axonlängen sowohl bei 1 h bis d2 ( $83,0 \pm 29,5 \mu\text{m}$ ) als auch bei 1 h bis d4 ( $72,5 \pm 50,9 \mu\text{m}$ ) und d2 bis d4 ( $108,2 \pm 12,4 \mu\text{m}$ ) nicht signifikant verändert (Abb. 36,  $n=3$ ).

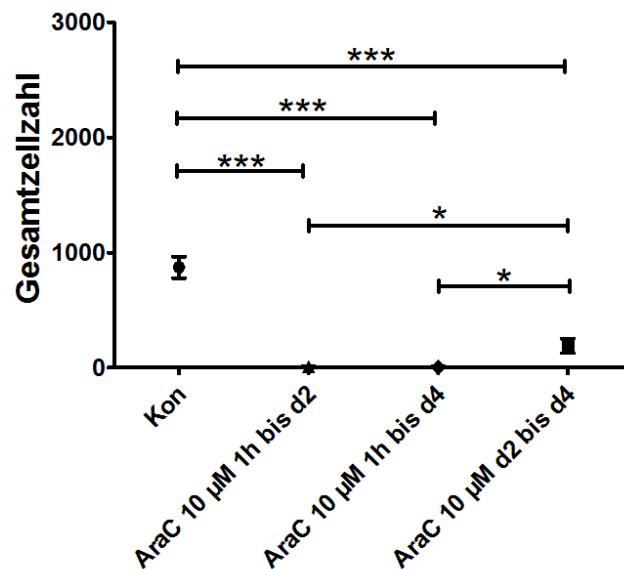


**Abbildung 36: Mittlere Axonlänge in  $\mu\text{m}$  bei drei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung



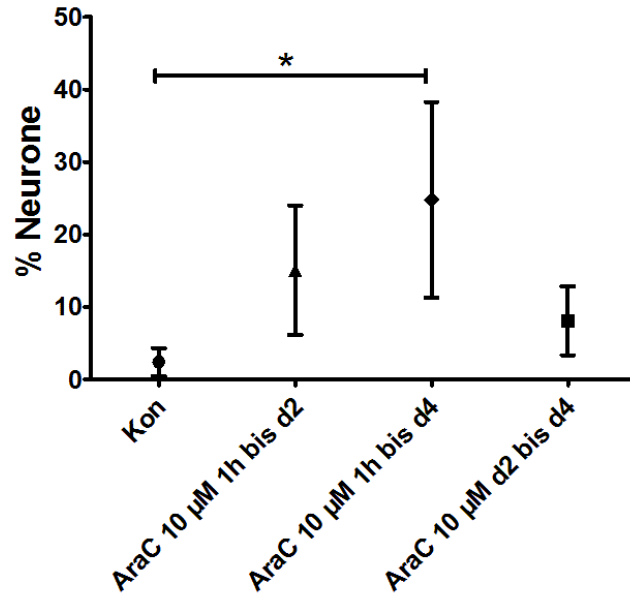
Deutliche Unterschiede zeigten sich bei der Gesamtzellzahl in den drei verschiedenen Applikationskonditionen von AraC (Abb. 37, n=3). In beiden Konditionen mit AraC-Gabe nach 1 h überlebten hoch signifikant weniger Zellen (1 h bis d2:  $9,7 \pm 2,9$ ; 1 h bis d4:  $8,0 \pm 5,1$ ) als unter Kontrollbedingungen ( $872,3 \pm 93,0$ ,  $p < 0,001$ ). Bei späterem Applikationsstart von AraC (d2 bis d4) war die Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrollbedingung ebenfalls signifikant reduziert ( $191,3 \pm 62,9$ ,  $p < 0,001$ ), gleichzeitig überlebten signifikant mehr Zellen als in beiden Konditionen, in denen AraC ab 1 h nach Zellausplattierung appliziert wurde.



**Abbildung 37: Gesamtzellzahl bei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

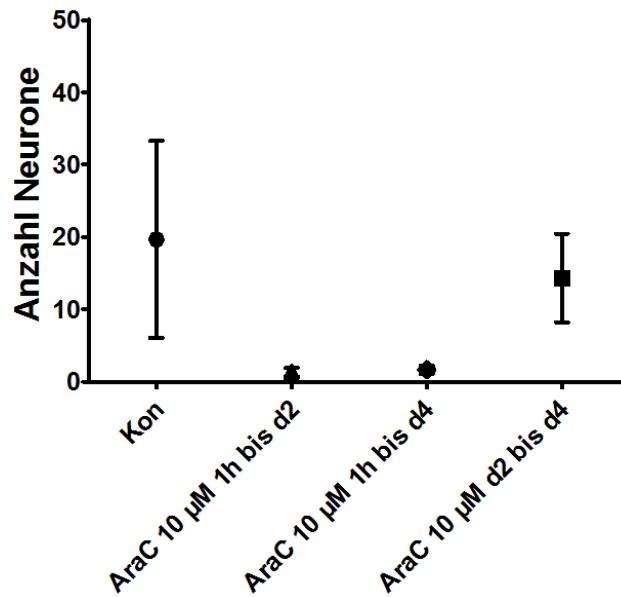
Der Anteil der Neurone war im Vergleich zur Kontrolle ( $2,4 \pm 1,9$  %) in der Kondition 1 h bis d4 signifikant erhöht ( $24,8 \pm 13,5$  %,  $p < 0,05$ ). Der Neuronenanteil in den Konditionen 1 h bis d2 ( $15,1 \pm 8,9$  %) und d2 bis d4 ( $8,1 \pm 4,8$  %) war im Vergleich zur Kontrolle und der Kondition 1 h bis d4 nicht signifikant erhöht oder verringert (Abb. 38, n=3).



**Abbildung 38: Anteil der Neurone in Prozent bei drei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

Auch hier soll mit Abbildung 39 gezeigt werden, wie sich der prozentuale Anteil in der realen Anzahl der Neurone widerspiegelte ( $n=3$ ). Beide Konditionen mit Applikationsstart 1 h nach Ausplattierung zeigten tendenziell einen höheren Neuronenanteil; bei der Kondition 1 h bis d4 sogar signifikant. Die reale Anzahl von Neuronen war in der Kondition 1 h bis d2 bei  $1,3 \pm 0,6$  und bei 1 h bis d4 mit  $1,7 \pm 0,6$ , ebenso wie die Gesamtzellzahl, sehr gering. Sowohl die Kontrolle ( $19,7 \pm 13,6$ ) als auch die Kondition d2 bis d4 ( $14,3 \pm 6,1$ ) zeigten eine tendenziell höhere reale Anzahl an überlebenden Neuronen, unterschieden sich beide aber nicht signifikant von den vorher genannten Konditionen.



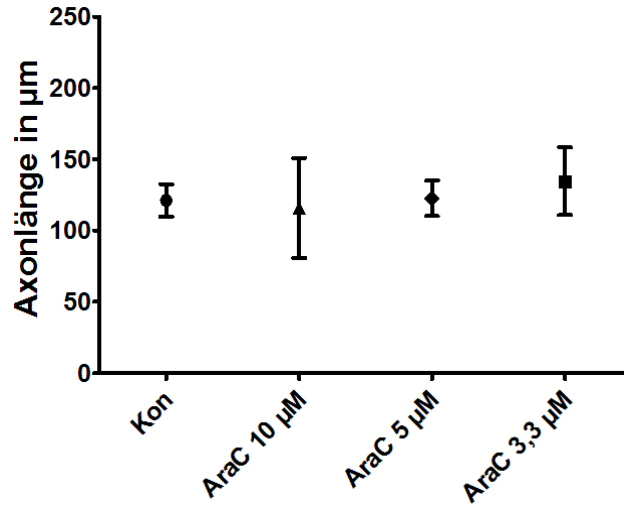
**Abbildung 39: Reelle Anzahl von Neuronen bei drei unterschiedlichen Applikationszeiträumen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC).**

Mittelwerte ± Standardabweichung

#### 4.5.4.2 Konzentration

AraC wurde zunächst in einer Konzentration von 10 µM getestet. Darüber hinaus sollten die weiteren Verdünnungen 5 µM und 3,3 µM auf ihre Effektivität überprüft werden. Die Zellen wurden ausplattiert und nach zwei Tagen in Kultur wurde beim Mediumwechsel AraC hinzugegeben (Kondition d2 bis d4), da sich dieser Zeitpunkt in der vorhergehenden Versuchsreihe als günstig erwiesen hatte.

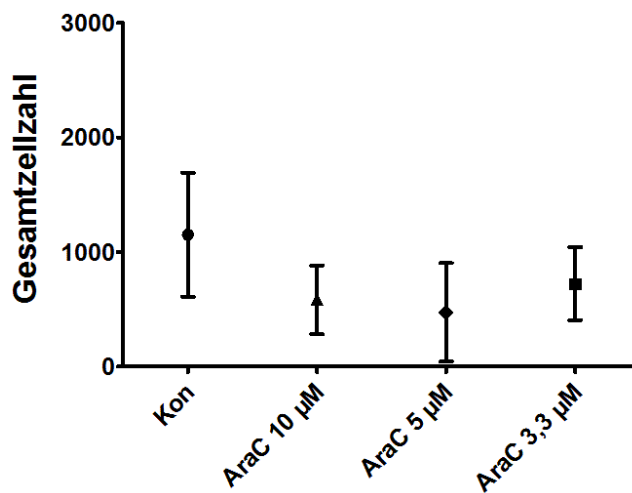
Auf das Längenwachstum der bipolaren Neurone hatte AraC in keiner der Verdünnungen einen signifikanten Einfluss. Die Werte für 10 µM ( $115,9 \pm 35,0 \mu\text{m}$ ), 5 µM ( $122,5 \pm 12,4 \mu\text{m}$ ) und 3,3 µM ( $134,6 \pm 23,9 \mu\text{m}$ ) waren vergleichbar zu denen der Kontrollbedingung in DMEM ( $121,2 \pm 11,4 \mu\text{m}$ ) (Abb. 40, n=3).



**Abbildung 40: Mittlere Axonlänge in µm bei drei verschiedenen Konzentrationen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC).**

Mittelwerte ± Standardabweichung

Bei der Gesamtzellzahl zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle ( $1152,0 \pm 541,7$ ) bei allen drei Varianten 10 µM ( $583,3 \pm 300,0$ ), 5 µM ( $473,3 \pm 429,8$ ) und 3,3 µM ( $723,7 \pm 318,4$ ) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 41,  $n=3$ ).

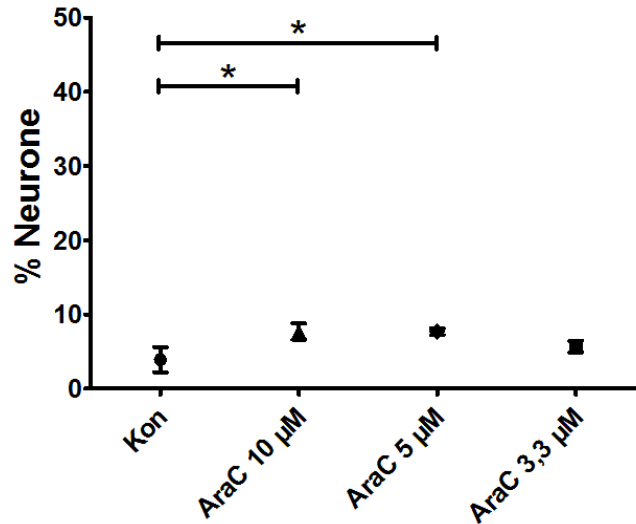


**Abbildung 41: Mittlere Gesamtzellzahl bei drei verschiedenen Konzentrationen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid (AraC).**

Mittelwerte ± Standardabweichung

Der Prozentsatz der Neurone war im Vergleich zur Kontrolle ( $3,9 \pm 1,7$  %) in allen drei Konditionen tendenziell erhöht. Der Einsatz von AraC in den Konzentrationen 10 µM ( $7,7$

$\pm 1,1$  %) als auch 5  $\mu\text{M}$  ( $7,7 \pm 0,4$  %) führte zu einem signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhten Neuronenanteil, jedoch nicht mit der 3,3  $\mu\text{M}$  Konzentration ( $5,7 \pm 0,8$  %) (Abb. 42,  $n=3$ ).



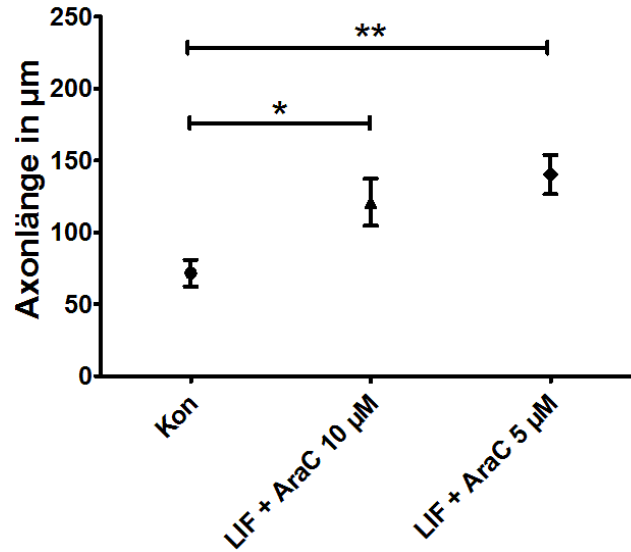
**Abbildung 42: Anteil der Neurone in Prozent bei drei verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC).**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.5.5 Kombiniertes Einsatz von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC)

Als letzte Versuchsreihe sollte der Effekt von Leukemia Inhibitory Factor und Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid bei gemeinsamer Applikation untersucht werden. Hierfür wurden Leukemia Inhibitory Factor in der Konzentration 80 ng/ml und Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Zeitraum für die Faktorengabe wurde d2 bis d4 gewählt. Als Kontrolle dienten Zellen in Differenzierungs-Medium auf DMEM-Basis auf einem Deckgläschen.

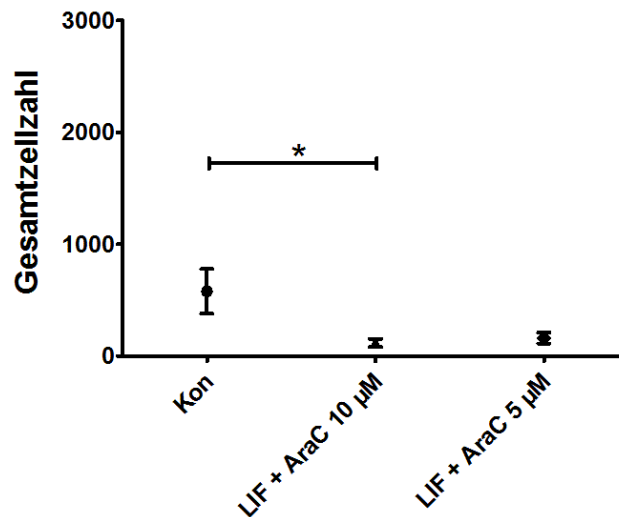
Es zeigte sich, dass sich bei der Axonlänge sowohl die Kombination LIF + AraC 10  $\mu\text{M}$  ( $121,1 \pm 16,4$ ) als auch die Kondition LIF + AraC 5  $\mu\text{M}$  ( $140,3 \pm 13,7$   $\mu\text{m}$ ) signifikant ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ) von der Kontrolle ( $71,7 \pm 9,2$   $\mu\text{m}$ ) unterschieden (Abb. 43,  $n=6$ ).



**Abbildung 43: Mittlere Axonlänge in µm bei kombinierter Anwendung von Leukemia Inhibitory Factor und verschiedenen Konzentrationen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

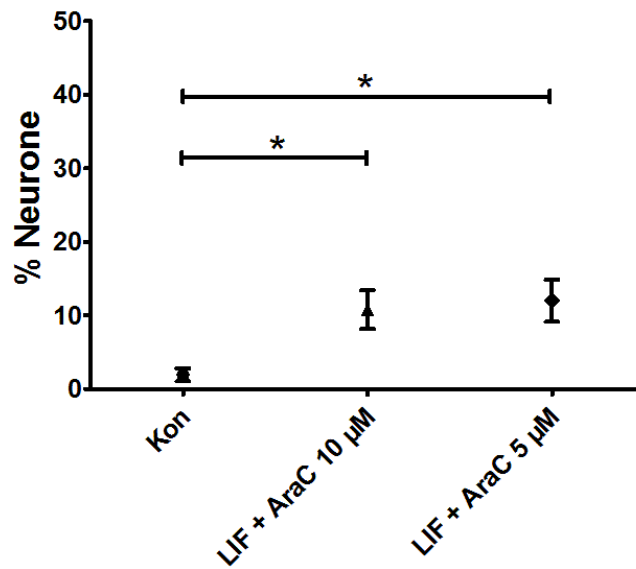
In der Gesamtzellzahl unterschied sich die Kombination LIF + AraC 10 µM ( $116,2 \pm 36,1$ ) signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle ( $577,5 \pm 199,7$ ). Die Kombination LIF + AraC 5 µM ( $159,8 \pm 49,2$ ) zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle (Abb. 44,  $n=6$ ).



**Abbildung 44: Gesamtzellzahl bei kombinierter Anwendung von Leukemia Inhibitory Factor und verschiedenen Konzentrationen von Cytosin-β-D-arabinofuranosid.**

Mittelwerte ± Standardabweichung

Beim prozentualen Anteil der Neurone in dieser Versuchsreihe zeigte sich ein ähnliches Bild zur Testreihe der Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. Wurde Leukemia Inhibitory Factor in Kombination mit 10  $\mu$ M ( $10,8 \pm 2,6$  %) bzw. 5  $\mu$ M AraC ( $12,0 \pm 2,9$  %) angewendet, konnte in beiden Fällen ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) des prozentualen Neuronenanteils im Vergleich zur Kontrolle ( $1,9 \pm 0,9$  %) festgestellt werden, es gab jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Varianten (Abb. 45,  $n=6$ ).



