

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und
ästhetische Operationen**

der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen

**Analyse des modulierenden Effekts von pegyliertem IGF-1 (pegIGF-1) auf die
Hörfunktion von pmn-Mäusen**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Johannes Skornicka
aus Miltenberg**

Würzburg, August 2022



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Mitglied 1: Priv. Doz. Dr. med. Kristen Rak

Mitglied 2: Univ. Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen

Mitglied 3: Priv. Doz. Dr. rer. Nat. Sibylle Jablonka

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Anatomie des Innenohrs.....	1
1.3 Physiologie des Hörens.....	2
1.4 Die Hörbahn	4
1.4.1 Afferenter Teil.....	4
1.4.2 Efferenter Teil.....	5
1.5 Aufbau und Physiologie von Synapsen.....	6
1.6 Aufbau und Funktion der Mikrotubuli.....	8
1.7 Mausmodell der progressiven Motoneuronopathie (pmn).....	9
1.8 Pegylierter insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1	12
1.9 Zielsetzung	13
2. Material	15
2.1 Technische Geräte	15
2.2 Labormaterialien	15
2.3 Narkotika.....	16
2.4 Chemikalien.....	16
2.5 Lösungen	17
2.6 Primer.....	18
2.7 Enzyme	18
2.8 Wachstumsfaktor	18
2.9 Antikörper.....	18
2.9.1 Primärantikörper	18
2.9.2 Sekundärantikörper	19
2.10 .Tierstamm.....	19
2.11 .Software.....	19
3. Methoden.....	20
3.1 Mauslinie NMRI-TBCE ^{pmn}	20
3.2 Genotypisierung.....	20
3.2.1 DNA-Extraktion	20
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und Gelelektrophorese	20
3.3 Narkose und Haltung	21
3.4 Elektrophysiologie.....	21
3.4.1 DPOAE.....	21
3.4.2 BERA.....	22

3.5 Perfixionsfixierung	22
3.6 Einbettung und Anfertigung von Kryoschnitten	22
3.7 Immunzytochemische Färbung von Kryoschnitten	23
3.8 Präparation und immunzytochemische Färbung von Wholemoutpräparaten des Corti'schen Organs	23
3.9 Mikroskopie.....	24
3.10 Auswertung und Statistik	24
4. Ergebnisse.....	26
4.1 Analyse der Funktionalität und Anzahl der ÄHZ	26
4.1.1 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels Schwellenbestimmung der DPOAE	26
4.1.1.1 Alter P21.....	26
4.1.1.2 Alter P28.....	27
4.1.2 Evaluation der Anzahl der ÄHZ mittels immunhistochemischer Färbung von Wholemoutpräparaten	29
4.2 Analyse der afferenten Hörbahn	30
4.2.1 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels Click- BERA	30
4.2.1.1 Hörschwelle	30
4.2.1.2 Evaluation der Latenz von Welle 2.....	32
4.2.1.3 Evaluation der Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2.....	34
4.2.1.4 Evaluation der Amplitude von Welle 1	36
4.2.1.5 Evaluation der Amplitude von Welle 2.....	38
4.2.2 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels BERA zwischen 4 und 24 kHz.....	40
4.2.2.1 Hörschwellen	40
4.2.2.1.1 Alter P21	40
4.2.2.1.2 Alter P28	41
4.2.2.2 Evaluation der Latenz von Welle 2.....	43
4.2.2.3 Evaluation der Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2.....	45
4.2.2.4 Evaluation der Amplitude von Welle 1	47
4.2.2.5 Evaluation der Amplitude von Welle 2.....	49
4.2.3 Analyse β -III-positiver Spiralganglienfasern und cholinergere Synapsen mittels immunhistochemischer Färbung von Wholemoutpräparaten.....	51
4.2.3.1 Quantitative Analyse β -III-positiver Spiralganglienfasern.....	51
4.2.3.2 Analyse des mittleren Graustufenwerts cholinergere Synapsen.....	52
4.2.3.3 Analyse der Fläche cholinergere Synapsen.....	54

4.2.4	Floureszenzmikroskopische Wholemout-Aufnahmen als Grundlage zur Evaluation von ÄHZ, β -III-positiven Spiralganglienfasern und cholinergen Synapsen.....	56
5.	Diskussion	60
5.1	DPOAEs und ÄHZ.....	60
5.2	Analyse der afferenten Hörbahn mittels Click-BERA.....	61
5.3	Analyse der afferenten Hörbahn mittels BERA zwischen 4 und 24 kHz.....	63
5.4	Analyse β -III-positiver Spiralganglienfasern und cholinерger Synapsen mittels immunhistochemischer Färbung von Wholemoutpräparaten	64
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	65
I.	Literaturverzeichnis	66
II.	Abbildungsverzeichnis.....	73
III.	Tabellenverzeichnis	75
IV.	Danksagung.....	76
V.	Curriculum Vitae	77

Abkürzungen

Abb Abbildung

AC auditiver Cortex

Ach Acetylcholin

ÄHZ äußere Haarzelle

ALS amyotrophe Lateralsklerose

AP Aktionspotential

ÄSZ äußere Säulenzelle

BERA brainstem-evoked response audiometry

CGM Corpus geniculatum mediale

CI Colliculi inferiores

DA Dopamin

DPOAE Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen

DZ Deiterszelle

EZR Extrazellulärraum

GABA γ -Aminobuttersäure

Glu Glutamat

GSC Ganglion spirale cochleae

IHZ innere Haarzelle

ISZ innere Säulenzelle

LOC lateral olivocochleär

MAP Mikrotubuli-assoziierte Proteine

MOC medial olivocochleär

MT Mikrotubuli

NC Nucleus cochlearis

NOS Nucleus olivaris superior

NT Neurotransmitter

P (n) n. Tag postnatal

pegIGF-1 mit Polyethylenglykol gekoppelter insulinähnlicher Wachstumsfaktor

pmn progressive Motoneuronopathie

SPL sound pressure level

TBCE Tubulin-spezifisches Chaperon E

wt Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Einführung

Schwerhörigkeit und Tinnitus gehören zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten in Deutschland. Während eines Lebens sind 60 % der Bevölkerung temporär oder dauerhaft davon betroffen (Streppel, Walger et al. 2006). Hörbeeinträchtigungen können klassisch in zwei Kategorien unterteilt werden. Schallleitungsschwerhörigkeiten gründen auf Anomalien des äußeren Ohrs und des Mittelohrs, während Schallempfindungsstörungen ihre Ursache im Bereich der Hörbahn zwischen Cochlea und auditivem Cortex (AC) haben. Erstere lassen sich meist gut medikamentös oder durch einen chirurgischen Eingriff behandeln. Bei Problemen der Schallempfindung stellen Prothesen, wie Hörgeräte und Cochlea Implantate eine Behandlungsmöglichkeit dar, eine ursächliche Therapie gibt es jedoch noch nicht.

1.2 Anatomie des Innenohrs

Das Innenohr befindet sich im Felsenbein und wird in ein knöchernes und membranöses Labyrinth aufgeteilt. Das Knöcherne ist eine Hohlraumstruktur und bildet die äußeren Anteile der drei Bogengänge, des Vestibulums und der Cochlea. Es ist mit Perilymphe gefüllt, die Serumfiltrat entspricht, und kommuniziert über das runde und ovale Fenster mit dem Mittelohr und über den Aquaeductus cochleae mit dem Subarachnoidalraum. In der Cochlea bildet es die Scala tympani und vestibuli, die über das Helicotrema an der apikalen Spitze der Cochlea miteinander in Verbindung stehen. In dem knöchernen Labyrinth eingebettet befindet sich das membranöse Labyrinth, das Endolymphe enthält und über den Aquaeductus vestibularis mit dem Sacculus endolymphaticus in Verbindung steht, wo die Endolymphe resorbiert wird. Hier finden sich unter anderem die beiden Otolithenorgane Sacculus und Utriculus, die zusammen mit den Bogengängen das Gleichgewichtsorgan darstellen. Während Sacculus und Utriculus für die Erfassung linearer Beschleunigungen verantwortlich sind, ist es die Aufgabe der Bogengänge Drehbeschleunigungen zu detektieren. Das Hörorgan besteht aus den bereits genannten knöchernen Anteilen der Cochlea und dem membranösen Ductus cochlearis, auch Scala media genannt. Zusammen winden sie sich $2\frac{1}{2}$ -mal um eine knöcherne Achse, dem Modiolus. Betrachtet man die Cochlea im Querschnitt, wird die Scala media nach apikal durch die Reissner-Membran von der Scala vestibuli und in basaler Richtung durch die Basilarmembran von der Scala tympani begrenzt. An der lateralen Wand der Scala media befindet sich die Stria vascularis, die Kapillare enthält und für die Produktion der Endolymphe zuständig ist (Schünke, Schulte et al. 2006). Sie sezerniert aktiv K^+ -Ionen und stellt so ein positives endocochleäres Potential von +85 mV zwischen Endo- und Perilymphe her.

Vergleicht man das Potential der Haarzellen mit dem der Endolymphe, ergibt sich sogar eine Differenz von 140 bzw. 155 mV (Gekle, Wischmeyer et al. 2010).

Das Corti Organ besteht aus folgenden Zellen. Medial, also dem Modiolus am nächsten, befindet sich die Reihe der inneren Haarzellen (IHZ). Darauf folgen in peripherer Richtung jeweils eine Reihe von Stützzellen, den inneren und äußeren Säulenzellen (ISZ & ÄSZ), worauf sich drei Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ) anschließen. Dabei ragen die ÄSZ zwischen die innerste Anreihung der ÄHZ. Deiterszellen (DZ) stützen die ÄHZ zwischen der zweiten und dritten Reihe. Am Apex beider Haarzellen befinden sich Stereozilien, bestehend aus Aktinfilamenten (Jensen-Smith, Eley et al. 2003). Zusätzlich sind hier in den ersten postnatalen Tagen Kinozilien, aufgebaut aus Mikrotubuli, zu finden, die jedoch bis P20 verkümmern (Jensen-Smith, Eley et al. 2003). Die Stereozilien sind in Bündeln von 50 bis 100 Exemplaren angeordnet und weisen innerhalb dieses Bündels in lateraler Richtung eine zunehmende Länge auf. Durch die untereinander gut vernetzten Aktinfilamente und die Einbettung in die Kutikularplatte sind die einzelnen Stereozilien kaum beweglich und jeweils mit wenigen Nachbarn über Proteine verbunden. Die funktionell bedeutendsten Verbindungen sind die sog. Tip-Links, die die Spitze eines Stereoziliums mit dem Nächstgrößeren verknüpfen. Am Apex der Haarzellen sind diese über tight junctions mit den umgebenden Stützzellen verbunden und bilden zusammen die Retikularmembran, die eine Diffusionsbarriere für die Endolymphe darstellt. Die Haarzellen sind also nur am apikalen Pol von Endolymphe umgeben (Gekle, Wischmeyer et al. 2010). Zwischen den beiden Säulenzellen befindet sich ein Hohlraum, der sog. Corti-Tunnel. Das komplette Corti-Organ wird von einer azellulären Gallertschicht, der Membrana tectoria, bedeckt, die über die längsten Stereozilien der ÄHZ mit diesen verbunden ist (Schünke, Schulte et al. 2006).