**Abbildung 45: Anteil der Neurone in Prozent bei kombinierter Anwendung von Leukemia Inhibitory Factor und verschiedenen Konzentrationen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung**

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden mehrere Aspekte im Bereich der experimentellen Innenohrforschung untersucht. Die konditionelle Brn3.1 IRES Cre Linie wurde mit geflochten Reporter-Mauslinien verkreuzt, um die Expression von Cre Rekombinase unter der Aktivität des Brn3.1 Promotors zu evaluieren und die Eignung für weitere Verkreuzungen mit anderen flox Linien festzustellen. Die pmn-Maus als bekanntes Modell einer Motoneuronerkrankung wurde dahingehend untersucht, inwiefern sie geeignet ist, die Pathologie der auditorischen Neuropathie nachzubilden, da sie in vorherigen Untersuchungen mit click-ABR bereits erhöhte Hörschwellen gezeigt hatte. Alle verwendeten Mauslinien, einschließlich der Reporter- und Backgroundlinien sowie der F1-Nachkommen aus den Verkreuzungen, wurden mit ABR und DPOAE frequenzspezifisch untersucht, um die Funktion der inneren und äußeren Haarzellen im Corti'schen Organ zu evaluieren.

Die Brn3.1 Maus sowie die Reporterlinien und die F1-Nachkommen der Verkreuzungen hieraus zeigten keine audiologischen und morphologischen Pathologien im Vergleich zur Backgroundlinie C57BL/6. Eine Expression von Cre Rekombinase unter der Aktivität des Brn3.1 Promotors bzw. des Reporterproteins  $\beta$ -Galactosidase konnte in F1-Nachkommen postnatal zu den Zeitpunkten P14 und P21 nachgewiesen werden. Die konventionelle Genotypisierung mit Hilfe von Schwanzbiopsien zeigte sich dabei nicht als zuverlässiger Indikator für die Expression des Reporterproteins. Im Rahmen einer Reverse-Transkriptase-PCR wurde nur vereinzelt Reporter-mRNA im Corti'schen Organ von F1-Nachkommen nachgewiesen. Dies deutet auf Prozesse in der Brn3.1 IRES Cre Maus hin, welche die ausreichende Cre Rekombinase Expression stören.

Die pmn-Maus zeigte sich als Modell für einen früh einsetzenden, ausgeprägten Hörverlust. Bereits zum Zeitpunkt P21 wurden signifikante Unterschiede in den frequenzspezifischen Schwellenwerten im Vergleich zum Wildtyp in der ABR festgestellt, welche sich im zeitlichen Verlauf weiter manifestierten. Auch DPOAE-Antworten nahmen mit zunehmendem Alter ab und konnten an P35 nur noch in einer Frequenz ausgelöst werden. Bei morphologischen Untersuchungen des Corti'schen Organes dieser Tiere zeigte sich, dass die äußeren Haarzellen durch apoptotische Vorgänge degenerieren. Da der pmn Phänotyp durch eine Mutation im TBCE Gen bedingt ist und dieses Protein mit



mikrotubulinreichen Strukturen kolokalisiert, stellte sich die Frage, ob TBCE auch im Corti'schen Organ von pmn- und Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden kann. TBCE konnte in den äußeren Haarzellen und inneren Stützzellen nachgewiesen werden, wobei es durch die apikal-basale Degeneration der äußeren Haarzellen in der pmn-Maus auch zu einem Verlust der TBCE-Expression in betroffenen Zellen kam und ein flaches Epithel ausgebildet wurde. Auch die Anzahl der Mikrotubuli in den Axonen des Hörnervs war in der pmn-Maus signifikant im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

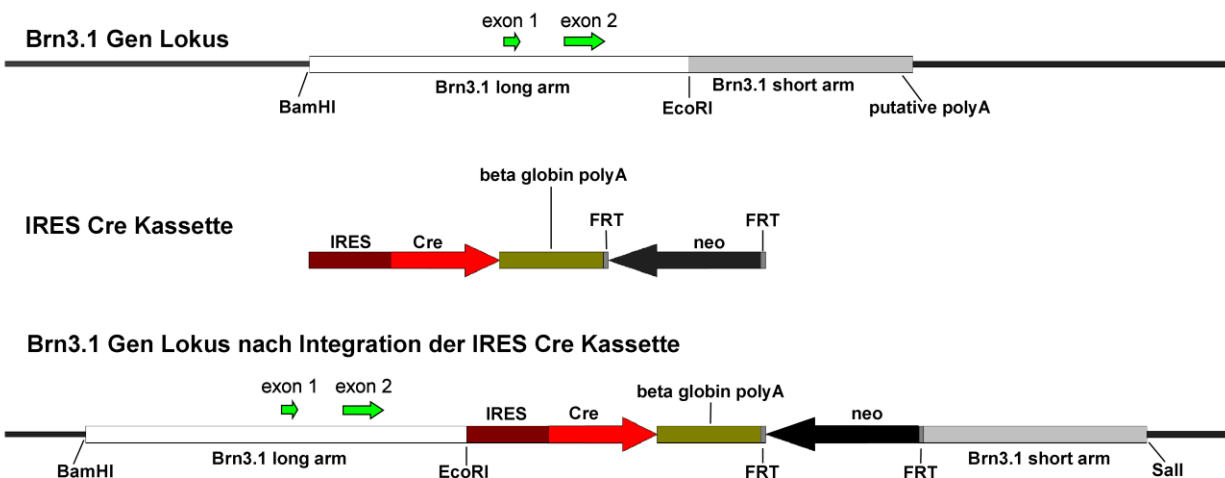
Außerdem wurde der Einfluss der Faktoren Medium, Beschichtung, Neurotrophine/ Zytokine und des Zytostatikums Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC), allein und in Kombination, auf die Kultur dissoziierter auditorischer Neurone untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die ersten drei Faktoren in erster Linie Einfluss auf das Längenwachstum der Axone hatten, während der Einsatz von AraC den Neuronenanteil der Kultur steigerte. Die Neurone zeigten in den Versuchsreihen eine Präferenz von Dulbecco's Modified Eagle Medium gegenüber Neurobasalmedium sowie für eine zusätzliche Beschichtung mit Laminin bei Verwendung der synthetischen Polymere Poly-Lysin und -Ornithin als Grundlage. Nur der Einsatz von LIF, nicht aber NT-3 und BDNF, hatte Einfluss auf das Wachstum der Axone. Im gleichzeitigen Einsatz dieser Faktoren traten die Effekte kombiniert auf, sodass besseres Längenwachstum und eine Erhöhung des neuronalen Anteils der Kultur erreicht werden konnte.

### 5.1 Die Insertion der IRES Cre Kasette in die 3' UTR des *Brn3.1* Gens behinderte nicht die normale Hörentwicklung

Das Einbringen von Transgenen in das Genom einer Maus birgt immer die Gefahr, dadurch ungewollte Mutationen hervorzurufen oder die normale Entwicklung des Organismus zu stören [81, 82]. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Insertion der IRES Cre Kasette in die 3' UTR von *Brn3.1* trotzdem eine normale Hörentwicklung zulässt. Zum Vergleich wurden 2 Monate alte C57BL/6 Mäuse als Backgroundlinie ebenfalls audiologisch untersucht. Diese zeigten normale Hörschwellen in ABR Untersuchungen. Antworten bei 8 kHz waren vergleichbar mit Literaturangaben [83]. Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen konnten in allen vier untersuchten Frequenzen ausgelöst werden.

Brn3.1 IRES Cre Tiere zeigten eine normale Hörentwicklung. Die Hörschwellen unterschieden sich nicht von der Backgroundlinie C57BL/6 und DPOAE-Antworten konnten in allen vier untersuchten Frequenzen ausgelöst werden. Die Insertion der IRES Cre Kasette in das Genom hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung des Hörorgans dieser Tiere.

Ein Vergleich der Genloci von *Brn3.0*, *Brn3.1* und *Brn3.2* hatte gezeigt, dass alle drei mindestens für ein Exon kodieren, welches die POU-Domäne einschließt. *Brn3.1* und *Brn3.0* kodieren für jeweils zwei Exons, wobei das Intron in beiden Genen an derselben Stelle liegt [84]. Die Insertion der IRES Cre Kasette erfolgte downstream des Exons 2 in die 3' UTR von *Brn3.1* (Abb. 46) [75]. Die 3' UTR eines Genes ist, obwohl kein Bestandteil der Sequenz zur Translation des Proteins, oft bedeutend zur Bindung regulatorischer Translationsfaktoren wie trans-acting factors, RNA-binding proteins (RBPs) und small RNAs [85, 86]. Eingriffe in die 3' UTR eines Gens bergen also das Risiko, damit translationale Mechanismen zu zerstören oder zu behindern. Ein solcher Eingriff war in diesem Fall das Einbringen der IRES Cre Kasette in den *Brn3.1* Locus. Da die Hörentwicklung in Brn3.1 IRES Cre Tieren normal verlief, schien die 3' UTR in diesem Fall keine regulatorischen Sequenzen aufzuweisen, welche für eine normale Hörentwicklung wichtig wären, oder diese sind durch die Insertion der IRES Cre Kasette nicht gestört worden.



**Abbildung 46: *Brn3.1* Gen Locus vor und nach Integration der IRES Cre Kasette.**

Das *Brn3.1* Gen besteht aus zwei Abschnitten, dem langen und kurzen Arm. Die beiden für *Brn3.1* codierenden Exons liegen auf dem langen Arm. Die IRES Cre Kasette wird downstream des Exons 2 von

*Brn3.1* in die 3' untranslated region (UTR) des Gens eingebracht. Modifiziert nach Mlynski *et. al.*, 2005 und Theil *et. al.*, 1993 [75, 84]

Auch die morphologische Untersuchung des Corti'schen Organes dieser Tiere war unauffällig und zeigte keine pathologischen Veränderungen im Vergleich zum C57BL/6 Background. Es zeigte sich die typische Konfiguration mit einer Reihe innerer und drei Reihen äußerer Haarzellen und deren Innervierung durch auditorische Neurone (Abb. 9). Dies zeigte ebenfalls, dass die *Brn3.1* Funktion durch die eingebrachte IRES Cre Kasette nicht behindert wurde, und eine normale Entwicklung des Corti'schen Organes möglich war.

Dieses Ergebnis war vergleichbar mit jenen anderer *Cre/loxP* Modelle, welche in der Innenohrforschung benutzt werden, z. B. die Prestin Cre transgene Maus von Li *et al.* [87], welche ebenfalls normale Antworten auf Click Stimuli und keine pathologischen morphologischen Veränderungen zeigte.

Die Implementierung des *Cre/loxP*-Systems in der Innenohrforschung ist von großem Interesse, da zunehmend neue genetische Faktoren entdeckt werden, die eine Rolle bei angeborenen Hörstörungen spielen. Eine Entwicklung weiterer transgener Cre Linien des Innenohrs ist daher zu erwarten, trotz zahlreicher in den letzten Jahren bereits generierter Linien [49].

## 5.2 Die Reporterlinien $R^{eYFP}$ und $R^{LacZ}$ zeigten normale Hörschwellen und eine unauffällige Morphologie des Innenohres

Zwei der am meisten benutzten Reporterlinien,  $R^{eYFP}$  und  $R^{LacZ}$ , wurden bis dato noch nicht auf ihre Eignung in Hörversuchen elektrophysiologisch untersucht. Diese Reporterlinien wurden bereits mit innenohrspezifischen Cre Linien verkreuzt und bisher sind keine Auffälligkeiten die Hörfunktion betreffend in deren Nachkommen berichtet worden. Die Arbeitshypothese war deshalb, dass die Reporterlinien normale Hörschwellen und DPOAE-Antworten aufweisen würden.

Diese Hypothese bestätigte sich in den Versuchen. Im Vergleich zur Backgroundlinie zeigte keine der beiden Reporterlinien eine Auffälligkeit in den Hörschwellen und DPOAE-Antworten konnten in allen vier getesteten Frequenzen ausgelöst werden.

Auch das Corti'sche Organ beider Linien präsentierte sich ohne pathologische Veränderungen (Abb. 9). In der  $R^{eYFP}$  Linie wird der *ROSA $\beta$ geo26* Gen Locus benutzt, eine beliebte Wahl für genomweite Expression [88], dadurch gut geeignet für die Einbringung von geflochten Reporter genen. Das Reporter gen ist damit in jeder Zelle präsent, wird in der Expression aber durch ein geflochtenes Stopcodon gehindert. Zellspezifische Cre Rekombinaseaktivität bewirkt eine Exzision des Stopcodons, sodass diese Zellen und deren Nachfolger das Reporterprotein exprimieren. Der CAG Promotor hingegen ist ein synthetisches DNA-Element, welches aus drei Komponenten zusammengesetzt wird: dem early Enhancerelement des Cytomegalovirus (CMV, **C**), dem Promotor sowie dem ersten Exon und Intron des beta-Aktin (**A**) Gens aus Hühnern und dem splice acceptor des beta-Globin (**G**) Gens des Kaninchens [89]. Der CAG-Promotor ermöglicht eine hohe Expression von Genen in fast allen Zelltypen unter seiner Kontrolle [90] und zeigte dabei höhere Expressionslevel als unter dem *Rosa26* Promotor [91]. Ob das Einbringen des Reporter gens in den *ROSA $\beta$ geo26* Locus bzw. die Verwendung des CAG-Promotors jedoch einen Einfluss auf die Hörentwicklung hatte, blieb bis dato unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt, dass dadurch weder die Morphologie des Innenohres gestört noch das Hörvermögen beeinträchtigt wurde.

### 5.3 Mäuse, die sowohl transgen für Brn3.1 IRES Cre als auch $R^{LacZ}$ oder $R^{eYFP}$ sind, waren unauffällig in der Hirnstammaudiometrie und zeigten eine normale Morphologie des Innenohres

Die Parentallinien (Brn3.1 IRES Cre;  $R^{LacZ}$ ;  $R^{eYFP}$ ) zeigten keine Störungen in der Hörentwicklung und der Struktur des Corti'schen Organes. Es stellte sich die Frage, ob die F1-Nachkommen aus Kreuzungen der Cre exprimierenden Linie mit den Reporterlinien ebenfalls keine morphologischen oder audiologischen Auffälligkeiten zeigen würden. Die Aktivität der Cre Rekombinase in Brn3.1 exprimierenden Zellen könnte während der Entwicklung des Hörorgans zu unerwarteten Veränderungen bestimmter Zellstrukturen führen, da die Aktivität von Brn3.1 im Innenohr ab E13 (Embryonaltag 13) beginnt [52]. Betroffen wären dabei hauptsächlich die inneren und äußeren Haarzellen, da dieser Transkriptionsfaktor besonders in der späten Phase der Differenzierung von Haarzellen aktiv und für deren Erhaltung wichtig ist. Dabei wird die

frühe Expression von *Brn3.1* durch Transkriptionsfaktoren wie *Atoh1* gesteuert [55]. Die spätere Expression von *Brn3.1* erfolgt hingegen eher über eine positive Rückkopplung, um das Überleben der Haarzellen und die eigene Expression zu gewährleisten [37].

In den Elternlinien konnte keine Beeinflussung des Hörvermögens und der Struktur des Innenohres durch die genetische Modifikation gezeigt werden, aber da in den Nachkommen durch die Aktivität der Cre Rekombinase genetische Veränderungen während der Entwicklung des Hörorgans stattfinden können, barg dies eine gewisse Gefahr für strukturelle Veränderungen und funktionelle Pathologien.

Es zeigte sich, dass in den F1-Nachkommen transgen für *Brn3.1* IRES Cre und eines der beiden Reportergene keine Auffälligkeiten in der audiologischen Entwicklung des Innenohrs festzustellen waren. Die Hörschwellen waren vergleichbar zu der Backgroundlinie und DPOAEs ließen sich in allen Frequenzen auslösen. Auch die Morphologie des Innenohres unterschied sich nicht von denen der vorherig untersuchten Linien (Abb. 9).

#### 5.4 Nachweis der Expression von Cre Rekombinase unter dem *Brn3.1* Promotor

Da das Expressionsmuster von Cre Rekombinase unter der Kontrolle des *Brn3.1* Promotors im Innenohr noch nicht bekannt war, sollte dies genauer untersucht werden. Eine durch Cre Rekombinase gesteuerte Expression von  $\beta$ -Galactosidase im Corti'schen Organ konnte am postnatalen Tag 14 und 21 entdeckt werden. Allerdings war diese Expression zu beiden Zeitpunkten auf einzelne äußere Haarzellen beschränkt. Für diese mosaikartige Präsenz des Reporterproteins gibt es mehrere mögliche Begründungen. Entweder wurde in manchen Zellen das Stopcodon nicht entfernt, d.h. die Rekombination der *loxP*-Stellen misslang, sodass das Reportergen nicht abgelesen werden konnte, oder bereits exprimierte  $\beta$ -Galactosidase war in den Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung bereits wieder abgebaut worden. Dies fußt darauf, dass  $\beta$ -Galactosidase nicht endogen in diesen Zellen vorhanden ist und deshalb degradiert. Es wäre möglich, dass die zum untersuchten Zeitpunkt Reporter-negativen Zellen also vorher das Reporterprotein exprimiert haben, aber dieses zum Zeitpunkt der Fixierung bereits wieder abgebaut worden war. Hierfür sprach unter anderem, dass am postnatalen Tag 14 einige Zellen

zwar eine Expression des Reporters zeigten, aber weniger ausgeprägt (siehe Abb. 11), da eventuell bereits der Abbau des Proteins begonnen hatte. Ein Vergleich der Fluoreszenzcounts der drei äußeren Haarzellreihen zeigte signifikant höhere Werte für Reihe 1 im Vergleich zu Reihe 2 und 3 (siehe Abb. 11). Dies könnte auf einen Abbau des Proteins in den Zellen der Reihe 2 und 3 hindeuten. Gegen diese Theorie spricht, dass dann zu einem früheren Zeitpunkt (vor P14) das Protein in allen äußeren Haarzellen hätte nachweisbar sein müssen. Allerdings konnte dies nicht gezeigt werden. Da das ausgewertete Bild die zweidimensionale Darstellung (Konfokalbild) eines dreidimensionalen Objektes (Wholemountpräparat) ist und das Wholemountpräparat anscheinend nicht plan auf dem Objektträger eingebettet wurde, ist es auch möglich, dass die innerste der drei äußeren Haarzellreihen in einer anderen Höhe als die äußeren beiden Reihen für die Darstellung „geschnitten“ wurde und dadurch der Eindruck bedingt ist, dass die äußeren beiden der drei Haarzellreihen weniger Cre Rekombinase exprimieren. Bei genauerer Betrachtung (Abb. 10, A DAPI &  $\beta$ -Gal) erfolgte die Darstellung der mittleren und äußersten der drei Haarzellreihen auf Höhe des Zellkerns, welcher dadurch diese Schnittebene der Zelle fast vollständig ausfüllte, während die Darstellung der innersten der drei äußeren Haarzellreihen über dem Zellkern der Zelle erfolgte und dadurch eine bessere Verteilung und Darstellung der Cre Expression möglich war.

Da die Expression des Reporterproteins kontinuierlich andauern sollte, sobald das Stopcodon durch die Rekombination der *loxP*-Stellen aus dem Genom entfernt wurde, sollten zu späteren Zeitpunkten mehr oder genauso viele Zellen (wenn keine weitere Zelldifferenzierung mehr stattfand) positiv für dieses Protein sein. Zum Zeitpunkt P21 zeigten aber ebenfalls wie zum Zeitpunkt P14 nur einzelne Zellen Expression des Reporters (Abb. 10 B).

Ein weiterer Punkt, der das geringe Maß von Aktivität der Cre Rekombinase bedingen könnte, lag in der Wahl des Promotors. *Brn3.1* mag zwar zellspezifisch für die Haarzellen sein, ob er jedoch als Promotor geeignet ist, eine ausreichende Expression von Cre Rekombinase zu steuern, ist damit nicht automatisch gegeben. Diese Hypothese wird im nächsten Abschnitt noch genauer diskutiert.

## 5.5 Das Expressionsverhalten im Gewebe konnte nicht zuverlässig aufgrund von Genotypisierungsergebnissen aus Schwanzbiopsien vorhergesagt werden

In Versuchen, das genaue örtliche und zeitliche Expressionsverhalten von Cre Rekombinase unter der Aktivität des Promotors *Brn3.1* darzustellen, zeigte sich oft das Problem, dass Tiere, welche durch eine konventionelle Genotypisierung aus Schwanzbiopsien als transgen für Cre Rekombinase und das Reporterprotein identifiziert wurden, in der immunhistologischen Aufarbeitung keine Aktivität des Reporters zeigten. Eine Reverse-Transkriptase-PCR mit cDNA aus RNA-Transkripten des Corti'schen Organes verdeutlichte, dass nur ein Teil der Tiere eines Wurfes, welche durch Genotypisierung als doppelt transgen erkannt wurden, auch tatsächlich RNA-Transkripte des Reporterproteins aufwiesen. Da dies rückschließend ein Hinweis auf *Brn3.1* und somit Cre Rekombinase Aktivität ist, lässt sich vermuten, dass die alleinige Präsenz der eingebrachten Transgene keine Garantie für deren tatsächliche Expression und Aktivität im Gewebe ist. Die Gründe hierfür sind mannigfaltig, z.B. kann durch *gene silencing* die Expression von Cre Rekombinase verhindert sein. Es wird davon ausgegangen, dass Silencing als *site specific effect* durch die Integration des Transgens auftritt, zum Beispiel durch die enge Nähe des Transgens zum Centromer [92] oder die Orientierung des Transgens und dessen Methylierung [93].

Wie erwähnt, kann dies auch ein Grund für die beobachtete mosaikhafte Expression sein, da diese bereits in anderen Modellen mit zellspezifischer Expression beobachtet wurde. Die Wahl des richtigen Promotors für Cre/*loxP*-Linien ist ein entscheidendes Kriterium für den Erfolg der Linie. Der Promotor muss nicht nur zellspezifisch exprimiert werden, sondern auch stark genug sein, die Expression der Cre Rekombinase zu steuern [94]. Es lässt sich vermuten, dass *Brn3.1* als Promotor zu schwach ist, um die Cre Rekombinase Expression in ausreichendem Maß aktivieren zu können oder dass ein Vorliegen des *Brn3.1* IRES Cre Allels im heterozygoten Zustand nicht ausreicht, um genügend Cre Rekombinase zu exprimieren.

Natürlich können auch mehrere Faktoren hierbei zusammen für die Verhinderung der Expression verantwortlich sein.

Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden muss, ist, dass diese transgene Linie bereits

vor einigen Jahren generiert wurde. Bei transgenen Linien wie dieser kann es bei fortschreitender Generationsdauer zum Verlust der Cre Rekombinase Aktivität kommen. Eine Studie an einem Mausmodell mit leberspezifischer Cre Rekombinase Expression unter dem Albumin Promotor (*Alb*) zeigte, dass mit zunehmendem Generationsalter der Linie ähnliche Effekte, wie hier beobachtet wurden, auftraten [95]. Die Tiere wurden über Schwanzbiopsien genotypisiert, jedoch zeigten später nicht alle als transgen identifizierten Tiere auch entsprechende Cre Rekombinase Expression.

## 5.6 Die pmn Maus zeigte sich als Modell für einen früh einsetzenden ausgeprägten Hörverlust

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die pmn- Maus auch ein Modell für eine auditorische Neuropathie sein kann.

Die pmn-Maus ist ein bekanntes Mausmodell für Motoneuronerkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Homozygot erkrankte Tiere zeigen eine muskuläre Atrophie und eine retrograde Degeneration sowohl der peripheren Nerven als auch der Motoneurone im Rückenmark und Hirnstamm.

Bedingt wird dies durch eine Mutation im *Tubulin-spezifischen Chaperon E (Tbce)* Gen, auch Tubulin-spezifischer Cofaktor E genannt. Diese Familie von Tubulin-spezifischen Chaperonen, zu der noch *TBCA*, *TBCB*, *TBCC* und *TBCD* gehören, ist bei der Faltung von heterodimeren Komplexen aus primärem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin beteiligt.

Mutationen im orthologen *TBCE* Gen im Menschen führen zum Woodhouse-Sakati/ HRD Syndrom bzw. Kenny Caffey Syndrom [96], bei welchen unter anderem auch Hörstörungen beschrieben sind [97].

Volkenstein *et al.* [73] konnten zeigen, dass die pmn-Maus bis zur dritten postnatalen Woche eine normale Hörentwicklung mit anschließender progressiver Verschlechterung der Hörschwelle bei Verwendung von click Stimuli aufwies. In jener Studie konnten signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp in der Anzahl der auditorischen Neurone gefunden werden. Das sensorische Organ war als morphologisch intakt beschrieben worden. Diese strukturelle Integrität bei gleichzeitigem progredientem Hörverlust ließ die pmn-Maus als einen geeigneten Kandidaten für ein Mausmodell der auditorischen Neuropathie erscheinen.



Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit der progrediente Hörverlust frequenzspezifisch untersucht, da die click-ABR der Volkenstein *et al.* Studie hauptsächlich die Funktion der Cochlea-Basis darstellt [73]. Die DPOAEs wurden erhoben, um die Funktion des cochleären Verstärkers zu untersuchen, welcher bei einer auditorischen Neuropathie nicht beeinflusst sein sollte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der progrediente Hörverlust [73] auch frequenzspezifisch zu unterscheiden ist. Signifikante Unterschiede zwischen pmn- und Wildtyp-Maus konnten bereits am postnatalen Tag P21 nachgewiesen werden. Insbesondere waren die beiden Frequenzen 12 und 16 kHz betroffen. Diese wiesen anfangs geringere Schwellenwerterhöhungen als Frequenzen unter 10 kHz auf, im weiteren Verlauf der Untersuchung jedoch zeigten Frequenzen über 10 kHz die stärksten Hörverluste im Vergleich zum Wildtyp. Ein ähnlicher progredienter Hörverlust findet sich auch bei Sato *et al.* [98] bei einer Mauslinie, welche eine Mutation im p75-NTR Gen trägt. In der Studie von Sato *et al.* wurden aber nur click-ABRs abgeleitet, sodass ein Vergleich zu frequenzspezifischen Unterschieden im Hörverlust mit dieser Arbeit nur bedingt möglich ist. Frequenzspezifische Unterschiede konnten durch Oishi *et al.* [99] in einem Mausmodell mit Tumor Necrosis Factor-alpha ( $TNF-\alpha$ )-defizienten Tieren gezeigt werden. Homozygot defiziente Tiere zeigten im Alter von 4 Wochen ähnliche Schwellen bei 8 und 16 kHz wie gleichaltrige pmn-Tiere. In höheren Frequenzen bestehen in  $TNF-\alpha^{-/-}$  Mäusen wie in der pmn-Maus signifikant stärker erhöhte Hörschwellen im Vergleich zum Wildtyp. Eine progrediente Verschlechterung der Schwelle bei 24 kHz über den Zeitraum von 1-4 Monaten konnte in der Studie nicht festgestellt werden [99]. Dies kann dadurch begründet sein, dass sich die genetisch bedingte Schwerhörigkeit in ihrem vollen Umfang bereits im Alter von 4 Wochen komplett manifestiert hatte. Zwischen 4 und 5 Wochen fanden auch in der pmn-Maus nur noch geringe Schwellenveränderungen statt, wobei eine längerfristige Verlaufsdokumentation der Hörschwellen durch die kürzere Lebensdauer der pmn-Maus bis zum Alter von ca. 5-6 Wochen nicht möglich war. Allerdings gab es auch keine Information über die Schwellenwerte der  $TNF-\alpha^{-/-}$ -Mäuse vor P28, sodass es möglich ist, dass diese sich ähnlich der pmn-Maus zwischen Beginn des Hörens um P14 herum bis P28 progredient verschlechterten.

Die Progression und Schwere des Hörverlustes war dabei wahrscheinlich stark

beeinflusst durch den Zellverlust in den äußeren Haarzellenreihen, welcher sich in den weiteren histologischen Untersuchungen zeigte.

Der Wildtyp zeigte otoakustische Emissionen in allen untersuchten Frequenzen mit Schwellen ähnlich der CBA/J-Linie bei Qin *et al.* [100]. Otoakustische Emissionen konnten bei pmn-Mäusen nur bedingt registriert werden. Über fast alle Frequenzen kam es zu einem Verlust von DPOAEs. Residuale DPOAE Antworten konnten zu den untersuchten Zeitpunkten nur bei 8 kHz ausgelöst werden (und zu P21 auch bei 16 kHz), wobei hier die Schwellen im Vergleich zum Wildtyp jeweils signifikant erhöht waren. Eine ähnliche Schwellenwerterhöhung bei Frequenzen über 8 kHz in DPOAE-Antworten zeigte sich im *hyt/hyt* Mausmodell [101]. Ein Verlust von DPOAEs wurde in dieser Studie nicht registriert, was allerdings am unterschiedlichen dB-cut-off für die Stimuluslautstärke zwischen jener (85 dB SPL) und dieser Untersuchung (60 dB SPL) liegen könnte [101].

### 5.7 Apoptotische Degeneration der äußeren Haarzellen in der pmn-Maus

Die fehlenden DPOAE-Antworten ließen vermuten, dass es neben dem Hörverlust, der sich in der ABR gezeigt hatte, zusätzlich einen Haarzellschaden geben könnte. Otoakustische Emission treten als Nebenprodukt des cochleären Verstärkungsprozesses auf [102]. Dabei findet eine aktive, mechanische Verstärkung um den Faktor 100-1000 durch die äußeren Haarzellen statt. Diese Elektromotilität [103] wird durch spezielle Motorproteine in den Zellwänden der äußeren Haarzellen gewährleistet [104, 105]. OAEs können, wie in dieser Untersuchung, auch durch Stimulation mit Reintönen, evoziert werden, um Hinweise über den Zustand des cochleären Verstärkers zu erhalten. Dann spricht man von distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen, wie sie in der vorliegenden Studie benutzt wurden. In der pmn-Maus kam es mit zunehmendem Alter zu einem progredienten Verlust der DPOAE-Antworten in den Frequenzen 12-20 kHz, sodass ein Haarzellschaden der äußeren Haarzellen anzunehmen ist.

Die histomorphometrische Untersuchung von Wholemound-Präparationen des Corti'schen Organes bestätigte den vermuteten Verlust von äußeren Haarzellen in den pmn-Mäusen. Bereits bei P21 war in der pmn-Maus ein signifikanter Verlust von ca. 40 % der äußeren Haarzellen im Vergleich zum Wildtyp festzustellen, wobei ungefähr der gleiche Prozentsatz zusätzlich zwischen P21 und P28 verloren ging und dieses

Präsenzniveau bis P35 bestehen blieb. Ein ähnlicher Haarzellverlust zeigte sich auch in der *hyt/hyt*-Maus mit erhöhten DPOAE-Schwellen (Li *et al.* [101]), wobei der Verlust hierbei nicht quantifiziert wurde.

Auffällig ist, dass diese Degeneration nur die äußeren Haarzellen betraf. Innere Haarzellen waren in *pmn*-Mäusen präsent und ohne morphologische Auffälligkeiten. Ebenso waren die residualen äußeren Haarzellen und ihre Stereozilienbündel morphologisch unauffällig und saßen in der Lamina reticularis.

Es stellte sich die Frage, ob dieser Haarzellverlust durch nekrotische oder apoptotische Prozesse entstand.

Durch einen *in situ cell death detection kit* (TUNEL-Assay) konnte festgestellt werden, dass die äußeren Haarzellen auf Grund einer Apoptose degenerierten. Konform mit den morphologischen Beobachtungen war eine TUNEL-Färbung nur in den Zellkernen äußerer, nicht aber innerer Haarzellen zu erkennen.

Ein progressiver Haarzellverlust ist ein oft auftretendes Phänomen in Mausmodellen für Hörstörungen, wie in der Ames- Waltzer-Maus (*Pcdh15<sup>av</sup>*) [106], in welcher sich im Alter von P30-50 im Bereich des Corti'schen Organes ein flaches Epithel ausbildete, ähnlich wie in der *pmn*-Maus. Allerdings waren in diesem Modell sowohl innere, wie auch äußere Haarzellen betroffen und diese zeigten frühzeitig eine Desorganisation der Stereozilien. Ein solches flaches Epithel aus Stützzellen anstelle von Haarzellen ließ sich auch in einem Modell mit einer Mutation im Transkriptionsfaktor POU4F3 finden [107]. Auch andere Modelle mit Hörverlust, wie die BUB/BnJ- [108] und die 129S6/SvEv- Maus [109], waren von einer Haarzelldegeneration betroffen.

Die Auslöser für den apoptotisch bedingten Haarzellverlust sind dabei vielfältig. Unter anderem können exzessiver Lärm [110], ototoxische Medikamente wie Aminoglycoside [111] und Cisplatin [112] sowie genetische Mutationen [113], insbesondere in Genen, welche in antiapoptotischen Signalwegen involviert sind, wie *DFNA5* [114, 115] und *MSRB3* [116], dafür verantwortlich sein. Vermutlich spielen auch bei der Altersschwerhörigkeit apoptotische Vorgänge eine Rolle [113]. Es wird postuliert, dass dabei reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) über einen längeren Zeitraum ansteigen, weil entweder weniger antioxidative Abwehrstoffe vorhanden sind oder mehr ROS gebildet werden. Auch lärminduzierte und ototoxisch

bedingte Apoptose wird durch steigende ROS-Konzentrationen ausgelöst. Mehrere Signalwege sind hierbei bekannt, unter anderem die Freisetzung proapoptotischer Faktoren durch die Mitochondrien und die Aktivierung der JNK- bzw. ERK/MAP-Kinase-Kaskade durch ROS. Dies resultiert letztlich in der Freisetzung von Cytochrom C und damit von Caspasen, die den Zelltod einleiten [113].

## 5.8 TBCE-Verteilung im Corti'schen Organ

Durch die Mutation im *TBCE* Gen in pmn Mäusen kommt es zu einer Destabilisierung des Proteins und damit auch zu einer Reduktion desselben am Golgiapparat. Letztendlich führt dieses dann zu einer Zerstörung der Mikrotubuli in den Axonen und derer retrograder Degeneration [117]. Da die tubulinreichen Strukturen der äußeren Haarzellen in diesem Tiermodell ebenfalls von Degeneration betroffen waren, stellte sich die Frage, ob TBCE ebenfalls im cortischen Organ exprimiert wird und wenn ja, welche mögliche Funktion es dort innehat.

Es zeigte sich, dass das TBCE Protein im Corti'schen Organ nachzuweisen war. Die Expression war dabei selektiv auf die äußeren Haarzellen und das transzelluläre Bündel der inneren Pfeilerzellen beschränkt. Das selektive Vorkommen dieses Chaperons in diesen Zellen erklärte sich anhand derer Zelleigenschaften. Polare Zellen, wie unter anderem Haarzellen, sind insbesondere abhängig von Tubulinstrukturen [118] und deren dynamischer Organisation [119].