1.3 Physiologie des Hörens

Schall dringt über den äußeren Gehörgang in das Ohr ein und versetzt das Trommelfell in Schwingung. Über die Gehörknöchelchenkette (Malleus, Incus und Stapes) werden die Schwingungen im Mittelohr übertragen und kommen schließlich am ovalen Fenster an. Dort kommt es zu einer Druckwelle in der Perilymphe der Scala vestibuli, die über die elastischen Membranen die Scalae media und tympani und schließlich das runde Fenster erreicht. Die Basilarmembran ist die einzige Struktur, durch die es zu einer nennenswerten Absorption von Schallenergie kommt. Die Basilarmembran verändert auf ihrem Weg nach apikal ihre Struktur. Während sie basal relativ schmal und steif erscheint, wird sie in apikaler Richtung immer breiter und flexibler. Dies führt dazu, dass die Welle an der Basis kaum Energie verliert und nach apikal wandert (Wanderwelle). Die Amplitude nimmt zu, erreicht ein Maximum und flacht

relativ schnell wieder ab. Wo das Maximum entsteht, ist abhängig von der Frequenz des eingegangenen Tons. Hohe Frequenzen provozieren es eher an der Basis der Cochlea, Tiefe an der Spitze. Dieses Phänomen, dass jede Stelle auf der Basilarmembran einer einzelnen Frequenz zugeordnet werden kann, wird als Tonotopie bezeichnet.

Die ÄHZ sind basal mit der Basalmembran und apikal mit der Tektorialmembran verbunden. Bei Eingang eines Schallereignisses bewegen sich beide Membranen und es kommt zu einem Biegen der verbundenen Stereozilien. Daraus folgt ein Flüssigkeitsstrom zwischen Retikular- und Tektorialmembran, der schließlich auch die Stereozilien der IHZ auslenkt. Infolgedessen entsteht mechanische Spannung auf die Tip-Links, wodurch benachbarte nicht-selektive Kationenkanäle, sog. Transduktionskanäle, ohne Verzögerung geöffnet werden. Durch das endocochleäre Potential strömen K^+ -Ionen vom Konzentrationsgradienten getrieben in die Haarzellen und lösen eine Depolarisation aus. Durch die Depolarisation entsteht ein Rezeptorpotential, welches an der Basis der IHZ spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle öffnet, die wiederum den Transmitter Glutamat (Glu) an der Synapse freisetzen und so die auditorischen Neurone aktivieren. Die K^+ -Ionen verlassen die Haarzellen an ihrer Basis durch einen passiven Kanal. In den ÄHZ, die kaum von afferenten Fasern innerviert werden, hat die Depolarisation einen anderen Effekt. Sie kontrahieren durch die Depolarisation und strecken sich bei Hyperpolarisation. Dadurch verstärken sie die Schwingungen der Basilarmembran und machen es den IHZ überhaupt erst möglich bei Schalldruckpegeln (SPL) unter 50 dB etwas wahrzunehmen. ÄHZ werden deswegen als cochleärer Verstärker bezeichnet. Zusätzlich schärfen sie die Bewegung der Basilarmembran und tragen zu einer präziseren Auftrennung der Frequenzen bei. Ab einem SPL über 80 dB sind die ÄHZ nicht mehr am Hörvorgang beteiligt. Möglich gemacht werden die Kontraktionen der ÄHZ durch das Motorprotein Prestin, das sich in hoher Dichte in deren lateraler Wand befindet (Gekle, Wischmeyer et al. 2010). Die Motilität erzeugt sog. otoakustische Emissionen, die mit einem empfindlichen Mikrophon im äußeren Gehörgang gemessen werden können. So kann objektiv und nichtinvasiv die Funktionsfähigkeit der ÄHZ überprüft werden.

1.4 Die Hörbahn

1.4.1 Afferenter Teil

Unter dem Begriff der zentralen Hörbahn versteht man speziell-somatosensible Fasern, die vom Corti-Organ ausgehend bis zur primären und sekundären Hörrinde in Area 41 und 42 des Temporallappens ziehen. Die sensorischen Neuronen liegen im Ganglion spirale cochleae (GSC) und sind bipolare Neuronen, deren Fortsätze nach zentral zu den Nuclei cochleares (NC) in der Medulla oblongata ziehen. Dort wird zwischen einem direkten und indirekten Teil der Hörbahn differenziert. Der direkte Anteil läuft vom Nucleus cochlearis posterior ohne eine Verschaltung im Nucleus olivaris superior (NOS) über den Lemniscus lateralis der kontralateralen Seite zum Colliculus inferior (CI). Der indirekte Teil verläuft vom Nucleus cochlearis anterior als Corpus trapezoideum, in das die Nuclei olivares superiores und der Nucleus corporis trapezoidei eingeschaltet sind, ebenfalls auf die Gegenseite und dort als LL zum CI. Von hier verlaufen die Nervenfasern über das Brachium colliculi inferioris zum Corpus geniculatum mediale (CGM), weiter zum primären und letztendlich zum sekundären AC (Musiek 1986, Musiek and Baran 1986). Im Folgenden wird etwas genauer auf die verschiedenen Verschaltungsstationen eingegangen.

Der Nervus cochlearis beinhaltet sowohl afferente (GSC) als auch efferente Neuronen. Typ I GSC Neuronen sind bipolar und groß, innervieren ausschließlich die IHz und machen 95 % der gesamten Afferenz aus. Die restlichen 5 % sind pseudomonopolare Typ II Spiralganglien, dessen Ziel einzig die ÄHz darstellen. Die Zellkörper der afferenten Neuronen befinden sich intracochleär und bilden den sogenannten Rosenthalkanal (Ota and Kimura 1980).

Der NCA beinhaltet den Großteil der Afferenz und ist tonotopisch aufgebaut. Während der ventrale Anteil Signale vom apikalen Teil der Cochlea erhält und auf niedrige Frequenzen spezialisiert ist, wird der dorsale Anteil von Fasern aus der basalen Cochlea erreicht und verarbeitet hohe Frequenzen. (Bourk, Mielcarz et al. 1981). Die NCs stellen den Startpunkt des zentralen Nervensystems für die Verarbeitung von akustischen Informationen dar und dienen der ersten Umschaltung der Hörbahn.

Im NOS werden zum ersten Mal Laufzeit- und Intensitätsunterschiede zwischen beiden Ohren berechnet. Während die Zeitdifferenz im medialen Anteil detektiert wird, misst der Laterale die Unterschiede in der Schallstärke. Durch dieses binaurale Hören wird nicht nur der Ort der Schallquelle lokalisiert, sondern es kommt auch zu einer Ausblendung verrauschter Signale. Dadurch kann, bei intaktem Gehör, Sprache auch in einer lauten Umgebung gut verstanden werden (Bazwinsky, Hilbig et al. 2003).

Der LL besteht aus Nervenfasern des NC, des NOS und aus den Kernen des LL selbst. Die drei Kerne liegen hintereinander und werden aufgrund ihrer Lage als LL ventralis, intermedius

und dorsalis bezeichnet (Cho, Fischer et al. 2005). Funktionell ist wenig über den LL bekannt, man vermutet eine Rolle des ventralen Kerns bei der Kodierung zeitlicher Merkmale von auditiven Reizen und der Wahrnehmung von Sprache. Im dorsalen LL werden interaurale Unterschiede spezifiziert (Hernandez-Zamora and Poblano 2014). Ausgehend vom dorsalen Kern bahnen sich die Neuronen ihren Weg hauptsächlich weiter zu den CI, aber auch zu den Colliculi superiores, mediales und der dorsalen Teilung des CGM.

Die CI bilden sich hauptsächlich aus Fasern des LL und des NOS, aber auch Fasern der NCs dringen direkt bis zu dieser Verschaltungsstelle im Mittelhirn vor. Neurone aus dem NOS und den NCs enden jedoch spätestens hier. Die CI stellen eine Art Sammelstation der Afferenz dar und leiten diese geordnet weiter, wodurch die Verarbeitung des Gehörten im Hirnstamm vereinfacht wird. Sie bestehen aus einem großen zentralen Kern, der wiederum in einen dorsomedialen und einen ventrolateralen Anteil untergliedert ist, und einem perizentralen Kern (Braun 1999).

Der CGM besteht aus einem ventralen, medialen und dorsalen Kern. Alle erhalten Afferenzen aus den CI und dem LL, der mediale jedoch zusätzlich u.A. aus dem Lemniscus medialis und somit visuelle Informationen. Der ventrale Kern, der eine klare Tonotopie aufweist, projiziert vorwiegend in den primären AC, die beiden anderen in angrenzende kortikale Bereiche (Winer 1984).

Der AC ist im Gyrus temporalis superior lokalisiert und ist in einen primären und sekundären AC unterteilt, sowie verschiedene Assoziationsbereiche. Dazu gehören der anteriore, posteriore und ventroposteriore Bereich sowie der posteriore ectosylvianische Cortex. Neuronen im rostralen Bereich des primären AC reagieren auf hohe Frequenzen, tiefe werden von dem kaudalen Anteil detektiert (Liem, Zaehle et al. 2012).

1.4.2 Efferenter Teil

Der efferente Weg kann in mediale (MOC) und laterale olivocochleäre (LOC) Efferenzen unterteilt werden (Brown 1987). Dem lateralen NOS entspringende feine, nicht myelinisierte Efferenzen innervieren hauptsächlich die ipsilateralen IHZ, während dicke myelinisierte Fasern aus dem medialen NOS die ÄHZ der Gegenseite erreichen (Maison, Adams et al. 2003). Dort findet die synaptische Übertragung hauptsächlich mit Hilfe des Neurotransmitters (NT) Acetylcholin (ACh) statt (Eybalin 1993). Es wird angenommen, dass eine Funktion des lateralen Systems darin besteht die Outputs beider Ohren aufeinander abzustimmen, um das Richtungshören möglich zu machen (Darrow, Maison et al. 2006, Guinan 2006). Der mediale Anteil reduziert die Schallempfindlichkeit, indem die Verstärkungsfunktion der ÄHZ (Guinan

2006) und somit die Auslenkung der Basalmembran verringert werden (Cooper and Guinan 2006).

1.5 Aufbau und Physiologie von Synapsen

Sensorische Systeme, wie das Gehör, sind darauf ausgelegt peripher einen Reiz zu erfassen und diesen nach zentral weiterzuleiten, damit dieser vom Individuum wahrgenommen wird. Um dies zu ermöglichen, gibt es zwischen Neuronen Kontaktstrukturen, an denen das Signal von der einen zur nächsten Nervenzelle weitergeleitet wird. An diesen sogenannten Synapsen kann dies durch elektrische und chemische Prozesse geschehen.