Die Mikrotubuli sind in den Haarzellen in losen Netzwerken organisiert [120], die in den äußeren Haarzellen die ganze Zelle durchspannen, und enthalten vornehmlich dynamisch tyrosiniertes Tubulin [120, 121]. Im Gegensatz dazu liegen in den Stützzellen Mikrotubuli in dicht gepackten Bündeln vor und enthalten acetyliertes, detyrosiniertes oder polyglutamyliertes Tubulin [122]. Sie liegen demnach in stabileren Konformationen als in den sensorischen Zellen vor. Es lässt sich also vermuten, dass TBCE vornehmlich in Zellen exprimiert wird, welche dynamische Tubulinstrukturen bzw. Cytoskelettstrukturen aufweisen. In den äußeren Haarzellen kann dies durch ihre elektromotilen Eigenschaften bedingt sein, welche Formveränderungen der Zellen bewirken.

In den inneren Pfeilerzellen geht die Mikrotubulinformation von Zentrosom-ähnlichen Strukturen in der apikalen Region aus, sogenannten *microtubulin-nucleating sites* bzw.

*microtubule-organizing centres* (MTOCs) [123, 124]. Die Kolokalisation von TBCE mit diesen Regionen ließ auch vermuten, dass TBCE insbesondere an Orten dynamischer Instabilität exprimiert wird [119].

Die sensorischen Zellen sind insbesondere abhängig von einer Tubulin-Fluktuation und einer fortlaufenden Neubildung von Mikrotubuli. TBCE spielt hierbei als Chaperon eine wichtige Rolle in der korrekten Faltung von  $\beta$ -Tubulin-Polypeptiden [64]. Es existieren mehrere Isotypen von  $\beta$ -Tubulin, wobei nicht jeder davon in allen tubulinhaltigen Strukturen des Corti'schen Organes vorkommt. Während im Corti'schen Organ des Gerbils der Isotyp  $\beta_I$  z. B. sowohl in den inneren als auch den äußeren Haarzellen vorkommt, ist er in den Pfeilerzellen nicht nachzuweisen. In letzteren findet man aber sowohl  $\beta_{II}$ - als auch  $\beta_{IV}$ -Tubulin. Es lässt sich spekulieren, ob TBCE selektiv bei der Faltung bestimmter Isoformen wie dem  $\beta_{IV}$  stärker involviert ist als in anderen, da sich dieses auch in den äußeren, nicht aber in den inneren Haarzellen findet [125]. Dagegen spricht, dass sich TBCE in anderen  $\beta_{IV}$ -reichen Strukturen wie den Deiters-Zellen nicht nachweisen ließ.

Es lässt sich auch vermuten, dass TBCE mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (*microtubulin-associated protein*, MAP) kolokalisiert. TBCE weist Sequenzhomologien zu der Mikrotubulin-bindenden Domäne der Proteine pac2 und CLIP-170 auf, letzteres ebenfalls ein MAP [64, 126]. Ein anderes Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP2) wurde bisher in äußeren Haarzellen nachgewiesen. Es kolokalisierte dort mit Tubulin und war dadurch, ebenfalls wie TBCE, in der kompletten Haarzelle nachzuweisen [120]. Allerdings wurde es nicht in den inneren Pfeilerzellen exprimiert.

Auch eine Koexpression mit anderen Proteinen, welche in der dynamischen Instabilität von Mikrotubulinen involviert sind, erscheint wahrscheinlich. Ein solches Protein ist E-like, welches eine Sequenzhomologie mit TBCE aufweist, antagonistisch zu diesem wirkt und eine rapide Depolymerisierung der Mikrotubuli auslöst [127, 128]. Die Instabilität von TBCE in der pmn-Maus in Kombination mit Expression von E-like, Catastrophin oder anderen ähnlichen Mikrotubulin-destabilisierenden Proteinen könnte somit ebenfalls ein Faktor in der Apoptose der äußeren Haarzellen sein.

## 5.9 Die Anzahl der Mikrotubuline in den Axonen des Hörnervs war in pmn-Mäusen signifikant reduziert

Schaefer *et al.* [117] konnten zeigen, dass es durch die Mutation im *TBCE* Gen in pmn-Mäusen zu einer Destabilisierung des TBCE Proteins kommt, welche letztendlich zur Zerstörung der Mikrotubuli in Axonen und deren retrograder Degeneration führt. In dieser Untersuchung konnte beobachtet werden, dass die tubulinreichen Strukturen der äußeren Haarzellen im pmn- Mausmodell von Degeneration betroffen waren und TBCE im Corti'schen Organ vornehmlich in diesen Zellen nachzuweisen war.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Mutation im *TBCE* Gen auch Auswirkung auf weitere Strukturen der Hörbahn hatte, insbesondere, da die pmn-Maus als Modell für Motoneuronerkrankungen ohne Beeinträchtigung der sensorischen Nerven beschrieben wurde [65]. Histologische Untersuchungen sollten zeigen, ob der Hörnerv morphologisch betroffen war. Im Soma der auditorischen Neurone konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen pmn- und Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Auch war die Anzahl der auditorischen Neurone und Nervenfasern zwischen pmn-Maus und Wildtyp gleich.

Die Anzahl der Mikrotubuli in den Axonen war bei pmn-Tieren im Vergleich zum Wildtyp hingegen signifikant reduziert, was durch die reduzierte Immunreaktivität des  $\beta$ III-Tubulin Antikörpers auf eine Degeneration der axonalen Tubulinstruktur hinweist. Axonale Degeneration und Veränderungen des axonalen Tubulins waren im pmn-Modell auch in anderen Studien bereits beschrieben worden. In Extrakten des distalen Nervus ischiadicus von P15 pmn-Mäusen wurden reduzierte  $\beta$ III-Tubulinlevel gemessen [117] und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Nervus phrenicus zu P15 und P28 eine reduzierte Anzahl von Mikrotubuli festgestellt [80, 117]. Es wurde angenommen, dass dieser Mikrotubuliverlust nicht direkt durch die axonale Degeneration in der pmn-Maus verursacht wird, sondern im Zusammenhang mit der Mutation von TBCE steht, da in der SOD1 (Gly93Ala)<sub>9</sub> Maus, ein Modell für familiäre amyotrophe Lateralsklerose, die beiden beschriebenen Nerven trotz axonaler Degeneration keine Reduktion der Mikrotubuli zeigten [80]. Es wurde vermutet, dass TBCE eine wichtige Rolle in der Erhaltung des neuronalen Mikrotubulinnetzwerks spielt. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass durch die *TBCE* Mutation in pmn-Mäusen die Polymerisation von

Mikrotubuli und der mikrotubulinabhängige axonale Transport in Neuronen gestört waren. Dieses könnte auch als Erklärung für die beobachtete sensorische Neuropathie dienen [79]. Auch wenn TBCE nur in geringen Maße in Axonen exprimiert wird [117], scheint es somit einen bedeutenden Einfluss auf deren Erhalt zu haben.

#### 5.10 Auditorische Neurone zeigten eine Medienpräferenz beim Längenwachstum

Untersuchungen an Mausmodellen sind eine Möglichkeit, neue Erkenntnisse zu Erkrankungen des Organismus zu gewinnen. Bei komplexen Prozessen und Fragestellungen unter morphologischen Gesichtspunkten sind diese Modelle erste Wahl. Für Studien zu einzelnen Punkten eines Stoffwechselprozesses bieten sich auch Zellkulturmodelle an. Hier ist es möglich, unter gleichbleibenden Bedingungen einzelne Variablen zu testen. Dies stellt bei Primärzellkulturen eine größere Herausforderung dar als bei immortalisierten Zelllinien, da diese im Gegensatz zu letzteren aus Geweben gewonnen und angelegt werden. Dadurch handelt es sich bei diesen Kulturen meist um einen Mix verschiedener Zelltypen, was zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. In dieser Studie sollten mehrere Aspekte untersucht werden, um deren Einfluss auf die Generierung einer gliazellfreien Kultur dissoziierter auditorischer Neurone besser zu verstehen.

Um optimale Kulturbedingungen für eine Primärzellkultur zu finden, ist das verwendete Medium der erste Ansatzpunkt. Mittlerweile sind optimierte Medien für verschiedenste Zelltypen erhältlich. Durch verschiedenste Zusätze sind viele Kombinationen möglich.

In dieser Studie wurden zwei weithin verwendete Medien, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Neurobasal® Medium (NB), daraufhin getestet, wie sie sich auf den prozentualen Neuronenanteil und das Längenwachstum der Axone auswirken.

DMEM wird für Säugerzellen aus den unterschiedlichsten Geweben verwendet: Fibroblasten [129], Neurone [130], Gliazellen [131], Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) [132], und glatte Muskelzellen [133]. NB-Medium hingegen ist für die speziellen Anforderungen von neuronalen Zellen entwickelt worden und wird insbesondere für Kulturen von Neuronen eingesetzt.

Auf den prozentualen Anteil der überlebenden Neurone nach 4 Tagen in Kultur hatten beide Medien keinen bedeutenden Einfluss. Mit unter einem Prozent war der Neuronenanteil in beiden Konditionen sehr gering und es zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Medien. Da die Priorität von Zellmedien darin liegt, die natürliche Zellumgebung zu simulieren und somit das Überleben aller Zelltypen zu sichern, ist es typisch, dass eine selektive Präferenz von Neuronen hierbei nicht stattfand. Da die Gliazellen in Kultur im Gegensatz zu den Neuronen proliferierten, verschob sich mit zunehmender Kulturdauer das Verhältnis deutlich zu ersteren. Bei diesem Aspekt der Zellkultur schien die Methode der Zellgewinnung, also die Präparation und die Dissoziation, den Haupteinfluss auf das Verhältnis Gliazellen zu Neuronen zu haben.

Beim Wachstum des Axons hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verwendeten Medien. In DMEM-Kulturen erreichten die Neuriten mit  $212,7 \pm 8,6 \mu\text{m}$  die 2,8-fache Länge im Vergleich zu jenen in NB-Kulturen mit  $75,4 \pm 15,8 \mu\text{m}$ . Das Längenwachstum in NB war vergleichbar mit Werten für adulte Neurone aus dem Ganglion spirale in NB ( $\varnothing 50 \mu\text{m}$ ) [134].

In bisherigen Studien mit auditorischen Neuronen waren sowohl DMEM [135, 136], meist in Kombination mit Ham's F12 Medium [24, 137], als auch NB-Medium [70, 138, 139] verwendet worden, wobei letzteres besser für elektrophysiologische Untersuchungen [70, 138] und DMEM günstiger für Wachstums- und Überlebensstudien mit verschiedenen zusätzlichen Faktoren war [137, 140].

Grundsätzlich waren aber in nahezu allen Studien die verwendeten Medien durch Zusätze wie B27 und N1/N2 ergänzt, um das Überleben und das Wachstum der Zellen in den Kulturen zu garantieren. Diese Zusätze haben einen eigenen Einfluss auf das Axonlängenwachstum, wobei dieser in der vorliegenden Studie vernachlässigt werden konnte, da beide Medien mit denselben Supplementen ergänzt wurden und daher einzig die Formulierung der beiden Basal-Medien unterschiedlich war (siehe Abschnitt 2.10.1 Zellkultur).

Während NB-Medium über einige zusätzliche Aminosäuren wie L-Prolin, L-Alanin und L-Asparagin und andere weitere Bestandteile, wie Vitamin B12, verfügt, dürfte der entscheidende Faktor in dem unterschiedlichen Wachstumsverhalten Glutamin gewesen sein. Dieses fehlte im NB-Medium [141] und wurde nur über die GlutaMAX™-Ergänzung



zum Basismedium diesem beigefügt, während Glutamin in DMEM als L-Glutamin bereits in einer hohen Konzentration vorlag [142] und noch zusätzliches Glutamin durch die Supplements eingebracht wurde.

Glutamin ist neben Glukose ein wichtiger Energielieferant in Zellkulturen [143, 144]. Im Nervensystem ist Glutamin auch ein wichtiger Bestandteil des Glutamat-/GABA-Glutamin-Kreislaufs. In diesem Stoffwechselweg werden die von den Neuronen freigesetzten Neurotransmitter Glutamat und GABA (*γ-aminobutyric acid*, *γ*-Aminobuttersäure) durch die Astrozyten aufgenommen, welche im Gegenzug Glutamin freisetzen. Dieses wird durch die Neurone dann wieder in Glutamat und GABA umgewandelt [145].

Als Aminogruppen-Donor stellt diese  $\alpha$ -Aminosäure zusammen mit Ammonium auch die Haupt-Stickstoffressource für die Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen dar. Eagle *et al.* [146] konnten zeigen, dass Glutamin, neben 12 weiteren Aminosäuren, essentiell für das Überleben und Wachstum von Zellen in Kultur ist. Der Wegfall jeder dieser 13 essentiellen Aminosäuren führte zu Degeneration und Tod der Zellen. Basierend auf diesen Untersuchungen entwickelte Eagle das *Eagle's minimal essential medium* (EMEM), dessen Rezeptur die Grundlage für das in dieser Arbeit verwendete DMEM darstellt.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Supplementierung des NB-Mediums mit GlutaMAX™ ausreichend ist, um das Überleben der Neurone zu gewährleisten. Der Überschuss an Glutamin in DMEM jedoch erst erlaubte ein besseres Axonwachstum durch die Bereitstellung der nötigen Energie und der Bausteine für eine gesteigerte Proteinbiosynthese. Andererseits begünstigte dies auch die Proliferation der Gliazellen.

### 5.11 Beschichtung mit Laminin wirkte sich positiv auf das Überleben von auditorischen Neuronen und deren Axonlänge aus

In der Zellkultur wird zwischen Suspensionskulturen (Zellen schwimmen frei im Nährmedium) und adhärent wachsenden Zellen unterschieden. Letztere, zu denen unter anderen Fibroblasten und Neurone gehören, erreichen ihr optimales Wachstum erst, wenn sie sich an die Oberfläche ihrer Kultivierungsgefäße anheften können. Dieses kann durch verschiedene Beschichtungen der Kulturgefäße erleichtert werden. Zu den

bekanntesten verwendeten Beschichtungen zählen Poly-Lysin, Poly-Ornithin (beide existieren sowohl als L- wie auch als D-Enantiomer) und Laminin.

Poly-Lysin und -Ornithin sind synthetische Polymere, welche eine positive Ladung tragen und dadurch bestimmten Zelltypen die Adhäsion auf den Materialoberflächen der Kulturgefäße erleichtern. Laminine sind Glykoproteine, ähnlich dem Kollagen, und sind Bestandteile aller Basallaminae. Jedes Laminin besteht aus jeweils einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteinkette, von denen es mehrere Typen gibt. Insgesamt sind bisher 15 verschiedene Isoformen (Kombinationen aus jeweils einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteinkette) nachgewiesen worden. Laminine binden mit ihrer  $\alpha$ -Kette Rezeptoren an der Zelloberfläche und mit anderen Regionen an die extrazelluläre Matrix und sorgen damit für eine Zelladhäsion. Die Frage war, welches synthetische Polymer sich am besten eignet, Zelladhäsion, insbesondere von Neuronen, und Neuritenwachstum zu gewährleisten und ob eine zusätzliche Lamininbeschichtung nötig ist.

Es zeigte sich, dass die alleinige Beschichtung mit entweder Poly-D-Lysin (PDL) beziehungsweise Poly-L-Ornithin (PLO) zu Neuronen mit kurzen Neuriten führt. Eine zusätzliche Lamininbeschichtung führt bei beiden Polymeren zu tendenziell längeren Axonen, allerdings ist dieser Effekt nicht signifikant. Insbesondere für Kulturen von Neuronen scheint eine Beschichtung mit Laminin, ob allein oder zusätzlich zu Poly-Lysin bzw. -Ornithin, ratsam. Laminine sind in Zell-Signalwegen wie dem PI3K/AKT und NF- $\kappa$ B involviert und begünstigen dadurch sowohl das Überleben von Zellen wie auch das Neuritenwachstum [147, 148]. Laminin hatte sich bereits in Kulturen von Neuronen aus dem peripheren und zentralen Nervensystem als Stimulator für das Wachstum von Neuriten gezeigt [149].

Dieses wird gefördert, wenn die  $\alpha$ -Kette von Laminin an die Integrin-Rezeptoren in der Zelloberfläche bindet [150] und dadurch GTPasen und Cdc42 aktiviert [151]. Über die Aktivierung von c-Jun Kinasen kommt es dann zu einer erhöhten c-Jun Expression, welche das Neuritenwachstum stimuliert [152]. Auch Stickstoffmonoxid, ein wichtiger Botenstoff und Bestandteil von Signalwegen, scheint eine wichtige Rolle im Laminin-vermittelten Neuritenwachstum zu spielen [153].

Auf den prozentualen Anteil der Neurone in Kultur hatte Laminin keinen Einfluss, da die Kulturen, welche nur auf Poly-L-Ornithin wuchsen, den höchsten Neuronenanteil

aufwiesen, mit fast einem Viertel Neurone an der Gesamtzellzahl, und sich damit signifikant von allen anderen Konditionen unterscheiden. Dies musste jedoch im Zusammenhang mit der Gesamtzellzahl in den Kulturen und der reellen Anzahl der Neurone in den verschiedenen Konditionen gesehen werden. Die reelle Anzahl der Neurone sowohl auf PDL + Laminin als auch PLO + Laminin war fast doppelt bzw. viermal so hoch wie auf Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin allein. Diese Unterschiede waren nicht signifikant, gaben aber einen Hinweis, dass der Rückhalt und das Überleben von Neuronen auf Lamininbeschichtungen besser funktionieren.

Dies ließ sich bestätigen, wenn man die Gesamtzellzahl dieser Kulturen miteinander verglich. Neben den Neuronen war auch das Überleben der Gliazellen auf Lamininbeschichtungen höher. Bei Poly-L-Ornithin war die Lamininkondition signifikant unterschiedlich zu jener ohne Laminin; bei Poly-D-Lysin war die Lamininkondition höchst signifikant unterschiedlich zu jener ohne. Die Gesamtzellzahl auf Poly-L-Ornithin stellte nach vier Tagen in Kultur mit durchschnittlich 35 Zellen nur einen äußerst geringen Bruchteil der ursprünglich ausplattierten Zellen dar. Dies traf im ähnlichen Umfang auch auf Poly-D-Lysin Kulturen zu sowie auf jene mit einer Beschichtung aus Laminin, hier jedoch weniger ausgeprägt.

Die synthetischen Polymere Poly-Lysin und Poly-Ornithine interagieren als Substrate mit negativ geladenen Lipiden und Polysacchariden auf der Zelloberfläche, allerdings konkurriert diese Verbindung gleichzeitig mit den Kräften, die zu einer Zellaggregation führen [154] und ist wohl nicht geeignet eine ausreichende Zelladhäsion zu gewährleisten. In diesem Fall war es auch möglich, dass durch den Medienwechsel der Kultur schwach adhärente Zellen abgespült wurden.

Für neuronale Kulturen schienen diese Substrate allein eingesetzt deshalb nicht optimal zu sein und eine nur geringe Zellviabilität zu bewirken. In bisherigen Studien zur Eignung synthetischer Polymere für die Kultur von neuronalen Zellen wurden diese nicht allein, sondern in Kombination mit einer Basisschicht Gelatine bzw. Kollagen eingesetzt. [155]. Auch andere Polymere, wie Polyacrylate, wurden als Substrate in Kombination mit Strukturproteinen der extrazellulären Matrix eingesetzt [156], da diese die natürlichen Lebensbedingungen der Zellen besser simulieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es für Kulturen dissoziierter Neurone keine signifikante Präferenz für eine bestimmte Substratbeschichtung gibt. Tendenziell ist eine Lamininbeschichtung zu bevorzugen, wobei die Variante Poly-D-Lysin + Laminin ein besseres Axonwachstum ermöglicht und die Variante Poly-L-Ornithin + Laminin einen höheren Neuronenanteil.

## 5.12 Das Längenwachstum von Axonen wurde durch Leukemia Inhibitory Factor (LIF) gefördert

*In vitro* sind viele verschiedene Faktoren an der Entwicklung, Differenzierung und dem Erhalt von Zellen beteiligt, wobei in Neuronen insbesondere die neurotrophen Faktoren, welche zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren gehören, diese Aufgaben übernehmen. Zu ihnen gehören NGF, BDNF, NT-3, NT-4 sowie die GDNF-Ligand-Familie und CNTF. In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf dem Einfluss von BDNF und NT-3 auf das Axon- und das Neuronenwachstum, da diese beiden im Corti'schen Organ prädominant vorkommen und maßgeblich zur Ausbildung der Innervierung desselbigen beitragen [157-160]. Neben deren Fähigkeit, das Neuritenwachstum zu steigern, beeinflussen sie auch das Überleben der Neurone positiv [161-163].

*Leukemia inhibitory factor* (LIF) ist ein Zytokin, welches zuerst in der Zelllinie M1 entdeckt und beschrieben wurde [164]. Neben seiner ursprünglichen Eigenschaft, die terminale Differenzierung von Leukämiezellen zu induzieren, wurden mittlerweile noch weitere Fähigkeiten entdeckt, so z.B. die Inhibition der Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen.

Auch neuronale Zellen sind auf LIF angewiesen, welches die Differenzierung und das Wachstum sensorischer Neurone aus Vorläuferzellen im Dorsalganglion beeinflusst und neuroprotektive Eigenschaften für adulte Neurone aufweist [165, 166]. Da LIF strukturelle Homologien zu CNTF aufweist [167], welches trophisch auf Neurone des Ganglion spirale wirkt [168], stellte sich die Frage, inwiefern LIF ebenfalls neurotrophische Eigenschaften in Kulturen dissoziierter auditorischer Neurone zeigt, oder ob diese stärker durch BDNF und NT-3 stimuliert werden.

Bei Verwendung der Faktoren mit einer Konzentration von 50 ng/ml zeigte nur LIF einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,05$ ) auf das Axonwachstum im Vergleich zur Kontrolle. Axone

in der BDNF- und NT-3-Kondition waren tendenziell ebenfalls länger als die in der Kontroll-Kondition, allerdings nicht signifikant.

Diese wachstumsfördernde Eigenschaft von LIF konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden. In Kulturen dissoziierter Neurone aus dem Ganglion spirale neonataler Ratten förderte LIF in derselben Konzentration wie in dieser Untersuchung das Axonwachstum stärker als BDNF [136], wobei dort allerdings auch BDNF einen signifikanten Effekt zeigte. Da sich die Präparationsmethode in dieser Arbeit, in der der gesamte Modiolus zu Gewinnung der Neurone benutzt wurde, von dem Vorgehen in der vorliegenden Studie unterschied, waren die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar, da trophische Effekte durch nicht-neuronale Zellen verstärkt auftreten konnten. Der Effekt durch LIF auf das Axonwachstum scheint durch die verwendete Konzentration und das Alter der Primärzellen beeinflusst zu werden. In einer Studie an adulten auditorischen Neuronen [134] zeigte LIF in derselben Konzentration (Kondition low entspricht 50 ng/ml in Lösung) keinen signifikanten Einfluss auf die Länge der Neuriten. Für diese Studie wurden allerdings nicht nur bipolare Neurone vermessen. Mit LIF in doppelter Konzentration (Kondition high entspricht 100 ng/ml in Lösung) konnte ein signifikanter Anstieg der Neuritenlänge beobachtet werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass neurotrophische Effekte durch LIF dosisabhängig sind, wobei die optimale Dosis vermutlich durch das Alter der verwendeten Zellen bedingt wird.

Es stellte sich auch die Frage, warum sowohl BDNF wie auch NT-3 keinerlei Einfluss auf das Axonwachstum in der Versuchsreihe zeigten. Auf den prozentualen Anteil der Neurone in Kultur hatte keiner der eingesetzten Faktoren einen signifikanten Einfluss. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass BDNF und NT-3 das Überleben von auditorischen Neuronen fördern [169, 170], wobei sich meist auf die absolute Zahl der überlebenden Zellen bezogen wurde und nicht auf den prozentualen Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl. In einer anderen Arbeit wurde jedoch auch gezeigt, dass BDNF und NT-3 zwar das Überleben der auditorischen Neurone fördert, ihr Einfluss auf die Neuritogenese aber limitiert ist [169]. Für letzteres war NGF geeigneter und erreichte eine Sättigung bei einer Konzentration von 50 ng/ml, ähnlich dem LIF in dieser Studie. Andere Untersuchungen an Explantaten des Corti'schen Organes hatten einen Einfluss von BDNF auf auditorische Neurone vom Typ I und II in Hinsicht auf Neuritenanzahl und -

wachstum gezeigt [171]. Der BDNF-Zusatz bewirkte bei beiden Typen eine gesteigerte Anzahl von auswachsenden Neuriten, aber nur Typ II Neurone zeigten eine signifikant erhöhte Neuritenlänge unter BDNF (Konzentration 100 ng/ml). In der vorliegenden Studie wurden Typ I und II Neurone aber nicht differenziert betrachtet und, da der Anteil von Typ I Neuronen 90-95 % aller Neurone im Ganglion spirale entspricht, durfte davon ausgegangen werden, dass dieses Verhältnis auch in Kulturen dissoziierter Neurone bestand und eventuelle Effekte durch BDNF an Typ II Neuronen in dieser Versuchsdurchführung statistisch nicht erfasst werden konnten.

### 5.13 Der Neuronenanteil einer Kultur dissoziierter auditorischer Neurone konnte durch Einsatz von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid (AraC) gesteigert werden

Um die Reinheit einer Kultur dissoziierter auditorischer Neurone zu erhöhen, sollte die vorrangige Intention sein, den Anteil der Neurone in Kultur im Vergleich zu anderen Zellen, insbesondere Gliazellen, zu erhöhen. Dies gilt besonders, wenn es das Ziel ist, diese Kultur zu nutzen, um dosisabhängige Auswirkungen neurotropher Faktoren zu untersuchen. Da Gliazellen diese Faktoren ebenfalls sezernieren, kann man ansonsten nicht eindeutig sagen, ob beobachtete Effekte durch exogene oder endogene Elemente hervorgerufen werden.

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Maßnahmen getroffen werden können, um den Neuronenanteil in Kulturen dissoziierter auditorischer Neurone deutlich zu erhöhen.

Es ließ sich feststellen, dass fast alle der untersuchten Aspekte zumindest zu tendenziellen Veränderungen im Neuronenanteil führten, egal ob positiven oder negativen. Auch zwischen verschiedenen Versuchsreihen, z.B. Medium und Beschichtung, war bei der Kontrollkondition eine natürliche Varianz im Neuronenanteil festzustellen, welche durch die manuelle Genauigkeit der Probennahme bedingt war. Innerhalb einzelner Versuchsreihen war dieser Punkt zu vernachlässigen, da für einen Vergleich verschiedener Konditionen in einer Zellkulturschale (4-well, vergleiche Abb. 27 und 35) immer Zellen vom gleichen Tier verwendet wurden.

Die Wahl des Mediums und der Einsatz neurotropher Faktoren bzw. von Leukemia Inhibitory Factor hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Neuronenanteil.

Den Neuronenanteil signifikant erhöhen konnte man hingegen durch den Einsatz von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid. Dieses Zytostatikum hemmt die Zellteilung, indem es als „falsches“ Nukleosid in die DNA integriert wird und zusätzlich die DNA-Reparaturmechanismen hemmt. Es wird bevorzugt in der Chemotherapie zur Behandlung verschiedener Leukämieformen, insbesondere der akuten myeloischen Leukämie, eingesetzt [172]. Seine proliferationshemmenden Eigenschaften machen es für den Einsatz in der Zellkultur interessant. Im Gegensatz zu auditorischen Neuronen proliferieren Gliazellen nicht nur, sondern sie sezernieren auch. Dadurch sinkt mit zunehmender Dauer der Kultur der Neuronenanteil.

Wird nun Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid zur Proliferationshemmung eingesetzt, gilt es hierfür die optimalen Parameter zu finden. In dieser Arbeit wurden die am besten geeignete Dosierung und die günstigste Applikationsdauer bzw. der beste Applikationszeitpunkt gesucht. Es zeigte sich, dass der einflussreichere Faktor die eingesetzte Dosierung ist und weniger der Zeitpunkt der Applikation.

Aus einer Stocklösung von 2 mM Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid wurden Verdünnungen mit Konzentrationen von 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 3,3  $\mu$ M hergestellt. Mit der Konzentration von 10  $\mu$ M wurde untersucht, ob eine frühere (ab 1 h nach Ausplattierung der Zellen) oder spätere Gabe (ab d2 nach Ausplattierung) von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid größeren Einfluss auf die Wachstumseigenschaften der Neurone hatte. Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Konditionen in Bezug auf das Längenwachstum der Neurone gab, dies war vergleichbar zum Wachstum von Zellen aus dem Neuralrohr von Hühnerembryonen [173] bzw. Neuronen aus dem Ganglion spirale der Ratte [174] bei Zusatz von AraC. Auf die Gesamtzellzahl hatte die AraC-Gabe, egal zu welchem Zeitpunkt und für welche Dauer sie erfolgte, einen signifikanten Einfluss. Es kam zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle in beiden Konditionen mit AraC-Gabe ab 1 h nach Ausplattierung. Während es auch zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl auf den Deckgläschen kam, die erst nach 2 Tagen AraC erhielten, war die Zellzahl aber signifikant höher als bei AraC-Gabe nach einer Stunde. Es ließ sich vermuten, dass durch den Mediumwechsel nach einer Stunde für die Applikation von AraC ein Teil der Zellen wieder abgewaschen wurde und dadurch die niedrige Gesamtzellzahl erklärt werden könnte. Andererseits konnte aber AraC durch

die frühe Gabe auch frühzeitig die Proliferation nicht-neuronaler Zellen hemmen. Diese Reduktion der Gesamtzellzahl durch AraC konnte auch in Kulturen von Neuronen aus dem Ganglion spirale der Ratte gezeigt werden [174]. Damals ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Neurone zwischen Kontroll- und AraC-Bedingungen und auch kein Anstieg des prozentualen Neuronenanteils. Demgegenüber war dieser in der aktuellen Arbeit in der Kondition 1 h bis d4 signifikant erhöht. Es soll erwähnt sein, dass in den Konditionen „AraC ab 1 h“ die Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrolle um das circa 100-fache verringert war, während in der Studie von Schwieger *et al.* [174] dieser Unterschied einen Faktor von etwa 10 ausmachte. Letzteres war vergleichbarer mit dem ungefähr 4,5-fachen Unterschied der Gesamtzellzahl zwischen Kontrolle und der Kondition d2 bis d4. Dies bedeutet zusammengefasst, dass der signifikante Anstieg des prozentualen Neuronenanteils, der gleichzeitig nur wenig reelle Neuronen (<2) darstellt, vermutlich vornehmlich durch den experimentalen Ablauf (Mediumwechsel führt zu Zellverlust) bedingt war und weniger durch den zeitlichen Einfluss von AraC. Es besteht auch die Möglichkeit, dass AraC einen hemmenden Einfluss auf das Adhäsionsvermögen der Zellen hatte und dadurch einen Zellverlust durch frühen Mediumwechsel begünstigte. Da in der Kondition d2 bis d4 reell annähernd so viele Neurone überlebten wie in der Kontrollkondition, wurde diese zeitliche Variante für die nächste Versuchsreihe gewählt.

Auf die Axonlänge hatte, wie auch beim zeitlichen Verlauf, keine der verwendeten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss. Lediglich beim prozentualen Neuronenanteil konnte mit den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  eine signifikante Erhöhung festgestellt werden. Wenngleich Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid als Zytostatikum eingesetzt wird um die Proliferation von Tumorzellen zu hemmen und in Studien wie dieser um unerwünschte Zellarten in einer Zellkultur kontrollieren zu können, darf nicht vergessen werden, dass es durch seine Eingriffe in die Stoffwechselforgänge der Zellen zytotoxisch auf alle Zellarten wirkt. Schnell proliferierende Zellen wie Tumorzellen werden daher auch vornehmlich angegriffen und geschwächt. Unerwünschte Nebeneffekte können aber trotzdem auftreten, unter anderem auch neurologische Pathologien [175, 176]. Diese Nebeneffekte und der Therapieerfolg wurden durch die verabreichte Dosis bedingt [177]. Dabei sind die für Therapien am



Menschen verwendeten Dosen von Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid wesentlich höher als in Zellkulturexperimenten. Trotzdem können auch hier Dosen, welche für Therapieerfolge viel zu niedrig wären, bereits tödlich auf kultivierte Zellen wirken.

Beim Vergleich verschiedener Konzentrationen (10, 5 und 3,3  $\mu$ M) konnte kein Effekt von AraC auf die Gesamtzellzahl nachgewiesen werden, konträr zur beobachteten signifikanten Reduktion in derselben Kondition (10  $\mu$ M von d2 bis d4, vergl. Abb. 37 und 41) der vorherigen Versuchsreihe (4.5.4.1 Dauer und Zeitraum der Applikation von AraC). Tendenziell war die Gesamtzellzahl mit allen Konzentrationen von AraC niedriger als in der Kontrolle.

Eine signifikante Erhöhung des prozentualen Neuronenanteils konnte hingegen bei Gabe von 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid festgestellt werden. In Studien konnte bisher gezeigt werden, dass ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M AraC in Kulturen von Muskelzellen eine Reduktion von Fibroblasten auftrat [178]. Geringere Konzentrationen hatten keinen Effekt. Eine weitere Studie an dissoziierten Neuronen hatte gezeigt, dass AraC in Konzentrationen von 10  $\mu$ M oder niedriger keinen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen hatte, bei höheren Konzentrationen diese aber um die Hälfte abnahm [173].

Hier konnte gezeigt werden, dass AraC in Konzentrationen von 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M den prozentualen Neuronenanteil in Kulturen von dissoziierten auditorischen Neuronen der Maus nach 4 Tagen signifikant erhöht. Diese zwei Konzentrationen schienen Eckpunkte für den Einsatz von AraC als Proliferationshemmer in Zellkulturen darzustellen. Wie bereits erwähnt, reduzierten höhere Konzentrationen die Überlebensrate von neuronalen Zellen. Die niedrigste untersuchte Konzentration von 3,3  $\mu$ M in dieser Studie zeigte keine Auswirkung auf den prozentualen Neuronenanteil, aber bereits eine geringe Erhöhung der AraC-Zugabe auf 5  $\mu$ M erzielte einen Effekt. Bei Untersuchungen an dissoziierten Neuronen aus dem Ganglion spirale von Ratten wurde mit 5  $\mu$ M AraC nach 4 Tagen der Anteil der Neurone nur tendenziell erhöht, nach 7 Tagen war diese Erhöhung auch signifikant [174]. Dies untermauert die Annahme, dass der optimale Einsatzbereich von AraC in Kulturen neuronaler Zellen zwischen 5 und 10  $\mu$ M liegt. Allerdings trägt zum Ergebnis immer die Kombination aller eingesetzter Faktoren bei.

#### 5.14 Kombinatorischer Einsatz der untersuchten Variablen führte zu gesteigertem Axonwachstum und einer Erhöhung des Neuronenanteils in der Kultur

Ein kombinatorischer Einsatz der einzelnen untersuchten Faktoren sollte zeigen, inwiefern es möglich ist, eine Kultur mit einem höchstmöglichen Anteil dissoziierter auditorischer Neurone gegenüber nicht-neuronalen Zellen zu erhalten.

Hierbei zeigte sich, dass die Ergebnisse vornehmlich durch die letzten beiden untersuchten Faktoren, die Gabe von LIF bzw. neurotrophen Faktoren und den Einsatz des Zytostatikums Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid beeinflusst waren, da die Resultate die der individuellen Versuchsreihen widerspiegeln.