Bei der rein elektrischen Variante geschieht dies hauptsächlich durch unterschiedliche Konzentration von Na^+ und K^+ innerhalb und außerhalb der Neuronen. Während in der Nervenzelle eine höhere Konzentration von K^+ vorherrscht, ist der Extrazellulärraum (EZR) reicher an Na^+ . Die Zelle ist im Ruhezustand negativer geladen als der EZR, was als Ruhepotential bezeichnet wird und bei ca. -70 mV liegt. Erreicht ein Reiz das Neuron und schafft es die Spannung auf oder über die Höhe des Schwellenpotentials anzuheben, werden spannungsabhängige Na^+ -Kanäle geöffnet, Na^+ strömt aufgrund der hohen Konzentrationsdifferenz schlagartig aus dem EZR in die Zelle und es kommt zu einer Depolarisation. Dabei verändert sich das Potential auf $+30 \text{ mV}$. Die Na^+ -Kanäle werden sofort wieder geschlossen und spannungsabhängige K^+ -Kanäle geöffnet. K^+ strömt aus der Zelle in den EZR und kehrt die Ladung des Potentials wieder um (Repolarisation). K^+ -Kanäle schließen deutlich langsamer als Na^+ -Kanäle, weswegen das Membranpotential kurzzeitig unter das Ruhepotential sinkt (Hyperpolarisation). Der gesamte Vorgang dauert ca. 2 ms und wird als Aktionspotential (AP) bezeichnet. Ein AP folgt dem Alles-oder-Nichts-Prinzip d.h. unterschwellige Erregungen werden nicht weitergeleitet. Das AP wird über das Axon weitergeleitet und löst bei ausreichender Frequenz am nächsten Neuron erneut eines aus.

Die chemische Version funktioniert durch NTs. Diese werden innerhalb von Neuronen synthetisiert. Durch ein einlaufendes AP werden Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, wodurch die NT aus Vesikeln freigesetzt und durch Exozytose in den synaptischen Spalt abgegeben werden. Dort diffundieren sie zur Postsynapse und beeinflussen die nachgeschaltete Nervenzelle in ihrer Funktion (Mese, Richard et al. 2007, Ren 2011). NT können erregend, wie z.B. Noradrenalin, Serotonin, Dopamin (DA), Glu oder Aspartat, oder hemmend wirken. Exemplarisch zu nennen sind hier die γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Taurin und Alanin. Für jeden NT gibt es einen spezifischen Rezeptor, deren Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktioniert. Die NT werden von der Prä- oder der Postsynapse aufgenommen und enzymatisch eliminiert. Es

gibt über 90 verschiedene NT, im Folgenden wird auf die Wichtigsten etwas näher eingegangen (Fex and Altschuler 1986, Hunter, Doi et al. 1992).

ACh wird durch die ACh-Transferase aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Durch ein eintreffendes AP wird es Ca^{+} -vermittelt aus Vesikeln in den synaptischen Spalt abgegeben und bindet an der Postsynapse. In der Hörbahn steuern efferente Neuronen auf diese Weise ÄHZ. Dort bindet das ACh an cholinerge Nikotinrezeptoren, bestehend aus einer $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheit (Vetter, Liberman et al. 1999, Vetter, Katz et al. 2007), was einen Ca^{+} -Einstrom zur Folge hat (Lustig 2006). Im Gegensatz zu einer motorischen Endplatte führt dies nicht zu einer Depolarisation, sondern zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer Inhibierung. Ursächlich hierfür ist ein Ca^{+} -aktivierter SK2 K^{+} -Kanal, durch den K^{+} -Ionen die ÄHZ verlassen (Gekle, Wischmeyer et al. 2010). Dies kann aber auch durch spannungs- und (in geringerem Maße als SK2 K^{+} -Kanäle) calciumabhängige BK K^{+} -Kanäle ausgelöst werden (Wersinger, McLean et al. 2010). Diese werden in der basalen Hälfte der Cochlea stärker exprimiert, während der apikale Anteil von SK2 K^{+} -Kanälen dominiert wird (Elgoyhen and Katz 2012).

DA ist ein zur Gruppe der Katecholamine gehöriger NT. Grundlage für die Synthese von DA ist die Aminosäure Phenylalanin. Daraus wird Tyrosin synthetisiert, das durch die Tyrosinhydroxylase und die DOPA-Decarboxylase schließlich zu DA umgewandelt wird. DA stellt zwar eine Zwischenstufe in der Synthese von Noradrenalin und Adrenalin dar, fungiert aber auch selbst als NT. Es kann an fünf unterschiedliche Rezeptoren binden, die in D1- und D2-Rezeptoren unterteilt werden. Es wird vermutet, dass DA afferente Neuronen vor Minderdurchblutung und Lärmbelastung schützt, indem es die exzitatorische Wirkung von Glu an der Postsynapse reduziert (Doleviczenyi, Halmos et al. 2005).

Serotonerge Neuronen befinden sich außerhalb des auditorischen Systems, projizieren jedoch in die meisten auditorischen Bereiche und führen dort, ausgelöst durch Stress, zu einer Freisetzung von Serotonin. Das hat den Umbau neuronaler Strukturen zur Folge, aber auch das serotonerge System an sich wird abhängig von Alter und Schädigung der Cochlea ständig verändert (Hurley and Hall 2011).

Glu erhöht die Freisetzung von ACh in der efferenten Hörbahn und fungiert somit als positiver Rückkoppler der efferenten Hemmung (Ye, Goutman et al. 2017). Ein anderer Wirkort von Glu befindet sich zwischen der IHZ und ihrer afferenten Neuronen. Die Synthese von Glu wird durch Glutaminase katalysiert und benötigt α -Ketoglutarat und Glutamin als Edukte. Es wird sowohl durch Depolarisation als auch durch positive Rückkopplung aus der Präsynapse ausgeschüttet und kann an ionotrope und metabotrope Rezeptoren an Prä- und Postsynapse binden. Exemplarisch zu nennen sind hier die ionotropen postsynaptischen AMPA-GluR2/3- und NMDA-NR1-Rezeptoren (Usami, Takumi et al. 2001).

GABA wird aus Glu durch die Glu-Decarboxylase hergestellt und ist sowohl peripher als auch zentral einer der wichtigsten hemmenden NT (Caspary, Ling et al. 2008). Die Rezeptoren an der Postsynapse sind oft an Ionenkanäle gekoppelt. Durch Bindung eines NT an einen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Kanals und Ionen strömen ein. Diese können nur positiv geladen sein, wie es z.B. bei ACh oder Glu der Fall ist, oder sie werden hauptsächlich durchlässig für Cl⁻-Ionen. Dies geschieht bei einer Bindung von GABA und führt zu einer Inhibition der Zelle (Pollak, Burger et al. 2003). GABA stellt neben ACh den zweiten wichtigen NT in der efferenten Hörbahn dar (Eybalin 1993). Beide werden von demselben Terminal freigesetzt (Maison, Adams et al. 2003). GABA spielt an den ÄHZ sowohl bei niedrigen als auch hohen Schallpegeln eine Rolle, indem es die Verstärkerfunktion unterstützt und protektiv wirkt (Maison, Casanova et al. 2009). Sein Wirkort ist die Präsynapse, es senkt die Freisetzung von ACh und bewirkt so eine negative Rückkopplung der efferenten Hemmung (Wedemeyer, Zorrilla de San Martin et al. 2013).

Zusätzlich gibt es Rezeptoren, die an G-Proteine oder second messenger, wie z.B. cAMP, gekoppelt eine zelluläre Signalkaskade auslösen und Kinasen, die unabhängige Ionenkanäle ansteuern (Pollak, Burger et al. 2003).

1.6 Aufbau und Funktion der Mikrotubuli (MT)

Alpha- und beta-Tubuline sind in der Lage Heterodimere zu synthetisieren, was durch das MT-organisierende Zentrum koordiniert wird. Die Heterodimere lagern sich zu Protofilamenten zusammen, welche wiederum helikal angeordnet einen Mikrotubulus bilden. Die Polymerisation der MT wird durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) gesteuert. Diese werden in hochmolekulare (MAP1A, MAP1B, MAP2a und MAP2b) und mittelmolekulare (MAP2c, MAP2d und Tau) Proteine eingeteilt (Fink, Jones et al. 1996, Gonzalez-Billault, Jimenez-Mateos et al. 2004).

Beta-Tubulin tritt in 7 verschiedenen Isoformen auf: β I, β II, β III, β IV, β Va, β Vb und β VI. Diese sind in ihrer Aminosäuresequenz zu mindestens 75% identisch (Luduena 1998). Unter ihnen sind die am höchsten konservierten Aminosäuresequenzen der Evolution, was die Multi-Tubulin-Theorie zur Folge hatte. In dieser heißt es, dass die Multifunktionen der MT eine selektive Synthetisierung aus unterschiedlichen Arten von Tubulinen notwendig machen könnten (Fulton & Simpson, 1976).

Zeitlich startet der Aufbau der MT in Haarzellen an P0, in Säulenzellen an P3 und in DZ an P6. An P20 sind sie anatomisch ausgereift und physiologisch funktionell (Hallworth, McCoy et

al. 2000). IHZ enthalten nur beta-I und II, während sich in ÄHZ beta-I und IV nachweisen lassen. Sowohl ISZ als auch ÄSZ weisen beta II und IV auf, DZ beinhalten beta-I, II und IV (Hallworth and Luduena 2000). In IHZ kommt es in den ersten 16 Tagen nach der Geburt zu einer Reorganisation der MT und bis P20 ist zusätzlich beta-IV vorhanden, welches bis P27 langsam abgebaut wird (Slepecky, Henderson et al. 1995). Der gleiche Vorgang wird in ÄHZ für das in der adulten Cochlea fehlende beta-II und in den SZ für beta-I beobachtet, jedoch ohne eine Reorganisation der MT. Keine Veränderung findet in den DZ statt. Zu Beginn weisen alle Zellen beta-I, -II und -IV auf. Beta-III-Tubulin kann nicht nachgewiesen werden, was seine Neurospezifität unterstreicht. Die MT in den Haarzellen scheinen gewöhnliche Funktionen zu besitzen, wie den Transport von Membranvesikeln durch Erstellen einer Leitstruktur (Jensen-Smith, Eley et al. 2003). Es wird angenommen, dass sie hauptsächlich aus tyronisiertem Tubulin bestehen und dynamische Konstrukte darstellen, da bei wiederholter Polymerisation und Depolymerisation Tubulin entsteht, dessen carboxyterminaler Tyrosinrest noch nicht abgespalten wurde (Slepecky, Henderson et al. 1995). MT in den Säulen- und Deiterszellen bestehen dagegen kaum aus tyronisiertem, sondern aus stabilem detyronisiertem, acetyliertem und polyglutamyliertem Tubulin. Diese posttranslationalen Modifikationen legen nahe, dass diese Tubuline eine lange Lebensdauer aufweisen und die Stabilität des Corti-Organs erheblich positiv beeinflussen (Slepecky, Henderson et al. 1995). Möglich werden die Modifikationen u. A. durch Colchicin, was zu einer Resistenz gegen eine Depolymerisation führt (Bulinski and Gundersen 1991).