Die Axonlänge war in beiden Konditionen mit LIF signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Der Einsatz von AraC hatte in der individuellen Betrachtung keinen Einfluss hierauf gezeigt und sollte somit auch im kombinatorischen Einsatz keinen bedeutenden Einfluss auf die Neuritenlänge haben.

Die Gesamtzellzahl war in der Kondition LIF + AraC 10  $\mu$ M signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Dies war in der Untersuchung des besten Zeitpunktes zum Einsatz von AraC ebenfalls beobachtet worden, jedoch nicht bei der Analyse verschiedener Konzentrationen von AraC. Es ist zu vermuten, dass bei der Reduktion der Gesamtzellzahl andere Faktoren, die in dieser Studie nicht untersucht worden waren, einen ebenfalls bedeutenden Einfluss hatten. Hierzu zählten die Präparationsweise der auditorischen Neurone und die Anzahl der ausplattierten Zellen sowie die biologische Varianz zwischen verschiedenen Versuchstieren.

Im kombinatorischen Einsatz mit AraC zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg des prozentualen Neuronenanteils. Da LIF in der Einzeluntersuchung keinen Effekt bewirkt hatte, wohl aber AraC, ist zu vermuten, dass der Anstieg alleine durch den Einsatz von AraC erklärt werden kann.

Letztendlich bedeutet dies, dass das gewählte Medium und LIF einen Einfluss auf die Axonlänge haben, während AraC den prozentualen Neuronenanteil positiv beeinflusst. Darüber hinaus ist festzustellen, dass es für die Kulturen dissoziierter auditorischer Neurone keine Präferenz für eine bestimmte Substratbeschichtung gibt, wobei eine zusätzliche Lamininbeschichtung zu bevorzugen ist.

Allerdings ermöglichte auch der kombinatorische Einsatz aller dieser Faktoren nicht eine

reine Kultur dissoziierter auditorischer Neurone zu erlangen. Der Anteil der Neurone konnte aber, insbesondere durch den Einsatz eines Zytostatikums, signifikant gesteigert werden, wie auch in einer anderen Studie gezeigt werden konnte [174]. Durch die kurze Versuchsdauer war es schwer, das Verhältnis nicht-neuronaler Zellen zu auditorischen Neuronen deutlich zugunsten letzterer nur durch Zytostatika und neurotrophe Faktoren zu verschieben, da hier auch die Varianz durch die Präparation der Zellen für die Kultur beeinflussend war. Es besteht die Möglichkeit, dass durch eine längere Kulturdauer und intervallartige Zytostatikagaben sowie durch andere Faktoren eine weitere Erhöhung des prozentualen Neuronenanteils erreicht werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Als einer der fünf Sinne ist der Hörsinn für uns Menschen von entscheidender Bedeutung, um mit der Umwelt in Kontakt zu treten und kommunizieren zu können. Störungen dieses Sinnes treten im Laufe eines Lebens bei über 60 % aller Menschen auf und schränken deren Reizwahrnehmung ein.

Eine Unterscheidung erfolgt dabei in sensorineurale Erkrankungen, sogenannte Schallempfindungsschwerhörigkeiten, und nicht-sensorineurale, Schallleitungsschwerhörigkeiten. Sensorineurale Störungen sind dabei schwerer oder bislang nicht zu therapieren, da sie neurale Strukturen des Ohrs wie die Sinneszellen oder den Hörnerv betreffen.

Sensorineurale Schwerhörigkeiten können unter anderem durch genetische Prädisposition ausgelöst werden. Dabei erfolgt meist eine Mutation in einem Gen, welches im komplexen Vorgang des Hörprozesses involviert ist. Dies können zum Beispiel Gene für Strukturproteine, Ionenkanäle oder neurotrophe Faktoren sein. Da der menschliche Organismus komplex ist, ist die Wirkung der exprimierten Proteine eines Gens nicht nur auf die exprimierende Zelle beschränkt, sondern beeinflusst auch benachbarte Zellen und Gewebe. Dies geschieht zum Beispiel beim neurotrophischen Support der Neurone des Ganglion spirale durch das sich entwickelnde Corti'sche Organ. Neurotrophische Faktoren sind körperweit für die Differenzierung von Neuronen aus den Progenitorzellen verantwortlich. Ein zellspezifischer Knockout dieser Faktoren im Innenohr könnte neue Erkenntnisse in Bezug auf die Pathophysiologie sensorineuraler Hörstörungen, wie die der auditorischen Neuropathie, bringen. Die auditorische Neuropathie ist dadurch gekennzeichnet, dass die morphologischen Strukturen des Innenohrs nicht beeinträchtigt sind, aber die Weiterleitung der akustischen Information auf den Hörnerv gestört ist.

Zur Erforschung solcher Pathophysiologien haben sich zellspezifische Knockout-Mausmodelle, welche die Erkrankung nachbilden, als unschätzbare Hilfsmittel erwiesen. Da die meisten Pathologien nur bestimmte Gewebe betreffen, müssen zellspezifische Marker, sogenannte Promotoren, identifiziert werden. Zur Nachbildung der Erkrankung müssen zwei spezifische Mausmodelle miteinander gekreuzt werden, sodass die Pathologie in den Nachkommen auftritt. Hierfür werden oft Cre//loxP-Mausmodelle

eingesetzt. Ein Modell trägt dann das zu untersuchende Gen flankiert mit *loxP*-Sequenzen, während in das Genom des zweiten Modells Cre Rekombinase so eingebracht wurde, dass diese nur durch den identifizierten, zellspezifischen Promotor in bestimmten Geweben exprimiert wird. Werden diese Linien miteinander gekreuzt, können in den Nachkommen durch die Interaktion von Cre Rekombinase und den *loxP*-Sequenzen gewebespezifisch Gene ausgeschaltet werden, um Pathologien nachzubilden.

Ein zellspezifisches Gen des Innenohres, welches hierfür eingesetzt werden kann, ist das *Brn3.1* Gen, welches zur POU-Familie der humanen Transkriptionsfaktoren gehört. Dieses Gen exprimiert im Innenohr nur in den inneren und äußeren Haarzellen des Corti'schen Organes. Eine Mutation in diesem Gen wurde bereits als Auslöser einer sensorineuralen Schwerhörigkeit identifiziert.

In der vorliegenden Studie sollte es darum gehen zu untersuchen, inwiefern ein neues konditionelles Mausmodell, die *Brn3.1* IRES Cre Maus, und ein bestehendes Mausmodell, die *pmn*-Maus, sich eignen, um die Erkrankung der auditorischen Neuropathie nachzubilden. Die *Brn3.1* IRES Cre Maus wurde hier mit geflochten Reporter-Mauslinien verkreuzt, um die Expression von Cre-Rekombinase unter der Aktivität des *Brn3.1* Promotors zu evaluieren und die Eignung für weitere Verkreuzungen mit flox-Linien festzustellen. Die *pmn*-Maus ist ein anerkanntes Modell einer Motoneuronerkrankung, hatte aber in vorherigen Untersuchungen bereits erhöhte Hörschwellen gezeigt. Alle verwendeten Mauslinien einschließlich der Reporter- und Backgroundlinien sowie der F1-Nachkommen aus diesen Verkreuzungen wurden mittels ABR und DPOAE frequenzspezifisch untersucht, um die Funktion der inneren und äußeren Haarzellen im Corti'schen Organ zu evaluieren. Bei der *pmn*-Linie wurden die audiologischen Untersuchungen frequenzspezifisch zwischen P21 und P35 durchgeführt. Dies war bedingt durch den Zeitpunkt der vollständigen Entwicklung des Hörorgans (P21) und dadurch, dass homozygot betroffene Tiere im Alter von 5-6 Wochen sterben. Zusätzlich wurde in dieser Linie das Corti'sche Organ zu diesen Zeitpunkten morphologisch untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, dass alle für Verkreuzungen verwendeten Mauslinien sowieso deren F1-Nachkommen keine erhöhten Hörschwellen im Vergleich zur

Backgroundlinie C57BL/6 hatten und normale DPOAE-Antworten zeigten. Es konnten keine morphologischen Auffälligkeiten im Corti'schen Organ der Linien festgestellt werden. Die Verkreuzung der Brn3.1 IRES Cre Linie mit den beiden Reporterlinien ergab, dass eine Cre-Rekombinase-Expression unter der Aktivität des *Brn3.1* Promotors nur an den postnatalen Tagen P14 und P21 nachweisbar war. Diese Expression erfolgte mosaikartig in äußeren Haarzellen. Zu anderen Zeitpunkten konnte keine Expression nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer RT-PCR konnte eine Diskrepanz zwischen Genotyp und Expression des Reporterproteins im Gewebe festgestellt werden. Dies ließ vermuten, dass die Expression von Cre-Rekombinase durch *gene silencing* Prozesse unterdrückt wurde und *Brn3.1* als Promotor nicht leistungsstark genug war, um eine Cre-Rekombinase-Expression verlässlich steuern zu können.

Die audiologischen Untersuchungen der pmn-Linie zeigten, dass diese Tiere bereits zum Zeitpunkt P21 signifikant erhöhte Hörschwellen in allen untersuchten Frequenzen im Vergleich zum Wildtyp hatten. DPOAE-Antworten konnten in der pmn-Linie nur bedingt ausgelöst werden. Als Grund zeigte sich in den morphologischen Untersuchungen ein Verlust von äußeren Haarzellen über die gesamte Länge des Corti'schen Organes. Durch einen TUNEL-Assay konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass das Absterben dieser Zellen durch apoptotische Vorgänge erfolgte. Der pmn-Phänotyp entsteht durch eine Mutation im *TBCE* Gen dieser Linie. Dieses Gen kodiert für ein Protein, welches einen stabilisierenden Einfluss auf die Organisation der Mikrotubuli hat. Die TBCE-Verteilung im Corti'schen Organ zeigte, dass dieses hauptsächlich in den äußeren Haarzellen und inneren Stützzellen exprimiert wird und damit wahrscheinlich ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf die Erhaltung der Haarzellen hat. Eine Analyse des Hörnervs offenbarte einen Verlust von Mikrotubuli. Durch diese dargestellten kombinierten Pathologien des Hörnervs wie auch der Haarzellen kann diese Linie nicht als ideales Modell für die auditorische Neuropathie dienen.

Neben diesen *in vivo* Untersuchungen sollte außerdem eine gliazellfreie Kultur von dissoziierten auditorischen Neuronen etabliert werden, um dosisabhängige Untersuchungen von Neurotrophinen ermöglichen zu können. Gliazellen in Kulturen sezernieren ebenfalls Neurotrophine und können somit Ergebnisse verfälschen. Hierfür wurden mehrere Faktoren einer Primärzellkultur in Bezug auf ihren Einfluss auf die

Gesamtzellzahl, den prozentualen Anteil von Neuronen und deren Axonlänge untersucht. Das Medium, die Beschichtung des Zellkulturgefäßes, die Gabe von Neurotrophinen bzw. Zytokinen und der Einsatz eines Zytostatikums wurden in individuellen Versuchsreihen untersucht. Es zeigte sich, dass die ersten drei genannten Faktoren Medium, Beschichtung und Neurotrophine bzw. Zytokine, hauptsächlich einen Einfluss auf das axonale Längenwachstum von Neuronen haben. Den Prozentsatz der Neurone in Kultur beeinflusste hingegen nur der Einsatz des Zytostatikums Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid signifikant. Die Ergebnisse wurden auch im Zusammenhang mit der realen Anzahl der Neurone in Kultur gesehen, da es in der Versuchsreihe mit der Beschichtung der Deckgläschen auch einen hohen prozentualen Anteil an Neuronen gab, sich dieser aber durch eine geringe Gesamtzell- und Neuronenanzahl ergeben hatte. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass Lamininbeschichtungen zu bevorzugen sind.

Es ergab sich weiterhin eine Präferenz für DMEM- über NB-Medium, Einsatz des Zytokins LIF gegenüber den neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 und die Gabe des Zytostatikums Cytosin- $\beta$ -D-arabinofuranosid ab Tag 2 nach Ausplattierung in einer Konzentration von 5-10  $\mu$ M. Ein kombinatorischer Einsatz dieser Präferenzen spiegelte in Summe die Ergebnisse der Versuchsreihen mit Neurotrophinen/Zytokinen und Zytostatikum wieder. Der Anteil der Neurone in der Kultur konnte im Durchschnitt auf 10-12 % gesteigert werden. Eine Verschiebung des Glia-/Neuronenanteils zugunsten der Neurone ist vermutlich nur durch den Einsatz weiterer Faktoren oder anderer Methoden möglich.

Die untersuchten Mausmodelle zeigten auf Grund der Untersuchungsergebnisse nur teilweise Ähnlichkeiten mit der Erkrankung der auditorischen Neuropathie. Die Erkenntnisse zur pmn-Mauslinie über das frequenzspezifische Hörvermögen und die morphologische Degeneration im Corti'schen Organ im altersabhängigen Verlauf können aber hilfreich sein, um neben der motorischen auch die sensorische Degeneration dieser Pathologie besser zu verstehen. Zudem konnten auch umfassende Erkenntnisse für die Kultur von dissoziierten auditorischen Neuronen der Maus in Bezug auf verschiedene Variablen erhalten werden.

## 7 Summary

As one of the five senses the aural sense is the most essential part for human interactions and communication. Over 60 % of all humans experience disturbances in their sense of hearing during their lifetime.

These disturbances are differentiated into non-sensorineural disorders with a disturbed sound transmission, and sensorineural ones, which affect the neural structures of the ear. As these neural structures cannot be repaired, treatment is limited to amplification measures up to electrical stimulation of nerve structures f.e. in the form of cochlear implants.

Sensorineural disorders can be caused by genetic predisposition. They are either a symptom of another disease or are triggered by a mutation in a gene involved in the hearing process. These could be genes for structural proteins, ion channels or neurotrophic factors, to name just a few. The influence of the expressed protein of the gene often includes, aside from the expressing cell, neighboring cells and tissues. An example is the neurotrophic support of spiral ganglia in the developing organ of Corti. Neurotrophic factors are generally responsible for differentiating neurons from progenitor cells. A cell specific knockout of these factors in the inner ear can lead to new insights into possible treatment options for sensorineural disorders like auditory neuropathy. In patients with auditory neuropathy the neural transmission of the acoustic information to the brain is disturbed, while the morphologic structures of the inner ear are without pathologies.

Cell specific knockout mouse models have proved to be an important tool to mimic human disorders for further research. For this purpose, cell specific markers, also called promoters, have to be identified to generate *Cre/loxP* mouse models. These models contain Cre recombinase under the control of a cell specific promoter. If they are crossbred with mice containing a gene of interest flanked by *loxP* sequences, Cre recombinase will interact with these sequences and the gene will be knocked out cell specific in the offspring, thus mimicking human pathologies.

A cell specific gene of the inner ear is *Brn3.1*. It belongs to the POU-family of human transcription factors and is expressed in the inner ear only in the inner and outer hair cells of the organ of Corti. A mutation in this gene has already been identified to cause a



sensorineural hearing loss.

The actual study was focused on the question if a newly generated mouse model, the Brn3.1 IRES Cre mouse, and an established line, the pmn-mouse, were suitable to simulate the pathology of auditory neuropathy. The Brn3.1 IRES Cre mouse was crossbred with flox reporter mouse lines to evaluate the expression of Cre recombinase under the activity of the Brn3.1 promoter and to consider its suitability for further crossbreeding with other flox lines. The pmn-mouse is the existing murine model of a motoneuron disease, but also showed elevated hearing thresholds in previous studies. All used lines including reporter and background lines and the F1 offspring of these crossbreeds were audiotically tested at different frequencies using ABR and DPOAE to evaluate the functional status of outer and inner hair cells in the organ of Corti. These evaluations were done in the pmn-line weekly from P21 to P35. These time points were chosen, since the sense of hearing is fully developed until P21 and homozygous affected animals die around 5-6 weeks of age. At those time points the organ of Corti was also evaluated morphologically.

The study showed that all mouse lines used for crossbreeding and F1 offspring thereof showed normal hearing thresholds compared to the background line C57BL/6 and displayed DPOAE answers. In F1 offspring of Brn3.1 IRES Cre crossbred with the LacZ reporter line Cre recombinase expression under Brn3.1 promoter activity was observed at P14 and P21. Expression was mosaic-like in outer hair cells and limited to the aforementioned time points. Using RT-PCR it was possible to show a discrepancy between genotype and expression of the reporter protein in the tissue. It was assumed, that expression of Cre recombinase was suppressed by *gene silencing* processes and *Brn3.1* was not potent enough to drive sufficient Cre recombinase expression.

The audiological evaluation of the pmn-line showed, that already at P21 these animals had elevated hearing thresholds compared to wildtype mice. DPOAE answers could be elicited only in certain frequencies in pmn-mice. Morphological analysis showed a loss of outer hair cells spanning the whole length of the organ of Corti at all phases. A TUNEL assay showed that the hair cells died by apoptosis. The pmn-phenotype is characterized by a mutation in the *TBCE* gene, a protein responsible for organization of microtubules. A distribution analysis showed that TBCE in the organ of Corti was mainly expressed in

the outer hair cells as well as the inner pillar cells and thus likely also influences the maintenance of these structures. The auditory nerves of the pmn-mice also displayed some loss of microtubules. Because of the degenerative processes and the following morphological changes in the organ of Corti, this line cannot be used as a typical model of auditory neuropathy.

Additionally to the *in vivo* evaluation, it was tried to establish a glial cell free culture of dissociated spiral ganglia neurons to allow for dose-dependent studies of neurotrophins. Glial cells in culture also secrete neurotrophins and thus might have an influence on results. Therefore several factors of a primary cell culture were evaluated concerning their influence on overall cell number, percentage of neurons and neuritic outgrowth.