In den ersten Tagen nach der Geburt enthalten das intraganglionäre Spiralbündel der SGZ und afferente Dendriten beta-II, das innere Spiralbündel beta-III und efferente Fasern beta-I, während im Erwachsenenalter die drei Isoformen des Tubulins nur noch in Fasern dünnen Kalibers in der Habenula vorkommen. So wird auf einen Rückgang der MT geschlossen (Jensen-Smith, Eley et al. 2003).

1.7 Mausmodell der progressiven Motoneuronopathie (pmn)

Das in diesem Projekt untersuchte Mausmodell verfügt über eine fortschreitende Neuronopathie. Verantwortlich für die Krankheit ist eine Missense-Mutation im Tubulin-spezifischen Chaperon E (TBCE) Gen auf Chromosom 13. Dadurch kommt es zu einer Substitution von Tryptophan gegen Glycin (Bommel, Xie et al. 2002). Das TBCE Gen kodiert den Cofaktor E, der eine wichtige Rolle bei der Synthese von heterodimeren alpha- und beta-Tubulinkomplexen spielt (Tian, Huang et al. 1996), aus denen wiederum MT synthetisiert werden. Genau wie bei dem Tubulin-Faltungs-Cofaktor B (TBCB) handelt es sich bei TBCE um ein Alpha-Tubulin-Bindungsprotein. TBCB ist zusätzlich in der Lage mit TBCE einen Komplex zu bilden, wodurch seine Wirksamkeit bei der Tubulindissoziation verstärkt wird

(Kortazar, Fanarraga et al. 2007). TBCE bindet außerdem an Cofaktor D (TBCD), der zuvor zusammen mit TBCA beta-Tubuline gebunden und stabilisiert hat. TBCC führt letztendlich zur Freisetzung der Beta-Tubulin-Polypeptide (Tian, Huang et al. 1996).

MT stellen essentielle Strukturen für eine Vielzahl von zellulären Mechanismen dar, wie z. B. Zellwanderung, Trennung der Chromosomen oder der Zellentwicklung (Kirschner and Mitchison 1986). Außerdem spielen MT eine wichtige Rolle beim axonalen Transport (Ishihara, Hong et al. 1999) und der Entwicklung von Neuronenauswüchsen, sogenannten *growth cones*. Ist dieser gestört, kann es zu unterschiedlichen neuronalen Krankheiten, wie z. B. Frontallappendemenz oder Neuropathien führen (Hutton, Lewis et al. 2001). Eine Mutation im TBCE Gen kann außerdem zwei seltene neurologische Entwicklungssyndrome auslösen: den Hypoparathyreoidismus-Retardations-Dysmorphismus und das Kenny-Caffey-Syndrom (Sferra, Baillat et al. 2016). Die korrekte Synthese der MT ist sowohl für Motoneuronen als auch für sensorische Neuronen des Hörnervs und der Haarzellen in der Cochlea notwendig (Steyger, Furness et al. 1989).

Pmn-Mäuse unterscheiden sich bis 2 Wochen nach ihrer Geburt phänotypisch nicht von ihren gesunden Artgenossen. Elektrophysiologisch zeigen sich bereits zu diesem Zeitpunkt durch Verkleinerung der M-Welle des Hoffmann-Reflexes Einschränkungen in der neuronalen Leitfähigkeit (Holtmann, Zielasek et al. 1999). Danach kommt es jedoch zu einer an den Hinterläufen beginnenden Lähmung, die ab einem Alter von 4-5 Wochen zu Atemversagen durch Befall des Nervus phrenicus und somit zum Tod des Tieres führt. Histologisch ist eine Atrophie der Muskelzellen und eine Degeneration von peripheren Nerven und von Motoneuronen zu beobachten (Holtmann, Zielasek et al. 1999), die ihren Ursprung an den



Abb 1.: Vergleich Phänotyp wt- und pmn-Maus

motorischen Endplatten nimmt und retrograd zum Zelltod führt. Bei der pmn-Maus lässt sich eine durch Click-brainstem evoked response audiometry (BERA) nachgewiesene Schwerhörigkeit feststellen. Diese zeigt sich in einem Anstieg der Hörschwelle ab einem Alter von P26, wobei sich die Differenz zur Hörschwelle der Wildtyp(wt)-Maus bis zum Tod des Tieres immer weiter vergrößert (Volkenstein, Brors et al. 2009). Dies führte zu weiteren Untersuchungen mit dem Ziel zu eruieren, ob sich die Beeinträchtigung des Hörvermögens cochleär oder neuronal darstellt. Bei der BERA zwischen 4 und 16 kHz zeigt sich schon ab P21 eine signifikante Erhöhung der Hörschwelle im Vergleich zu den wt-Mäusen. Während zwischen 4 und 8 kHz über 60 dB nötig sind, um ein Potenzial ableiten zu können, sind es bei 12 und 16 kHz sogar 80 dB. Bei der wt-Maus genügt jeweils ein Schalldruckpegel von 30 dB. Auch hier steigt der Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen mit steigendem Alter an. Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen (DPOAE) können bei den pmn-Mäusen an P21 nur bei 8 und 16 kHz, an P28 und P35 sogar nur noch bei 8 kHz nachgewiesen werden. Es liegt also eine kombinierte neuronale und cochleäre Pathologie vor (Rak, Frenz et al. 2013). Mikroskopisch kann eine Degeneration der ÄHZ festgestellt werden. Die Lamina reticularis und die IHZ sind ohne Auffälligkeiten und die übrig gebliebenen ÄHZ weisen normale Stereozilienbündel auf. Das TBCE-Protein, das bei wt-Mäusen in den ISZ und ÄHZ zu finden ist, wird bei der pmn-Maus an P28 in der apikalen Windung der Cochlea ohne Unterschiede zur wt-Maus nachgewiesen. Im medialen Teil reduziert sich zwar die Anzahl der ÄHZ, die TBCE-Färbung bleibt in den übrig gebliebenen Zellen aber gleich. Zusätzlich ist das Protein zusammen mit Kernen apoptotischer Haarzellen zu erkennen. Basal findet man keine ÄHZ mehr und somit TBCE nur noch in den ISZ (Rak, Frenz et al. 2013). Warum die ISZ im Gegensatz zu den ÄHZ überleben, kann durch die Unterschiede in den Tubulinstrukturen erklärt werden. Während MT in Haarzellen in lockeren Netzwerken organisiert sind (Slepecky and Ulfendahl 1992) und hauptsächlich dynamisches tyronisiertes Tubulin beinhalten, entsteht in den Säulenzellen durch posttranslationale Modifikationen acetyliertes, detyronisiertes Tubulin (Tannenbaum and Slepecky 1997), das durch eine dichtere Anordnung eine stabile Struktur darstellt (Angelborg and Engstrom 1972). Durch den höheren Umsatz des Tubulins in den Haarzellen sind diese eher auf die Produktion neuer MT angewiesen (Jensen-Smith, Eley et al. 2003), wobei TBCE eine essentielle Rolle spielt. Bei der Untersuchung des Hörnervs werden bei der Betrachtung der Somata der Spiralganglien, der Menge der Nervenzellkörper und der Hörnervenfasern keine Unterschiede festgestellt. Die Axone zeigen normal ausgeprägte Myelinscheiden, jedoch ist die Anzahl der MT in den Axonen signifikant verringert. Auch eine degenerierte axonale Tubulinstruktur ist sichtbar. Insgesamt wirft diese Studie die Frage auf, ob die gestörte Tubulinsynthese den Zelltod der ÄHZ verursacht oder die Apoptose zuerst eintritt (Rak, Frenz et al. 2013).

1.8 Pegylierter insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1

Zurzeit existieren weder für Erkrankungen der Motoneurone noch für Hörstörungen langfristige kausale Therapien. Neurotrophe Faktoren werden schon seit einiger Zeit als eine therapeutische Strategie bei motorischen Erkrankungen des peripheren Nervensystems sowie bei Hörstörungen diskutiert. Sehr frühe Studien mit dem neurotrophen Faktor CNTF zeigen, dass die Muskelatrophie bei der pmn-Maus fast vollständig aufgehoben ist (Sendtner, Schmalbruch et al. 1992). Auch hat CNTF sowohl bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), als auch bei dem entsprechenden Mausmodell, der SOD1 Maus, eine modifizierende Wirkung (Giess, Holtmann et al. 2002). Darüber hinaus gibt es erste Berichte über den Einsatz von neurotrophen Faktoren im Tiermodell zur Therapie von Hörstörungen. Eine intracochleäre Injektion von NT-3 oder BDNF nach medikamentöser Ertaubung führt zu einem deutlich erhöhten Überleben von auditorischen Neuronen mit einer Verbesserung der Hörschwellen (Leake, Stakhovskaya et al. 2013). Auch mit IGF1 sind im Bereich der Innenohrbiologie schon einige Studien durchgeführt worden, die dessen Einfluss auf das sensorische Epithel der Cochlea und den therapeutischen Einsatz des Moleküls untersucht haben. Es ist bekannt, dass IGF1 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Proliferation von otischen Vorläuferzellen spielt (Frago, Canon et al. 2003). Interessanterweise wird IGF1 und sein Rezeptor während der embryonalen Entwicklung des cortischen Organs stark exprimiert, nach der Geburt sinkt die Expression jedoch (Murillo-Cuesta, Rodriguez-de la Rosa et al. 2011). Der Knockout von IGF1 und des Rezeptors führt auch zu einer hochgradigen sensorineuralen Schwerhörigkeit. Auf morphologischer Ebene ist während der Entwicklung die otische Kapsel sowie postnatal die Cochlea deformiert. Die auditorischen Neuronen weisen eine aberrante Innervation sowie eine fehlerhafte Myelinisierung auf (Liu, Baker et al. 1993). Eine lokale Applikation von rekombinant humanem IGF1 in das Mittelohr führt zu einer Minderung von lärminduzierter Schwerhörigkeit im Gerbil (Lee, Nakagawa et al. 2007). Auch beim Menschen konnte aufgezeigt werden, dass eine lokale Applikation von rekombinant humanem IGF1 in das Mittelohr zu einer Verbesserung der Schwelle nach einem Hörsturz führt, welcher therapierefraktär auf eine Gabe von Kortikosteroiden ist (Nakagawa, Sakamoto et al. 2010). IGF 1 kann zusätzlich eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben werden (Ferrer-Alcon, Winkler-Hirt et al. 2008). Er aktiviert das Wachstum der Axone von Motoneuronen (Hughes, Sendtner et al. 1993, Neff, Prevet et al. 1993) und inhibiert die Verkümmern von Skelettmuskelfasern (Rommel, Bodine et al. 2001, Krieger, Elflein et al. 2014). In Studien an Patienten mit ALS (Lai, Felice et al. 1997, Borasio, Robberecht et al. 1998, Sorenson, Windbank et al. 2008) konnten sich diese Wirkungen jedoch nicht bewahrheiten, was vermutlich auf eine zu niedrige Konzentration des Wirkstoffs im Serum zurückzuführen ist. Bei Mäusen beträgt die Halbwertszeit nach subkutaner Injektion 1-2 Stunden, die durch eine Koppelung von IGF1 an Polyethylenglykol (peg) auf über 30 Stunden erhöht werden konnte