To establish a glial cell free culture of dissociated spiral ganglia neurons, the variables media, coating, neurotrophins/cytokines and use of a cytostatic were evaluated separately. While the first three mentioned mainly influenced the neurite outgrowth in culture, the last one increased the percentage of neurons. The results were checked against the real number of neurons in culture, because the choice of coating also increased the percentage of neurons, however this was due to low overall number of cells and neurons. Still, additional laminin coating was preferable.

The results yielded a preference for DMEM over NB medium, the use of the cytokine LIF over the neurotrophins BDNF and NT-3 and the application of the cytostatic cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranosid at a concentration of 5-10  $\mu$ M from day 2 after plating. Combining these preferences yielded similar results to those of the test series of neurotrophins/cytokines and cytostatic. The percentage of neurons in culture could be increased to an average of 10-12 %. A shift of the glial cell/neuron percentage in favor of the latter seems to need the addition of further factors or the use of other methods.

The results showed, that the mouse lines evaluated in this study did not resemble pathologies fully comparable to those of auditory neuropathy. However, further information on the pmn-mouse line concerning frequency-specific hearing thresholds and morphologic degeneration in the organ of Corti in a time dependent manner could be gathered. This may be helpful to better understand sensory next to motor neuron degeneration in this pathology. Furthermore comprehensive results could be gained for the culture of dissociated spiral ganglia neurons concerning different variables.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>*</b>	p<0,05
<b>**</b>	p<0,01
<b>***</b>	p<0,001
<b>β-Gal</b>	beta-Galactosidase
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µM</b>	Mikromol
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µm<sup>2</sup></b>	Quadratmikrometer
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABR</b>	<i>Auditory brainstem response</i> , akustisch evozierte Hirnstammpotentiale
<b>ALS</b>	Amyotrophe Lateralsklerose
<b>AN</b>	Auditorische Neuropathie
<b>Aq. dem</b>	Wasser demineralisiert
<b>Aq. dest</b>	Wasser destilliert
<b>AraC</b>	Cytosin-β-D-arabinofuranosid
<b>BDNF</b>	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> , Wachstumsfaktor BDNF
<b>BERA</b>	<i>Brainstem evoked response audiometry</i> , Hirnstammaudiometrie
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> , Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CAG-Promotor</b>	Synthetische DNA-Element mit Bestandteilen aus dem humanen Cytomegalievirus ( <b>C</b> ), dem beta-Aktin Gen von Hühnern ( <b>A</b> ), und dem beta-Globin-Gen von Kaninchen ( <b>G</b> ).
<b>CMV</b>	<i>Cytomegalovirus</i>
<b>d</b>	Tag
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>dB</b>	Dezibel
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<b>DPOAE</b>	Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen
<b>E</b>	Embryonaltag
<b>EDTA</b>	Ethylendiaminetetraacetic acid
<b>F1</b>	Filialgeneration 1
<b>GQ</b>	Großquadrat

<b>h</b>	Stunde
<b>HBSS</b>	Hanks' Balanced Salt Solution
<b>IRES</b>	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> , interne ribosomale Eintrittsstelle
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>kHz</b>	Kilohertz
<b>Kon.</b>	Kontrolle
<b>l</b>	Liter
<b>Lam</b>	Laminin
<b>LIF</b>	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> , Leukämiehemmender Faktor
<b>loxP</b>	locus of X over P1
<b>M</b>	Mol
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimol
<b>mm</b>	Millimeter
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaPP</b>	Natrium-Phosphat-Puffer
<b>NB</b>	Neurobasal
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NT-3</b>	Neurotrophin-3
<b>OAE</b>	Otoakustische Emissionen
<b>OHC</b>	<i>outer hair cell</i> , äußere Haarzelle
<b>P</b>	Postnataler Tag
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PLO</b>	Poly-L-Ornithin
<b>PDL</b>	Poly-D-Lysin
<b>pmn</b>	<i>progressive motor neuronopathy</i> , progressive Motoneuropathie
<b>POU4F3</b>	POU domain class 4 transcription factor 3
<b>R</b>	Reihe
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<b>POI</b>	<i>region of interest</i> , Region von Interesse
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase

<b>SD</b>	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
<b>SEM</b>	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
<b>SPL</b>	<i>sound pressure level</i> , Schalldruckpegel
<b>TBCE</b>	<i>Tubulin-specific chaperone E</i> , tubulinspezifisches Chaperon E
<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
<b>TX-100</b>	Triton X-100
<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i> , untranslatierte Region
<b>vergl.</b>	vergleiche
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem

## 8.2 Literatur

1. Michael Streppel, M.W., Hasso von Wedel, Elisabeth Gaber, *Hörstörungen und Tinnitus*, I.-u.D. Gesundheitsdaten, Editor. 2006, Robert-Koch-Institut: Berlin. p. 1-44.
2. Ahmed, H.O., et al., *Occupational noise exposure and hearing loss of workers in two plants in eastern Saudi Arabia*. Ann Occup Hyg, 2001. **45**(5): p. 371-80.
3. Robinson, D.W. and G.J. Sutton, *Age effect in hearing - a comparative analysis of published threshold data*. Audiology, 1979. **18**(4): p. 320-34.
4. Suckfull, M., *Perspectives on the pathophysiology and treatment of sudden idiopathic sensorineural hearing loss*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(41): p. 669-75; quiz 676.
5. Fowler, K.B. and S.B. Boppana, *Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit*. J Clin Virol, 2006. **35**(2): p. 226-31.
6. Chaimoff, M., et al., *Sudden hearing loss as a presenting symptom of acoustic neuroma*. Am J Otolaryngol, 1999. **20**(3): p. 157-60.
7. Smith, R.J., et al., *Clinical diagnosis of the Usher syndromes*. Usher Syndrome Consortium. Am J Med Genet, 1994. **50**(1): p. 32-8.
8. Tassabehji, M., et al., *Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene*. Nature, 1992. **355**(6361): p. 635-6.
9. Liu, X.Z., V.E. Newton, and A.P. Read, *Waardenburg syndrome type II: phenotypic findings and diagnostic criteria*. Am J Med Genet, 1995. **55**(1): p. 95-100.
10. Coyle, B., et al., *Pendred syndrome (goitre and sensorineural hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene DFNB4*. Nat Genet, 1996. **12**(4): p. 421-3.
11. Ahmed, Z.M., et al., *Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1315-22.
12. Liu, X.Z., et al., *Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 268-9.
13. Kubisch, C., et al., *KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness*. Cell, 1999. **96**(3): p. 437-46.
14. Street, V.A., et al., *Mutations in a plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 390-4.
15. Liu, X.Z., et al., *Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(1): p. 63-7.
16. Vahava, O., et al., *Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans*. Science, 1998. **279**(5358): p. 1950-4.
17. Kikuchi, T., et al., *Gap junction systems in the rat vestibular labyrinth: immunohistochemical and ultrastructural analysis*. Acta Otolaryngol, 1994. **114**(5): p. 520-8.

18. Zelante, L., et al., *Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(9): p. 1605-9.
19. Jain, P.K., et al., *A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene*. Genomics, 1998. **50**(2): p. 290-2.
20. Verpy, E., et al., *A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 51-5.
21. Bueker, E.D., *Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system*. Anat Rec, 1948. **102**(3): p. 369-89.
22. Cohen, S., R. Levi-Montalcini, and V. Hamburger, *A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1954. **40**(10): p. 1014-8.
23. Lefebvre, P.P., et al., *Neuronotrophic effect of developing otic vesicle on cochleo-vestibular neurons: evidence for nerve growth factor involvement*. Brain Res, 1990. **507**(2): p. 254-60.
24. Lefebvre, P.P., et al., *Temporal pattern of nerve growth factor (NGF) binding in vivo and the in vitro effects of NGF on cultures of developing auditory and vestibular neurons*. Acta Otolaryngol, 1991. **111**(2): p. 304-11.
25. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J, 1982. **1**(5): p. 549-53.
26. Hohn, A., et al., *Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family*. Nature, 1990. **344**(6264): p. 339-41.
27. Hallbook, F., C.F. Ibanez, and H. Persson, *Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary*. Neuron, 1991. **6**(5): p. 845-58.
28. Berkemeier, L.R., et al., *Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB*. Neuron, 1991. **7**(5): p. 857-66.
29. Barth, E.M., S. Korsching, and H. Thoenen, *Regulation of nerve growth factor synthesis and release in organ cultures of rat iris*. J Cell Biol, 1984. **99**(3): p. 839-43.
30. Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, and Y.A. Barde, *Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor*. Neuron, 1990. **4**(4): p. 487-92.
31. Rodriguez-Tebar, A., et al., *Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor*. EMBO J, 1992. **11**(3): p. 917-22.
32. Siuciak, J.A., et al., *Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*. Pharmacol Biochem Behav, 1997. **56**(1): p. 131-7.
33. Lee, B.H. and Y.K. Kim, *The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment*. Psychiatry Investig, 2010. **7**(4): p. 231-5.
34. Kernie, S.G., D.J. Liebl, and L.F. Parada, *BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice*. EMBO J, 2000. **19**(6): p. 1290-300.

35. Phillips, H.S., et al., *BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease*. *Neuron*, 1991. **7**(5): p. 695-702.
36. Lee, A.H., et al., *Reduced brain-derived neurotrophic factor serum concentrations in acute schizophrenic patients increase during antipsychotic treatment*. *J Clin Psychopharmacol*, 2011. **31**(3): p. 334-6.
37. Masuda, M., et al., *Regulation of POU4F3 gene expression in hair cells by 5' DNA in mice*. *Neuroscience*, 2011. **197**: p. 48-64.
38. Malgrange, B., et al., *Effects of neurotrophins on early auditory neurones in cell culture*. *Neuroreport*, 1996. **7**(4): p. 913-7.
39. Hansen, M.R., et al., *Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in vitro*. *J Neurosci*, 2001. **21**(7): p. 2256-67.
40. Wu, D., *Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins*. *NeuroRx*, 2005. **2**(1): p. 120-8.
41. Labouyrie, E., et al., *Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(2): p. 405-15.
42. Griesbeck, O., et al., *Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function*. *J Neurosci Res*, 1995. **42**(1): p. 21-33.
43. Hallbook, F., et al., *Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina*. *J Comp Neurol*, 1996. **364**(4): p. 664-76.
44. Bianchi, L.M., et al., *Degeneration of vestibular neurons in late embryogenesis of both heterozygous and homozygous BDNF null mutant mice*. *Development*, 1996. **122**(6): p. 1965-73.
45. Ernfors, P., K.F. Lee, and R. Jaenisch, *Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits*. *Nature*, 1994. **368**(6467): p. 147-50.
46. Abremski, K., R. Hoess, and N. Sternberg, *Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination*. *Cell*, 1983. **32**(4): p. 1301-11.
47. Gordon, J., et al., *Specific expression of lacZ and cre recombinase in fetal thymic epithelial cells by multiplex gene targeting at the Foxn1 locus*. *BMC Dev Biol*, 2007. **7**: p. 69.
48. Gu, H., et al., *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. *Science*, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
49. Cox, B.C., et al., *Conditional Gene Expression in the Mouse Inner Ear Using Cre-loxP*. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*, 2012. **13**(3): p. 295-322.
50. Lakso, M., et al., *Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(14): p. 6232-6.



51. Kamachi, Y., M. Uchikawa, and H. Kondoh, *Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development*. Trends Genet, 2000. **16**(4): p. 182-7.
52. Erkman, L., et al., *Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 603-6.
53. Ninkina, N.N., et al., *A novel Brn3-like POU transcription factor expressed in subsets of rat sensory and spinal cord neurons*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(14): p. 3175-82.
54. Xiang, M., et al., *Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells*. Development, 1998. **125**(20): p. 3935-46.
55. Hu, X., et al., *Sonic hedgehog (SHH) promotes the differentiation of mouse cochlear neural progenitors via the Math1-Brn3.1 signaling pathway in vitro*. J Neurosci Res, 2010. **88**(5): p. 927-35.
56. Van Camp, G., Smith, Richard., *POU4F3*: [webpage] April 15 , 2018 [cited 2018 June 10]; Available from: <http://hereditaryhearingloss.org/main.aspx?c=HHH&n=87160>.
57. Delmaghani, S., et al., *Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy*. Nat Genet, 2006. **38**(7): p. 770-8.
58. Delmaghani, S., et al., *Hypervulnerability to Sound Exposure through Impaired Adaptive Proliferation of Peroxisomes*. Cell, 2015. **163**(4): p. 894-906.
59. Mardones, P. and C. Hetz, *Peroxisomes Get Loud: A Redox Antidote to Hearing Loss*. Cell, 2015. **163**(4): p. 790-1.
60. Varga, R., et al., *OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele*. J Med Genet, 2006. **43**(7): p. 576-81.
61. Roux, I., et al., *Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse*. Cell, 2006. **127**(2): p. 277-89.
62. Johnson, C.P. and E.R. Chapman, *Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion*. J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 187-97.
63. Jung, S., et al., *Disruption of adaptor protein 2mu (AP-2mu) in cochlear hair cells impairs vesicle reloading of synaptic release sites and hearing*. EMBO J, 2015. **34**(21): p. 2686-702.
64. Tian, G., et al., *Pathway leading to correctly folded beta-tubulin*. Cell, 1996. **86**(2): p. 287-96.
65. Schmalbruch, H., et al., *A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy*. J Neuropathol Exp Neurol, 1991. **50**(3): p. 192-204.
66. Volkenstein, S., et al., *Auditory development in progressive motor neuronopathy mouse mutants*. Neuroscience Letters, 2009.
67. Smith, F.L. and R.L. Davis, *Organ of Corti explants direct tonotopically graded morphology of spiral ganglion neurons in vitro*. J Comp Neurol, 2016. **524**(11): p. 2182-207.
68. Hahnewald, S., et al., *Spiral Ganglion Neuron Explant Culture and Electrophysiology on Multi Electrode Arrays*. J Vis Exp, 2016(116).

69. Hegarty, J.L., A.R. Kay, and S.H. Green, *Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and is additive with that by neurotrophins or cAMP and requires elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> within a set range*. J Neurosci, 1997. **17**(6): p. 1959-70.
70. Lv, P., D. Wei, and E.N. Yamoah, *Kv7-type channel currents in spiral ganglion neurons: involvement in sensorineural hearing loss*. J Biol Chem, 2010. **285**(45): p. 34699-707.
71. Akagi, K., et al., *Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(9): p. 1766-73.
72. Srinivas, S., et al., *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC Dev Biol, 2001. **1**: p. 4.
73. Volkenstein, S., et al., *Auditory development in progressive motor neuronopathy mouse mutants*. Neurosci Lett, 2009. **465**(1): p. 45-9.
74. Bommel, H., et al., *Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease*. J Cell Biol, 2002. **159**(4): p. 563-9.
75. Mlynski R, H.S., Rossoll W, Brors D, Aletsee C, Sendtner M, Ryan AF, Dazert S., *Transgenic Expression of Cre Recombinase from the Brn3.1 Locus.*, in *Twenty-Eighth Annual Midwinter Research Meeting Of The Association for Research in Otolaryngology*, P.D. Peter A. Santi, Editor. 2005, Association for Research in Otolaryngology: New Orleans, Louisiana, USA. p. 224.
76. Mhatre, A.N., et al., *Temporary reduction of distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) immediately following auditory brainstem response (ABR)*. Hearing Research, 2010. **269**(1-2): p. 180-5.
77. Sonntag, M., et al., *Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: an in vivo study in mice*. J Neurosci, 2009. **29**(30): p. 9510-20.
78. Willott, J.F., *Handbook of mouse auditory research : from behavior to molecular biology*. 2001, Boca Raton: CRC Press. 721 p.
79. Schafer, M.K., et al., *Sensory neuropathy in progressive motor neuronopathy (pmn) mice is associated with defects in microtubule polymerization and axonal transport*. Brain Pathol, 2017. **27**(4): p. 459-471.
80. Martin, N., et al., *A missense mutation in Tbce causes progressive motor neuronopathy in mice*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 443-7.
81. Palmiter, R.D. and R.L. Brinster, *Germ-line transformation of mice*. Annu Rev Genet, 1986. **20**: p. 465-99.
82. DeLoia, J.A. and D. Solter, *A transgene insertional mutation at an imprinted locus in the mouse genome*. Dev Suppl, 1990: p. 73-9.
83. Zheng, Q.Y., K.R. Johnson, and L.C. Erway, *Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses*. Hear Res, 1999. **130**(1-2): p. 94-107.

84. Theil, T., et al., *Mouse Brn-3 family of POU transcription factors: a new aminoterminal domain is crucial for the oncogenic activity of Brn-3a*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(25): p. 5921-9.
85. Wilkie, G.S., K.S. Dickson, and N.K. Gray, *Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(4): p. 182-8.
86. Szostak, E. and F. Gebauer, *Translational control by 3'-UTR-binding proteins*. *Brief Funct Genomics*, 2013. **12**(1): p. 58-65.
87. Li, M., et al., *Inner hair cell Cre-expressing transgenic mouse*. *Genesis*, 2004. **39**(3): p. 173-7.
88. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. *Nat Genet*, 1999. **21**(1): p. 70-1.
89. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki, *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*. *Gene*, 1991. **108**(2): p. 193-9.
90. Okabe, M., et al., *'Green mice' as a source of ubiquitous green cells*. *FEBS Lett*, 1997. **407**(3): p. 313-9.
91. Chen, C.M., et al., *A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23376.
92. Dobie, K.W., et al., *Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(13): p. 6659-64.
93. Feng, Y.Q., et al., *Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(1): p. 298-309.
94. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. *Genesis*, 2000. **26**(2): p. 99-109.
95. Schulz, T.J., et al., *Variable expression of Cre recombinase transgenes precludes reliable prediction of tissue-specific gene disruption by tail-biopsy genotyping*. *PLoS One*, 2007. **2**(10): p. e1013.
96. Parvari, R., et al., *Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome*. *Nat Genet*, 2002. **32**(3): p. 448-52.
97. Kumar, K.J., et al., *Hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism syndrome*. *Indian J Hum Genet*, 2013. **19**(3): p. 363-5.
98. Sato, T., et al., *Progressive hearing loss in mice carrying a mutation in the p75 gene*. *Brain Res*, 2006. **1091**(1): p. 224-34.
99. Oishi, N., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-mutant mice exhibit high frequency hearing loss*. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*, 2013. **14**(6): p. 801-11.
100. Qin, Z., M. Wood, and J.J. Rosowski, *Measurement of conductive hearing loss in mice*. *Hear Res*, 2010. **263**(1-2): p. 93-103.
101. Li, D., C.M. Henley, and B.W. O'Malley, Jr., *Distortion product otoacoustic emissions and outer hair cell defects in the *hyt/hyt* mutant mouse*. *Hear Res*, 1999. **138**(1-2): p. 65-72.