(Metzger, Sajid et al. 2011). Diese Pegylierung reduziert die Immunantwort und erhöht die Verweildauer von therapeutischen Proteinen im Körperkreislauf (Basu, Yang et al. 2006), indem sie diese vor proteolytischen Enzymen abschirmt, eine schnelle renale Ausscheidung verhindert und weniger Antikörper synthetisiert werden (Harris and Chess 2003). Bei wt-Mäusen kann durch die Injektion mit pegIGF-1 eine moderate Erhöhung des Körpergewichts und eine Verbesserung synaptischer Funktionen beobachtet werden, was vor allem durch eine gleichbleibende und lang anhaltende Verfügbarkeit von pegIGF-1 im Gehirn erreicht wird (Saenger, Goeldner et al. 2011). Obwohl die systemischen Konzentrationen im Vergleich zu dem rekombinant humanen IGF1 um ein Vielfaches erhöht werden, werden keine akuten Nebenwirkungen festgestellt (Metzger, Sajid et al. 2011). Sowohl rh- als auch pegIGF-1 zeigen in einer Studie positive Effekte auf das Überleben von kultivierten Motoneuronen aus pmn- und wt-Tieren und deren Axonwachstum. Auch in vivo wird vor allem bei höheren Konzentrationen von pegIGF-1 (0,15mg/kg Körpergewicht statt 0,05), das jeden zweiten Tag ab P13 subkutan injiziert wird, ein verstärktes Überleben von lumbalen und fazialen Motoneuronen in pmn-Tieren und eine reduzierte Vergrößerung des Somas, die mit einer Chromatolyse einhergeht, ermittelt. Bei der Betrachtung des N. phrenicus beobachtet man eine durch den Wachstumsfaktor induzierte Verdickung der Myelinscheide und des gesamten Axondurchmessers. Behandelte pmn-Tiere leben im Durchschnitt eine Woche länger als die Kontrollgruppe, weisen größere Muskelkraft auf und verlieren nicht so viel Gewicht (Jablonka, Holtmann et al. 2011). Auch bei anderen Mausmodellen, wie der Nmd(2J), die zur Imitation der spinalen Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (SMARD1) verwendet wird, können Verbesserungen der motorischen Fähigkeiten durch die Injektion mit pegIGF-1 beobachtet werden (Krieger, Metzger et al. 2014).

1.9 Zielsetzung

Durch die hohe Prävalenz von Schwerhörigkeit und die damit einhergehenden Einschränkungen der Lebensqualität besteht dringende Notwendigkeit neue Therapiestrategien für die Behandlung erkrankter Menschen zu entwickeln. V.a. das Gebiet der Schallempfindungsstörungen, für das es bis dato keinen medikamentösen kausalen Therapieansatz gibt, erfordert weitere intensive Forschung.

In dem vorliegenden Projekt soll untersucht werden, ob pegIGF-1 in der pmn-Maus, zusätzlich zu den protektiven Effekten auf die Motorneurondegeneration, auch einen Einfluss auf die Schwerhörigkeit der Tiere und die Pathophysiologie der Cochlea, insbesondere die Neuropathie des Hörnervs und den apoptotischen Haarzellverlust hat (Rak, Frenz et al. 2013). Dass die Applikation von pegIGF-1 bei der pmn-Maus das Absterben der Motoneuronen

verzögert, einen protektiven Einfluss auf die Motoaxone des N. phrenicus und ischiadicus hat und dadurch die Lebensdauer der Mäuse verlängert, konnte bereits 2011 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Jablonka, Holtmann et al. 2011).

Jedoch gibt es noch keine Daten, ob die Applikation von pegIGF-1 bei der pmn-Maus auch einen Einfluss auf die Schwerhörigkeit hat. Diese Erkenntnis soll in der aktuellen Arbeit gewonnen werden.

2. Material

2.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Artikel	Hersteller
Aufnahmemikrofon	ER-10 B+ Low Noise DPOAE Microphone	Etymotic Research
Heizkissen	Rodent Warmer 53810	Stoelting
Kryostat	CM 1950	Leica
Lautsprecher	MF1Multi-Field Magnetic Speakers	Tucker-Davis Technologies
Konfokales Mikroskop	OlympusFluoview 1000IX81	Olympus
Floureszenzmikroskop	DMi 8	Leica
Mikroskop für Wholemout-Präparation	Stemi 508	Zeiss
PCR Thermocycler	Biometra Trio	Analytik Jena
Prozessor	RZ6 Multi I/O Prozessor	Tucker-Davis Technologies
Verstärker	RA4PA 4-Channel Medusa Preamp	Tucker-Davis Technologies
Wippschüttler	Mini Rocker-Shaker	Hartenstein

2.2 Labormaterialien

Bezeichnung	Artikel	Hersteller
Dekapitationsschere	14200-21	Fine Science Tools
Feindosierungsspritze	Omnifix F	Braun
feine Pinzette	Dumont #5 Fine Forceps 11254-20	Fine Science Tools
Fettstift	Liquid Blocker, Pap-Pen Mini	Science Services
Infusionssystem	Venofix Safety	Braun
Kryoeinbettformen	Tissue-Tek Cryomold	Sakura
Pinzette	Dumont #5 Forceps 11252-20	Fine Science Tools
Schere	Hardened Fine Iris Scissors 14090-09	Fine Science Tools
Schere für Wholemout	Vannas Spring Scissors 15000-03	Fine Science Tools
Sichelskalpell für Wholemout	Sichel Knife 10073-14	Fine Science Tools
Spatel	10091-12	Fine Science Tools
Waage	Digital Platform Scale I-2000	Superior Mini

Zellkulturschalen	24 well Cellstar	Greiner Bio-One
--------------------------	------------------	-----------------

2.3 Narkotika

Artikel	Zulassungsnummer	Hersteller
Ursotamin 100mg/ml	3100370.00.00	Serumwerk Bernburg
Xylavet 20mg/ml	401510.00.00	cp-pharma

2.4 Chemikalien

Bezeichnung	Artikel	Hersteller
Aceton	32201	Sigma-Aldrich
Agarose, universal	9012-36-6	VWR Life Science
Aqua ad iniectabilia	Zul.-Nr.: 2559.99.99	Berlin-Chemie AG
Aqua polymount	18606	Polysciences
Buffer G	BG5	ThermoFisher Scientific
Chloroform	2445	Merck
DNA Gel Loading Dye (6X)	R0611	ThermoFisher Scientific
Ethanol	64-17-5	Fisher BioReagents
Gelatine	43083	Roth
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	SM0311	ThermoFisher Scientific
Kaliumchrom(III)-sulfat	1036	Merck
Midori Green Advance	617004	Biozym
NaCl 0,9%	2737756	Braun
Natriumchlorid	31434	Sigma-Aldrich
Propan-2-ol	67-63-0	Fisher Chemical
Red HS Taq Mastermix	331126XL	Biozym
Saccharose	A2211,1000	PanReac AppliChiem
SDS (Sodium dodecyl sulfate solution)	71736	Sigma-Aldrich
TissueTek	4583	Sakura
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	77-86-1	Merck

2.5 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Antikörper-Lsg	3% NGS 1% BSA 0.5% TritonX100 0.1% Tween20 In 1 PBS
Blocking solution	10% NGS 1% BSA 0.5% Triton X100 0.1% Tween20 in 1M PBS
EDTA, 125 mM	100 ml 0.25 M EDTA (Sigma) 100 ml 0.1M PBS
Fixans	4% PFA in 1M PBS
Lysispuffer	10mM Tris-Base 100mM disodium EDTA 150mM NaCl in 800ml d H2O ad 50ml 10% SDS, pH=7.4
Narkoselösung 5ml	4,2ml 0,9% NaCl 0,6ml Ketamin 0,2ml Xylazin
PBS 10x	80g NaCl 2g KCl 2g KH ₂ PO ₄ 11.75g Na ₂ HPO ₄ ad 1l ddH ₂ O
PFA 2%	10 g Paraformaldehyde 205 ml 0.2 M Na ₂ HPO ₄ 45 ml 0.2 M Na ₂ H ₂ PO ₄ ad 500 ml ddH ₂ O, pH = 7.4
TAE, 50x	121,1g TRISbase 14,6g EDTAacid (M=292,25)

	pH = 8,0 mit Eisessig ad 500ml ddH ₂ O
Washing solution	0.3% Triton X100 0.1% Tween20 in 1 PBS

2.6 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
pmn for	5' - GAG GGT GGC ATG GAT AGC - 3'	metabion international AG
pmn rev	5' - CTA CTC TGC CTT GCC TGA TAT GT - 3'	metabion international AG

2.7 Enzyme

Bezeichnung	Artikel	Hersteller
Mnl 1	ER1071	ThermoFisher Scientific
Proteinase K	3115879001	Roche Diagnostics GmbH

2.8 Wachstumsfaktor

Bezeichnung	Patent	Hersteller
pegIGF-1	US20100210547	Hoffmann-La Roche Ltd.

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Antigen	Konzentration	Klonalität	Host	Artikel	Hersteller
anti-beta III Tubulin	1/1000	monoklonal	mouse	ab7751	abcam
Anti-Choline Acetyltransferase	1/1000	polyklonal	goat	AB144P	EMD Millipore Corp.

DAPI	1/1000	monoklonal	rabbit	ab11266	abcam
-------------	--------	------------	--------	---------	-------

2.9.2 Sekundärantikörper

Antigen	Konzentration	Ziel-Antigen	Host	Artikel	Hersteller
Alexa Flour 488 Phalloidin	1/800	F-Aktin	-	8878S	Cell Signaling Technology
Alexa Flour 555 IgG	1/800	anti-goat	donkey	ab150131	abcam
Alexa Flour 647 IgG	1/800	anti-mouse	donkey	A32773	invitrogen

2.10 Tierstamm

Nomenklatur	Gattung	Abkürzung	Herkunft
NMRI-TBCE^{pmn}, JAX Nr. 009682	Maus (Mus musculus)	pmn	Institut für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg

2.11 Software

Bezeichnung	Hersteller
BioSigRZ	Tucker Davis Technologies
Graphpad Prism 7	Graphpad Software Inc.
ImageJ	Wayne Rasband
LAS X	Leica Microsystems CMS GmbH
Office 2016	Microsoft
Photoshop	Adobe

3. Methoden

3.1 Mauslinie NMRI-TBCE^{pmn} (Jax Stock No:009682)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden auf einem genetischen Hintergrund des Naval Medical Research Institute (NMRI) im Institut für Klinische Neurobiologie gezüchtet. Heterozygote pmn-Mäuse wurden miteinander verpaart, um homozygote wt-Mäuse und homozygote pmn-Mutanten zu gewinnen. Ebenfalls wurden durch Rückkreuzung mit wt-NMRI-Mäusen heterozygote Mäuse hinzugezogen, um die Linie zu erhalten. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen untergebracht (20-22 °C, 55-65% Luftfeuchtigkeit, 12:12 h Hell/Dunkel-Zyklus, Futter und Wasser ad libitum). Alle Verfahren wurden unter strikter Einhaltung der bundesdeutschen Tierschutzbestimmungen und der Regeln des Vereins zur Begutachtung und Akkreditierung von Labortierpflege mit Genehmigung der örtlichen Veterinärbehörde (AZ-55.2-DMS-2532-2-80) durchgeführt. Für die Injektionsstudien erhielten die Tiere ab dem 15. postnatalen Tag, jeden zweiten Tag zur gleichen Zeit s.c. Injektionen von pegIGF-1 (0,05 oder 0,15 mg/kg KG).