102. Brownell, W.E., *Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions*. Ear Hear, 1990. **11**(2): p. 82-92.
103. Kachar, B., et al., *Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells*. Nature, 1986. **322**(6077): p. 365-8.
104. Zheng, J., et al., *Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 149-55.
105. Belyantseva, I.A., et al., *Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. RC116.
106. Hampton, L.L., et al., *A new spontaneous mutation in the mouse Ames waltzer gene, Pcdh15*. Hear Res, 2003. **180**(1-2): p. 67-75.
107. Xiang, M., et al., *Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9445-50.
108. Johnson, K.R., et al., *The Mass1frings mutation underlies early onset hearing impairment in BUB/BnJ mice, a model for the auditory pathology of Usher syndrome IIC*. Genomics, 2005. **85**(5): p. 582-90.
109. Ohlemiller, K.K. and P.M. Gagnon, *Cellular correlates of progressive hearing loss in 129S6/SvEv mice*. J Comp Neurol, 2004. **469**(3): p. 377-90.
110. Ohlemiller, K.K., *Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury*. Hear Res, 2008. **245**(1-2): p. 5-17.
111. Taylor, R.R., G. Nevill, and A. Forge, *Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions*. Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO, 2008. **9**(1): p. 44-64.
112. Alam, S.A., et al., *Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea*. Hear Res, 2000. **141**(1-2): p. 28-38.
113. Op de Beeck, K., J. Schacht, and G. Van Camp, *Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell*. Hear Res, 2011. **281**(1-2): p. 18-27.
114. Van Laer, L., et al., *Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 194-7.
115. Van Laer, L., et al., *DFNA5: hearing impairment exon instead of hearing impairment gene?* J Med Genet, 2004. **41**(6): p. 401-6.
116. Ahmed, Z.M., et al., *Functional null mutations of MSRB3 encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFNB74*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(1): p. 19-29.
117. Schaefer, M.K., et al., *Progressive motor neuronopathy: a critical role of the tubulin chaperone TBCE in axonal tubulin routing from the Golgi apparatus*. J Neurosci, 2007. **27**(33): p. 8779-89.
118. Hyde, G.J. and A.R. Hardham, *Microtubules regulate the generation of polarity in zoospores of Phytophthora cinnamomi*. Eur J Cell Biol, 1993. **62**(1): p. 75-85.

119. Mitchison, T. and M. Kirschner, *Dynamic instability of microtubule growth*. Nature, 1984. **312**(5991): p. 237-42.
120. Slepecky, N.B. and M. Ulfendahl, *Actin-binding and microtubule-associated proteins in the organ of Corti*. Hear Res, 1992. **57**(2): p. 201-15.
121. Tannenbaum, J. and N.B. Slepecky, *Localization of microtubules containing posttranslationally modified tubulin in cochlear epithelial cells during development*. Cell Motil Cytoskeleton, 1997. **38**(2): p. 146-62.
122. Slepecky, N.B., C.G. Henderson, and S. Saha, *Post-translational modifications of tubulin suggest that dynamic microtubules are present in sensory cells and stable microtubules are present in supporting cells of the mammalian cochlea*. Hear Res, 1995. **91**(1-2): p. 136-47.
123. Tucker, J.B., et al., *A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea*. J Cell Sci, 1992. **102 ( Pt 2)**: p. 215-26.
124. Tucker, J.B., et al., *Formation of two microtubule-nucleating sites which perform differently during centrosomal reorganization in a mouse cochlear epithelial cell*. J Cell Sci, 1995. **108 ( Pt 4)**: p. 1333-45.
125. Hallworth, R. and R.F. Luduena, *Differential expression of beta tubulin isotypes in the adult gerbil cochlea*. Hear Res, 2000. **148**(1-2): p. 161-72.
126. Pierre, P., et al., *CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules*. Cell, 1992. **70**(6): p. 887-900.
127. Bartolini, F., et al., *Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 6): p. 1197-207.
128. Keller, C.E. and B.P. Lauring, *Possible regulation of microtubules through destabilization of tubulin*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 571-3.
129. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells*. Cell, 2004. **119**(5): p. 693-705.
130. Ray, J., et al., *Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3602-6.
131. Muller, H.W. and W. Seifert, *A neurotrophic factor (NTF) released from primary glial cultures supports survival and fiber outgrowth of cultured hippocampal neurons*. J Neurosci Res, 1982. **8**(2-3): p. 195-204.
132. Yue, G.G., et al., *Cyclopeptide RA-V inhibits angiogenesis by down-regulating ERK1/2 phosphorylation in HUVEC and HMEC-1 endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(7): p. 1883-98.
133. Heinecke, J.W., H. Rosen, and A. Chait, *Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture*. J Clin Invest, 1984. **74**(5): p. 1890-4.
134. Vieira, M., et al., *Survival and stimulation of neurite outgrowth in a serum-free culture of spiral ganglion neurons from adult mice*. Hear Res, 2007. **230**(1-2): p. 17-23.

135. Berkingali, N., et al., *Neurite outgrowth on cultured spiral ganglion neurons induced by erythropoietin*. *Hear Res*, 2008. **243**(1-2): p. 121-6.
136. Gillespie, L.N., et al., *LIF is more potent than BDNF in promoting neurite outgrowth of mammalian auditory neurons in vitro*. *Neuroreport*, 2001. **12**(2): p. 275-9.
137. Whitlon, D.S., et al., *Survival and morphology of auditory neurons in dissociated cultures of newborn mouse spiral ganglion*. *Neuroscience*, 2006. **138**(2): p. 653-62.
138. Needham, K., et al., *Combined application of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 and its impact on spiral ganglion neuron firing properties and hyperpolarization-activated currents*. *Hear Res*, 2012. **291**(1-2): p. 1-14.
139. Liu, W., M. Bostrom, and H. Rask-Andersen, *Expression of peripherin in the pig spiral ganglion--aspects of nerve injury and regeneration*. *Acta Otolaryngol*, 2009. **129**(6): p. 608-14.
140. Marzella, P.L., et al., *LIF potentiates the NT-3-mediated survival of spiral ganglia neurones in vitro*. *Neuroreport*, 1997. **8**(7): p. 1641-4.
141. ThermoFisher Scientific. *NEUROBASAL™ Medium (1X) liquid*. Technical Resources 2018 [cited 2018 June 10]; Available from: <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/technical-resources/media-formulation.251.html>.
142. ThermoFisher Scientific. *52100 - DMEM, powder, high glucose*. Technical Resources 2018 [cited 2018 June 10]; Available from: <http://www.thermofisher.com/nl/en/home/technical-resources/media-formulation.186.html>.
143. Zielke, H.R., C.L. Zielke, and P.T. Ozand, *Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells*. *Fed Proc*, 1984. **43**(1): p. 121-5.
144. Barbehenn, E.K., et al., *An examination of the efficiency of glucose and glutamine as energy sources for cultured chick pigment epithelial cells*. *J Cell Physiol*, 1984. **118**(3): p. 262-6.
145. Bak, L.K., A. Schousboe, and H.S. Waagepetersen, *The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer*. *J Neurochem*, 2006. **98**(3): p. 641-53.
146. Eagle, H., *Amino acid metabolism in mammalian cell cultures*. *Science*, 1959. **130**(3373): p. 432-7.
147. Domogatskaya, A., S. Rodin, and K. Tryggvason, *Functional diversity of laminins*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012. **28**: p. 523-53.
148. Lander, A.D., D.K. Fujii, and L.F. Reichardt, *Purification of a factor that promotes neurite outgrowth: isolation of laminin and associated molecules*. *J Cell Biol*, 1985. **101**(3): p. 898-913.
149. Manthorpe, M., et al., *Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons*. *J Cell Biol*, 1983. **97**(6): p. 1882-90.
150. Colognato, H., et al., *The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(46): p. 29330-6.

151. Weston, C.A., et al., *Laminin-1 activates Cdc42 in the mechanism of laminin-1-mediated neurite outgrowth*. Exp Cell Res, 2000. **260**(2): p. 374-8.
152. Dragunow, M., et al., *c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **83**(1-2): p. 20-33.
153. Rialas, C.M., et al., *Nitric oxide mediates laminin-induced neurite outgrowth in PC12 cells*. Exp Cell Res, 2000. **260**(2): p. 268-76.
154. Ruegg, U.T. and F. Hefti, *Growth of dissociated neurons in culture dishes coated with synthetic polymeric amines*. Neurosci Lett, 1984. **49**(3): p. 319-24.
155. Hawrot, E., *Cultured sympathetic neurons: effects of cell-derived and synthetic substrata on survival and development*. Dev Biol, 1980. **74**(1): p. 136-51.
156. Woerly, S., et al., *Synthetic polymer derivatives as substrata for neuronal adhesion and growth*. Brain Res Bull, 1993. **30**(3-4): p. 423-32.
157. Pirvola, U., et al., *Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9915-9.
158. Wheeler, E.F., et al., *Expression of BDNF and NT-3 mRNA in hair cells of the organ of Corti: quantitative analysis in developing rats*. Hear Res, 1994. **73**(1): p. 46-56.
159. Fritsch, B., I. Farinas, and L.F. Reichardt, *Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion*. J Neurosci, 1997. **17**(16): p. 6213-25.
160. Arumae, U., et al., *Neurotrophins and their receptors in rat peripheral trigeminal system during maxillary nerve growth*. J Cell Biol, 1993. **122**(5): p. 1053-65.
161. Mou, K., et al., *Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons*. J Comp Neurol, 1997. **386**(4): p. 529-39.
162. Avila, M.A., et al., *Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 support the survival and neuritogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons*. Dev Biol, 1993. **159**(1): p. 266-75.
163. Miller, J.M., et al., *Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss*. Int J Dev Neurosci, 1997. **15**(4-5): p. 631-43.
164. Tomida, M., Y. Yamamoto-Yamaguchi, and M. Hozumi, *Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells*. J Biol Chem, 1984. **259**(17): p. 10978-82.
165. Murphy, M., et al., *Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3498-501.
166. Murphy, M., et al., *Involvement of leukemia inhibitory factor and nerve growth factor in the development of dorsal root ganglion neurons*. Development, 1993. **117**(3): p. 1173-82.
167. Ip, N.Y. and G.D. Yancopoulos, *The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 491-515.

168. Hartnick, C.J., et al., *Neurotrophic effects of BDNF and CNTF, alone and in combination, on postnatal day 5 rat acoustic ganglion neurons*. J Neurobiol, 1996. **30**(2): p. 246-54.
169. Lefebvre, P.P., et al., *Neurotrophins affect survival and neuritogenesis by adult injured auditory neurons in vitro*. Neuroreport, 1994. **5**(8): p. 865-8.
170. Staecker, H., et al., *NT-3 combined with CNTF promotes survival of neurons in modiolus-spiral ganglion explants*. Neuroreport, 1995. **6**(11): p. 1533-7.
171. Barclay, M., A.F. Ryan, and G.D. Housley, *Type I vs type II spiral ganglion neurons exhibit differential survival and neuritogenesis during cochlear development*. Neural Dev, 2011. **6**: p. 33.
172. Bishop, J.F., et al., *A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia*. Blood, 1996. **87**(5): p. 1710-7.
173. Parson, S.H., J.F. Price, and R.R. Ribchester, *Cell viability and laminin-induced neurite outgrowth in cultures of embryonic chick neural tube cells: effects of cytosine-B-D-arabinofuranoside*. Neurodegeneration, 1995. **4**(1): p. 99-106.
174. Schwieger, J., et al., *Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: Effects of AraC on cell composition and neurons*. J Neurosci Methods, 2016. **268**: p. 106-16.
175. Peddi, P.F., et al., *Central nervous system toxicities of chemotherapeutic agents*. Expert Rev Anticancer Ther, 2014. **14**(7): p. 857-63.
176. Baker, W.J., G.L. Royer, Jr., and R.B. Weiss, *Cytarabine and neurologic toxicity*. J Clin Oncol, 1991. **9**(4): p. 679-93.
177. Lowenberg, B., et al., *Cytarabine dose for acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 1027-36.
178. Fischbach, G.D., *Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures*. Dev Biol, 1972. **28**(2): p. 407-29.



### 8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Generierung und Evaluation von Mausmodellen für die auditorische Neuropathie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 25.08.2018  
Ort, Datum

Unterschrift

#### **Affidavit**

I hereby confirm that my thesis entitled “Generation and evaluation of mouse models of auditory neuropathy” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, August 25<sup>th</sup> 2018  
Place, Date

Signature

## 8.4 Publikationsliste

Dynamic changes of the neurogenic potential in the rat cochlear nucleus during post-natal development

Rak K, Völker J, **Frenz S**, Scherzed A, Radeloff A, Hagen R, Mlynski R  
Experimental Brain Research 2013 May, 226(3):393-406, Epub 2013 Mar 2

Mutation of the TBCE gene causes disturbance of microtubules in the auditory nerve and cochlear outer hair cell degeneration accompanied by progressive hearing loss in the pmn/pmn mouse

Rak K, **Frenz S**, Radeloff A, Groh J, Jablonka S, Martini R, Hagen R, Mlynski R  
Experimental Neurology 2013 Dec, 250:333-40, Epub 2013 Oct 10

Effects of the neurotrophic factors BDNF, NT-3 and FGF2 on dissociated neurons of the cochlear nucleus

Rak K, Völker J, **Frenz S**, Scherzed A, Schendzielorz P, Radeloff A, Jablonka S, Hagen R, Mlynski R  
NeuroReport 2014 August, 25(12):960–964

Mosaic pattern of Cre recombinase expression in cochlear outer hair cells of the Brn3.1 IRES Cre mouse

**Frenz S**, Rak K, Völker J, Radeloff A, Jablonka S, Hansen S, Hagen R, Mlynski R  
NeuroReport. 2015 Apr 15, 26(6):309-13

Cochlear nucleus whole mount explants promote the differentiation of neuronal stem cells from the cochlear nucleus in co-culture experiments

Rak K, Völker J, Jürgens L, Völker C, **Frenz S**, Scherzed A, Schendzielorz P, Jablonka S, Mlynski R, Radeloff A, Hagen R,  
Brain Res. 2015 Aug 7, 1616:58-70

CAR T cells targeting  $\alpha\beta 3$  integrin are effective against advanced cancer in preclinical models

Wallstabe L, Madas A, **Frenz S**, Einsele H, Rader C, Hudecek M  
Advances in Cell and Gene Therapy, published online: 10 July 2018,  
[doi.org/10.1002/acg2.11](https://doi.org/10.1002/acg2.11)

## 8.5 Lebenslauf

## 8.6 Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Hagen für seine fortwährende Unterstützung meiner Forschungstätigkeit. Ohne seine Hilfe und Betreuung wäre meine Promotion nicht möglich gewesen.

Ebenso geht ein herzlicher Dank an Herr Prof. Dr. Georg Nagel und an Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sybille Jablonka für die Betreuung meiner Promotion mit Rat und Tat.

Besonders möchte ich Priv.-Doz. Dr. med. Kristen Rak danken, ohne dessen kontinuierliche Ermunterung, Anfeuerung und Ratschlag diese Arbeit noch immer selig auf einer Festplatte schlummern würde.

Ich danke den Mitgliedern der (ehemaligen) AG Innenohrbiologie Prof. Dr. med. Robert Mlynski, Dr. med. Johannes Völker, Petra Joa und Laura Halbhuber, für deren Hilfe und Ratschläge in allen Forschungsfragen.

Für Hilfe und Wissen bei ABR und DPOAE Fragen danke ich Dr. med. Sara Euteneuer, Prof. Dr. med. Maike Vollmer, Dr. rer. nat. Armin Wiegner und Martin Kempe, sowie bei Fragen zur Brn3.1 IRES Cre Maus Prof. Dr. Michael Sendtner und PD Dr. med. Stefan Hansen.

Ein Dank an alle nicht namentlich genannten Mitglieder der HNO Forschungslabore für die tolle Zeit, die ich mit euch verbringen durfte.

Danke an Dr. med. Michael Hudecek für das Entgegenkommen zur Fertigstellung dieser Arbeit.

An meine Korrekturleserinnen Elke und Marion ein herzliches „Danke“, dass ihr euch bereit erklärt habt, mit dem Rotstift über meine Thomas-Mann-Sätze zu gehen.

Danke jedem Freund, der nicht müde wurde nachzufragen, ob ich schon fertig sei. Ich habe jedes Mal die Augen verdreht, aber dank euch kann ich endlich sagen: Ja, bin ich.

Danke an jeden Freund, der nicht gefragt hat, sondern einfach da war.

Und zum Schluss natürlich meinen Eltern (und dem Hund) fürs Aushalten, Unterstützen, Ablenken und Nerven.

*"The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them."*

*-Sir William Bragg, Winner of 1915 Nobel Prize in Physics*

*(1862-1942)*