3.2 Genotypisierung

3.2.1 DNA-Extraktion

Ohrbiopsien wurden für 2-3 Stunden bei 60 °C und 550 rpm in Lysispuffer (pH-Wert: 8,0 – 8,5) und 20 µl Proteinase K verdaut. Danach wurden 5 % SDS 3 M NaCl und Chloroform hinzugegeben, die Mischung für 20 – 30 s gevortext, bis eine weiße Suspension entstand. Anschließend wurden für 7 min bei 4 °C und 14000 rpm in einer Zentrifuge DNA und andere Zellbestandteile getrennt. Die DNA wurde mit Isopropanol versetzt und für 5 min bei 4 °C und 14000 rpm ausgefällt. Der restliche Alkohol wurde vorsichtig abgossen. Das DNA-Pellet wurde zuletzt mit Ethanol gewaschen und für 2 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert und trockengestellt. Die DNA wurde in 0,01m Tris-HCl gelöst und aufbewahrt.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und Gelelektrophorese

Für die PCR wurde 0,15 µg/µl aufgereinigte DNA und je 20 pmol Primer vor- und rückwärts mit dem PCR Red HS Tap Masterkit (Biozym) versetzt. Begonnen wurde die PCR mit einem 2-minütigem Denaturierungsschritt bei 94 °C, auf den 35 Zyklen von jeweils 30 Sekunden zunächst bei 94 °C, dann 58 °C und 72 °C folgten. Im letzten Zyklus wurde der letzte Schritt für 7 Minuten und das Produkt letztendlich bei 4 °C gehalten. Eine erfolgreiche PCR zeigte sich in einem Produkt von 601 bp. Zur Unterscheidung von wt-heterozygoten und ko-mutierten Mäusen wurde zusätzlich eine generierte Restriktionsstelle mit dem Enzym Mnl für mind. 3 Std

bei 37°C inkubiert. Das Produkt wurde mit DNA Gel loading dye vermischt und auf einem 3 %-igen Agarosegel über 1 Stunde bei 170 V aufgetrennt. Als Standard diente der Gene Ruler Low Range DNA Ladder (ThermoFischer). Wt-Mäuse besitzen zwei Banden mit der Größe von 260 und 219 bp, bei pmn-Mäusen betragen die Größen 260 und 155 bp und bei heterozygoten Tieren resultieren 3 Banden von 260, 219 und 155 bp.

3.3 Narkose und Haltung

Die audiophysiologischen Messungen an den Tieren fanden unter Narkose statt. Mit einer intraperitonealen Injektion von zunächst 0,05 ml/g Körpergewicht (KG) der NarkosestammLösung wurden die Tiere anästhesiert. Mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes wurde die Narkosetiefe überprüft und bei Bedarf nach 10 min 0,03ml / g KG nachgespritzt. Nach einer Stunde wurde bei Bedarf und maximal jede halbe Stunde 0,01 – 0,02 ml/g KG nachgegeben. Die Körpertemperatur wurde während der Messungen durch ein rückgekoppeltes Heizkissen auf 37 °C gehalten.

3.4 Elektrophysiologie

3.4.1 DPOAE

Zur Messung der DPOAE wurden zwei Reintöne (f_1 und f_2) im Verhältnis $f_2/f_1=1,2$ verwendet. Die von zwei separaten Lautsprechern erzeugten Primärtöne wurden über das geräuscharme Aufnahmemikrofon in den verschlossenen Gehörgang des Tieres eingeführt. Die Emissionen wurden über das Aufnahmemikrofon erfasst. Wenn ein Peak im Spektrum bei $2f_1-f_2$ das Grundrauschen um 3 dB μ V überschritt und bei dem nächsthöheren SPL reproduzierbar war, wurde es als positive DPOAE definiert. Die Testfrequenzen reichten von 4 bis 24 kHz in 4kHz Schritten mit einem festen Frequenzverhältnis f_2/f_1 von 1,2 und einem Stimuluspegel von 30 bis 90 dB SPL in 5 dB Schritten. Dabei entsprach der Primärton f_1 dem 0,894-fachen und der Primärton f_2 dem 1,118-fachen der Grundfrequenz. Die Messung der DPOAEs wurde immer vor der BERA durchgeführt, da eine umgekehrte Vorgehensweise eine temporäre Reduktion der DPOAEs zur Folge haben kann (Mhatre, Tajudeen et al. 2010). Die Hirnstammaudiometrie wird jedoch nicht von einer vorherigen DPOAE-Messung beeinflusst.

3.4.2 BERA

Zu Messung der akustisch evozierten Hirnstammpotentiale wurden subkutane Elektroden ventrolateral des Ohres (aktiv), am Vertex (negativ) und am Körper (neutral) subkutan gelegt und an einen Vorverstärker angeschlossen. Die Applikation der Töne erfolgte über ein Mikrofon, das in den äußeren Gehörgang (aktives Ohr) eingeführt wurde. Zur Ableitung der frequenzspezifischen BERA wurden Click-Reize und Tone-Bursts zwischen 4 und 24 KHz abgespielt. Die Reize begannen bei einem SPL von 90 dB und reduzierten sich in 5 dB Schritten bis auf 30 dB. Die Antworten wurden 20000-fach verstärkt und mit einem Bandpass gefiltert, der auf 0,3-3,0 kHz eingestellt war. Über einen Zeitraum von 10 ms wurden die Reaktionen abgetastet, aus 512 Antworten gemittelt und so die minimale Schwelle, bei der noch reproduzierbare Wellen gemessen werden konnten, detektiert. Diese entsprach der Hörschwelle der Tiere.

3.5 Perfusionsfixierung

Alle Tiere wurden zur immunzytologischen Aufarbeitung der Cochleae perfusionsfixiert. Direkt nach Beendigung der elektrophysiologischen Messungen wurden die Mäuse mit Kohlenstoffdioxid erstickt. Nach dem Hirntod des Tieres wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz dargestellt. Die Perfusionsfixation wurde mit Gravitationsdruck durchgeführt. Der Druck des Infusionssystems wurde eingestellt und die Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt. Um einen Abfluss des Fixans zu gewährleisten, wurde die rechte Herzkammer mit einem Schnitt entlastet und das Tier so lange durchspült, bis sich kein Blut mehr mit dem Fixans vermischt. Das Tier wurde dekapitiert, das Gehirn entfernt, die Felsenbeine herausgebrochen und in die Fixierlösung gegeben.

3.6 Einbettung und Anfertigung von Kryoschnitten

Die fixierten Cochleae wurden für mind. 3 Stunden in einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung in 1 M PBS gegeben und danach über Nacht auf dem Wippschüttler in 120 mM EDTA dekalzifiziert. Die linken Cochleae wurden in den folgenden Lösungen belassen, bis sie bis zum Grund des Gefäßes abgesunken waren. Zunächst handelte es sich um eine 20 %-ige Saccharoselösung in 0,1 M PBS, die darauf durch eine 30 %-ige ersetzt wurde. Zu dieser wurde nach Absinken des Gewebes Tissue Tek® hinzugefügt und zwar zuerst im Verhältnis 1:3, dann 3:1, bis am Ende nur noch Tissue Tek® in das Gefäß gegeben wurde. Dieses wurde mitsamt der Cochlea in ein Kryomold überführt und ausgerichtet. Das Kryomold wurde auf einen Metallblock gelegt, der bei -80 °C gelagert wurde, und auf diese Weise der Inhalt

langsam eingefroren. Die Cochleae wurden mit einem Kryostaten in 9 µm dicke Schichten geschnitten und jeweils 6 davon auf einen gelatinierten Objektträger übertragen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -80 °C.

3.7 Immunocytochemische Färbung von Kryoschnitten

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und die einzelnen Gewebestücke mit einem Fettstift umrandet. Alle folgenden Schritte wurden in einer dunklen und feuchten Kammer durchgeführt und die vorherige Lösung abgesaugt, bevor die Neue auf den Objektträger gegeben wurde. Zunächst wurden die Schnitte mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung in 1 M PBS zur Nachfixierung für 30 Minuten bedeckt. Diese wurde für eine Stunde durch Blocking Solution ersetzt, die zur Blockierung unspezifischer Bindungen genutzt wird. Nun wurden für mind. 3 Stunden primäre Antikörper, verdünnt in der Antikörperlösung, inkubiert. Danach wurde das Gewebe in 3 Durchgängen von jeweils 15 min mit washing buffer gespült, bevor für eine Stunde sekundäre Antikörper auf den Gewebestücken belassen wurden. Es folgten erneut 3 Spüldurchgänge von jeweils 15 min. Nun ließ man für 5 min DAPI einwirken und spülte abschließend mit 1 M PBS. Kurz bevor die Gewebestücke komplett getrocknet waren, wurden sie mit Aqua polymount bedeckt und eingedeckt.

3.8 Präparation und immunzytochemische Färbung von Wholemoutpräparaten des Corti'schen Organs

Die rechten Cochleae wurden zunächst in 120mM EDTA über Nacht dekalzifiziert. Bei der Präparation wurde zunächst von apikal beginnend unter einem Mikroskop mit einer Pinzette die dekalzifizierte Kapsel und das Stria Ligamentum mit Stria vascularis entfernt. Nun wurde mit Schere und Skalpell die Windungen der Cochlea in 3 Teile geschnitten: apikal, medial und basal. Daraufhin wurden diese in eine mit Fixans befüllte 24-well Zellkulturschale überführt und dort mind. 30 Minuten belassen. Die folgenden Schritte wurden alle auf einem Wippschüttler mit einer Geschwindigkeit von 12 rpm durchgeführt und entsprachen dem Vorgehen, das bei der Färbung der Kryoschnitte beschrieben wurde, beginnend mit der einstündigen Blockierung der unspezifischen Bindungen.

3.9 Mikroskopie

Das IX81 Mikroskop ist mit einem Olympus FV1000 konfokalem Laserscansystem, einem FVD10 SPD Spektraldetektor und Diodenlasern von 405, 473, 559 und 635 nm ausgestattet. Mit einem Olympus UPLSAPO60X Objektiv (Öl, numerische Apertur: 1,35) wurden die Bilder aufgenommen. Für das hochauflösende konfokale Scannen wurde eine Lochblendeneinstellung verwendet, die ein Beugungsscheibchen darstellte. In der Z-Achse wurde in 300nm Schritten whole-mount-Aufnahmen des Cortischen Organs aufgenommen. Helligkeit und Kontrast der Bilder wurden unter Verwendung von ImageJ eingestellt. Durch eine Gammakorrektur von 1,0 auf 0,8 wurde die Darstellung einiger Aufnahmen verbessert.

3.10 Auswertung und Statistik

Die Werte der DPOAE Messungen wurden vor der Analyse umgerechnet. Der RZ6-Prozessor ist ein +/- 10V-Gerät, daher sind die beschriebenen Pegel des TDT Systems inhärent als dB Volt (dBV) interpretiert. Die lineare Spannung wird mit $V=10^{(dBV/20)}$ ermittelt und diese dann mit der etymotischen Mikrofonempfindlichkeit bei 93,9dB (/0.05) verglichen, um einen dB-Wert relativ zu 93,9 zu erhalten. Daraufhin wird 93,9 addiert. Daraus erfolgt folgende Gleichung, um dBV in dB SPL umzuwandeln:

$$20 \log_{10} \left(\frac{10^{(dBV/20)}}{0.05} \right) + 93.9$$

Bei der grafischen Analyse der DPOAE wurden die Geraden der linearen Regression der Datenpunkte benutzt.

Die Analyse der BERA beinhaltete die Differenz der Latenz zwischen Welle 1 (Nervus cochlearis) und 2 (NC), die maximale Amplitude beider Wellen und die alleinige Latenz von Welle 2.

Die Hörschwellen bei den DPOAE wurden für den SPL angenommen, bei dem zuletzt ein positiver Wert gemessen wurde. Bei der BERA wurde die Hörschwelle für denjenigen SPL festgelegt, bei dem zuletzt ein reproduzierbarer Wellenverlauf erkannt werden konnte. Diese Werte von 3-10 Tieren der jeweiligen Gruppen wurden gemittelt und sind als Hörschwellen \pm Standardabweichung dargestellt.

Bei der Untersuchung der ÄHZ, β -III-positiver Spiralganglienfasern und cholinergischer Synapsen wurden die jeweiligen Exemplare mit dem Programm ImageJ ausgezählt und der betroffene Anteil auf eine komplette Cochleawindung hochgerechnet.

Die statistische Analyse und graphische Darstellung wurde selbstständig mit Hilfe von GraphPad Prism durchgeführt. Mit einer Spaltenanalyse wurde die Normalverteilung festgestellt. Wurde eine Gauss'sche Normalverteilung festgestellt, kam es zur Durchführung einer ANOVA und des Tukey's Multiple Comparison Post-Tests und zur Bestimmung des Mittelwerts sowie des Standardfehlers (*standard error of the mean*, SEM). Im Falle einer nicht normalen Verteilung kam es zur Durchführung des Kruskal-Wallis Tests und des Dunn's Multiple Comparison Post-Tests und zur Bestimmung des Mittelwerts sowie der Standardabweichung (*standard deviation*, SD). Ein p-Wert von weniger als 0,05 galt als signifikant. Signifikanzen zwischen wt- und pmn-Tieren wurden aus Gründen der Übersicht nicht berücksichtigt. Falls nicht anders vermerkt, sind alle dargestellten Daten Mittelwert und SEM.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Funktionalität und Anzahl der ÄHZ

4.1.1 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels Schwellenbestimmung der DPOAE

4.1.1.1 Alter P21

Die wt-Tiere dieses Alters, die keine Injektionen erhielten, zeigen folgende Schwellen mit Standardabweichung für die einzelnen Frequenzen: 4 kHz: $85 \pm 9,1$ dB SPL; 8 kHz: $39,3 \pm 9,4$ dB SPL; 12 kHz: $31,8 \pm 4,9$ dB SPL; 16 kHz: $33,8 \pm 8,1$ dB SPL; 20 kHz: $38,8 \pm 10,9$ dB SPL; 24 kHz: $41 \pm 8,2$ dB SPL (n=10). Wt-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weisen folgende Schwellen auf: 4 kHz: $82,1 \pm 8,1$ dB SPL; 8 kHz: $43,6 \pm 9,1$ dB SPL; 12 kHz: 35 ± 5 dB SPL; 16 kHz: $44,6 \pm 12,9$ dB SPL; 20 kHz: $50 \pm 18,7$ dB SPL; 24 kHz: $48,2 \pm 12,2$ dB SPL (n=7). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei wt-Mäusen folgende Schwellen gemessen: 4 kHz: $88,3 \pm 1,4$ dB SPL; 8 kHz: $55,8 \pm 25,5$ dB SPL; 12 kHz: $48,3 \pm 21$ dB SPL; 16 kHz: $55,8 \pm 29,6$ dB SPL; 20 kHz: $56,7 \pm 22,4$ dB SPL; 24 kHz: $56,7 \pm 24,5$ (n=3). Pmn-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, weisen folgende Schwellen auf: 4 kHz: $81,8 \pm 7,5$ dB SPL; 8 kHz: $43,2 \pm 6,7$ dB SPL; 12 kHz: $40,7 \pm 6,4$ dB SPL; 16 kHz: $48,6 \pm 10,1$ dB SPL; 20 kHz: $57,9 \pm 14,1$ dB SPL; 24 kHz: $51,1 \pm 12,1$ dB SPL (n=7). Pmn-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, zeigen folgende Schwellen: 4 kHz: $83,3 \pm 11,3$ dB SPL; 8 kHz: $65 \pm 5,0$ dB SPL; 12 kHz: $42,5 \pm 7,5$ dB SPL; 16 kHz: $54,2 \pm 16,6$ dB SPL; 20 kHz: $55 \pm 9,0$ dB SPL; 24 kHz: $65 \pm 9,0$ dB SPL (n=3). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei pmn-Mäusen folgende Schwellen gemessen: 4 kHz: $78,3 \pm 1,4$ dB SPL; 8 kHz: $43,3 \pm 1,4$ dB SPL; 12 kHz: $50 \pm 8,7$ dB SPL; 16 kHz: $52,5 \pm 7,5$ dB SPL; 20 kHz: $60 \pm 9,0$ dB SPL; 24 kHz: $55 \pm 15,6$ dB SPL (n=3).

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant niedrigere Schwellen auf als pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,01$ und 24 kHz: $p < 0,05$), als wt-Tiere, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 16 kHz: $p < 0,05$) und als pmn-Tiere ohne Injektionen (bei 20 kHz: $p < 0,05$), s. Abb. 3.

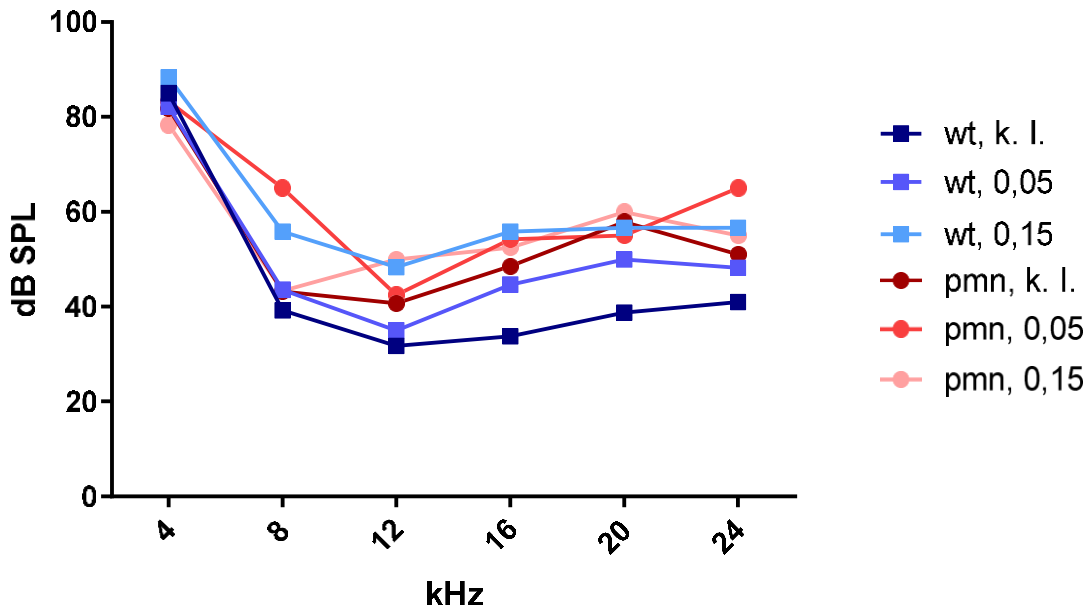


Abb. 2: Mittelwerte der DPOAE-Schwellen der untersuchten Gruppen (Alter: P21) bei sechs Frequenzen, mit Signifikanzen zwischen wt k.l. und pmn 0,05 bei 8 ($p < 0.01$) und 24 kHz ($p < 0.05$), zwischen wt k. l. und wt 0,15 bei 16 kHz ($p < 0.05$), zwischen wt k. l. und pmn k. l. bei 20 kHz ($p < 0.05$), k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1injiziert

4.1.1.2 Alter P28

Die wt-Tiere dieses Alters, die keine Injektionen erhielten, zeigen folgende Schwellen mit Standardabweichung für die einzelnen Frequenzen: 4 kHz: $83,3 \pm 3,7$ dB SPL; 8 kHz: $38,8 \pm 5,2$ dB SPL; 12 kHz: $39 \pm 6,6$ dB SPL; 16 kHz: $39 \pm 10,1$ dB SPL; 20 kHz: $44,8 \pm 10,6$ dB SPL; 24 kHz: $45,5 \pm 9,6$ dB SPL ($n=10$). Wt-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1injiziert wurde, weisen folgende Schwellen auf: 4 kHz: $77,9 \pm 13,2$ dB SPL; 8 kHz: $32,5 \pm 10,6$ dB SPL; 12 kHz: $30,7 \pm 6,1$ dB SPL; 16 kHz: $32,5 \pm 4,8$ dB SPL; 20 kHz: $38,6 \pm 7,3$ dB SPL; 24 kHz: $38,2 \pm 5,3$ dB SPL ($n=7$). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei wt-Mäusen folgende Schwellen gemessen: 4 kHz: $81,7 \pm 6,3$ dB SPL; 8 kHz: $38,3 \pm 1,4$ dB SPL; 12 kHz: $35,8 \pm 10,1$ dB SPL; 16 kHz: $39,2 \pm 14,4$ dB SPL; 20 kHz: $52,5 \pm 26,3$ dB SPL; 24 kHz: $49,2 \pm 8,0$ ($n=3$). Pmn-Mäuse, die keine Injektionen verabreicht bekamen, weisen folgende Schwellen auf: 4 kHz: $80,9 \pm 5,8$ dB SPL; 8 kHz: $59,1 \pm 17,1$ dB SPL; 12 kHz: $53,4 \pm 18,8$ dB SPL; 16 kHz: $63,1 \pm 17,7$ dB SPL; 20 kHz: $67,5 \pm 11,4$ dB SPL; 24 kHz: $57,2 \pm 15,6$ dB SPL ($n=8$). Pmn-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, zeigen folgende Schwellen: 4 kHz: $76,3 \pm 8,8$ dB SPL; 8 kHz: $56,3 \pm 11,3$ dB SPL; 12 kHz: $39,4 \pm 4,3$ dB SPL; 16 kHz: $46,9 \pm 4,3$ dB SPL; 20 kHz: $55,0 \pm 15,9$ dB SPL; 24 kHz: $54,4 \pm 14,2$ dB SPL ($n=4$). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei pmn-Mäusen folgende Schwellen gemessen: 4 kHz:

76,5 ± 4,5 dB SPL; 8 kHz: 70,0 ± 9,2 dB SPL; 12 kHz: 63,0 ± 9,3 dB SPL; 16 kHz: 66,0 ± 10,1 dB SPL; 20 kHz: 67,0 ± 14,7 dB SPL; 24 kHz: 71,0 ± 9,1 dB SPL (n=5).

Pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG peglGF-1 erhielten, weisen signifikant niedrigere Hörschwellen auf als pmn-Tiere, die 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert bekamen, (bei 12 kHz: $p < 0,05$). Bei wt-Tieren, die keine Injektionen erhielten, resultieren signifikant niedrigere Schwellen als bei pmn-Tieren ohne Injektionen (bei 8 kHz: $p < 0,01$; 16 kHz: $p < 0,0001$ und 20 kHz: $p < 0,001$) und bei pmn-Mäusen, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 erhielten (bei 8 kHz: $p < 0,0001$; bei 12 und 20 kHz: $p < 0,01$ und bei 16 und 24 kHz: $p < 0,001$), s. Abb. 4.

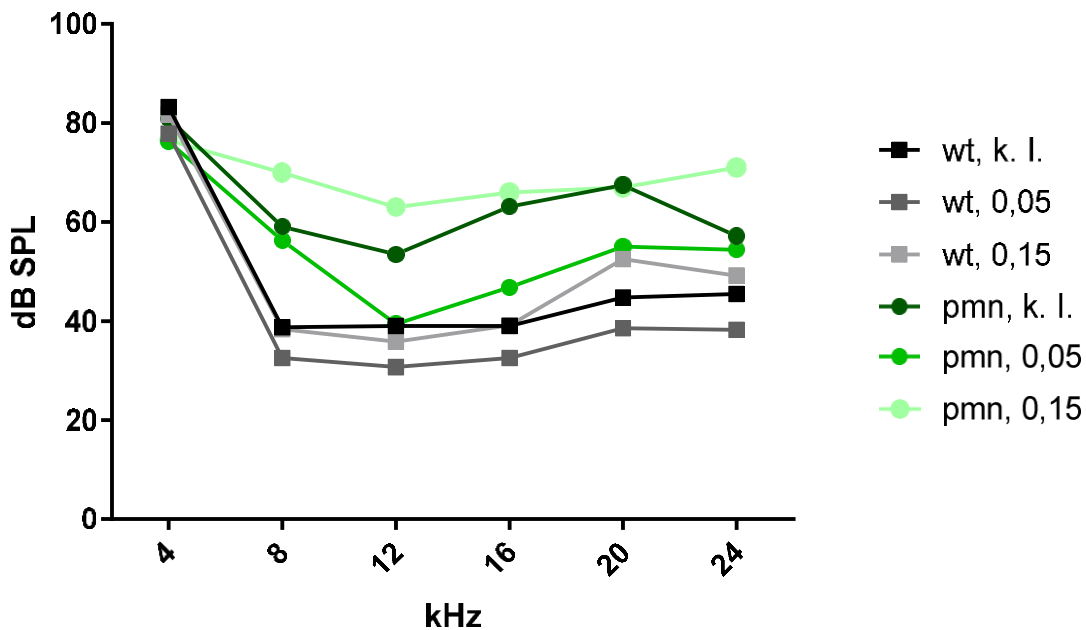


Abb. 3: Mittelwerte der DPOAE-Schwellen der untersuchten Gruppen (Alter: P28) bei sechs Frequenzen, mit Signifikanzen zwischen pmn 0,05 und pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,05$), zwischen wt, k. l. und pmn, k. l. bei 8 kHz ($p < 0,01$), bei 16 kHz ($p < 0,0001$), bei 20 kHz ($p < 0,001$), zwischen wt k.l. und pmn 0,15 bei 8 kHz ($p < 0,0001$), bei 12 und 20 kHz ($p < 0,01$), bei 16 und 24 kHz ($p < 0,001$). k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert

4.1.2 Evaluation der Anzahl der ÄHZ mittels immunhistochemischer Färbung von Wholamountpräparaten

In einem Alter von 21 Tagen zeigen sich bei wt-Tieren ohne Injektionen $64,9 \pm 7,9$ ($n=4$) ÄHZ. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 lassen sich $64 \pm 3,6$ ($n=3$) Haarzellen nachweisen. Erhielten wt-Mäuse Dosen von 0,15 mg/kg KG, ergibt sich ein Mittelwert von $57,6 \pm 6$ ($n=3$). Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, beobachtet man $27,7 \pm 6,2$ ($n=4$) ÄHZ. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich eine Anzahl von $36,5 \pm 1$ ($n=3$). Wurde den Tieren 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert, resultiert ein Wert von $47,4 \pm 1,8$ ($n=3$).

Bei wt-Mäusen ohne Injektionen beobachtet man signifikant mehr ÄHZ als bei pmn-Tieren ohne Injektionen ($p<0,0001$) und als bei pmn-Tieren, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten ($p<0,001$). Pmn-Mäuse, die 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen, weisen signifikant mehr ÄHZ auf als pmn-Tiere ohne Injektionen und welche, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten ($p<0,05$), s. Abb. 5 und Abb. 22-25 (S.56-59).

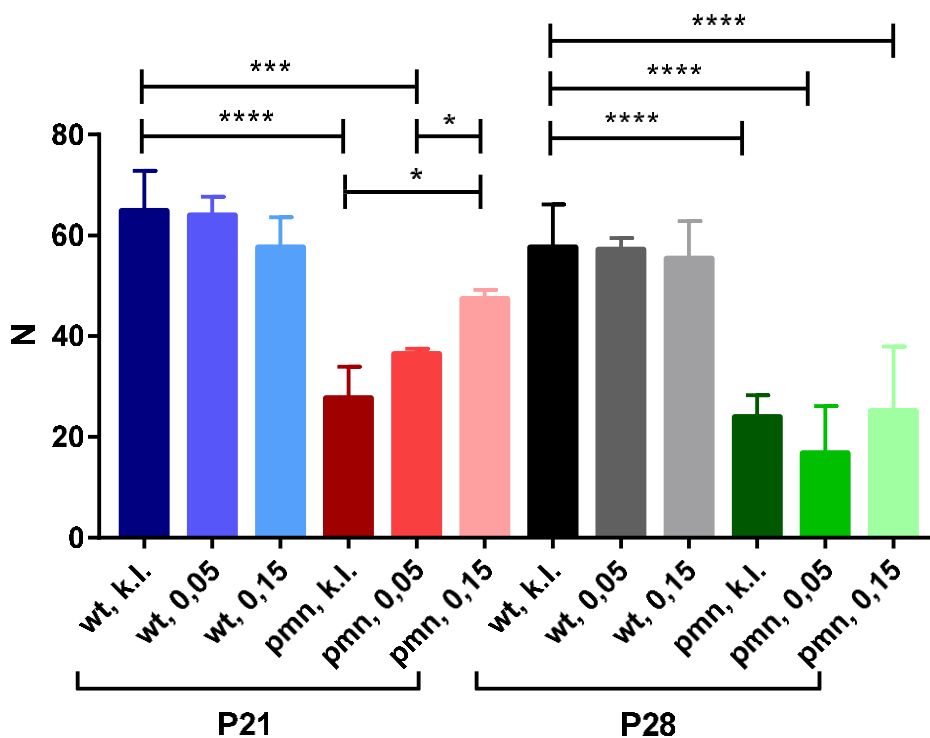


Abb. 4: Anzahl (N) der ÄHZ pro 100 µm der untersuchten Gruppen (Y-Achse), k.l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. Signifikanzen: * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$; **** = $p<0,0001$

An P28 zeigen sich bei wt-Tieren ohne Injektionen $57,6 \pm 8,5$ ($n=5$) ÄHZ. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 lassen sich $57,1 \pm 2,3$ ($n=3$) Haarzellen nachweisen. Erhielten wt-Mäuse Dosen von 0,15 mg/kg KG, ergibt sich ein Wert von $55,4 \pm 7,4$ ($n=3$). Bei pmn-Mäusen,

die keine Injektionen verabreicht bekamen, beobachtet man $24,0 \pm 4,3$ (n=4) ÄHZ. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich eine Anzahl von $16,8 \pm 9,3$ (n=3). Wurde den Tieren 0,15mg/kg KG pegIGF-1 injiziert, resultiert ein Wert von $25,2 \pm 12,8$ (n=3).

Bei wt-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lassen sich signifikant mehr ÄHZ nachweisen als bei allen gleichaltrigen pmn-Gruppen ($p < 0,0001$), s. Abb. 5 und Abb. 20-23 (S.).

4.2 Analyse der afferenten Hörbahn

4.2.1 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels Click-BERA

4.2.1.1 Hörschwelle

Am 21. postnatalen Tag beträgt die Hörschwelle der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, $43,5 \pm 4,7$ dB SPL (n=10). Die wt-Gruppe, der 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist eine Schwelle in der Höhe von $52,9 \pm 9,6$ dB SPL (n=7) auf. Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 zeigt sich bei den wt-Tieren ein Wert von $54,2 \pm 8,0$ dB (n=3). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen beobachtet man eine Hörschwelle von $59,3 \pm 6,7$ dB SPL (n=7). Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich bei pmn-Tieren eine Schwelle von $75,8 \pm 9,5$ dB SPL (n=3). Bei Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 resultiert ein Mittelwert von $62,5 \pm 13,9$ dB SPL (n=3).

Wt-Tiere ohne Injektionen weisen eine signifikant niedrigere Hörschwelle auf als pmn-Tiere ohne Injektionen ($p < 0,05$) und pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten ($p < 0,0001$). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen beobachtet man wiederum eine signifikant niedrigere Hörschwelle als bei der identischen Gruppe an P28 ($p < 0,001$), s. Abb. 6.

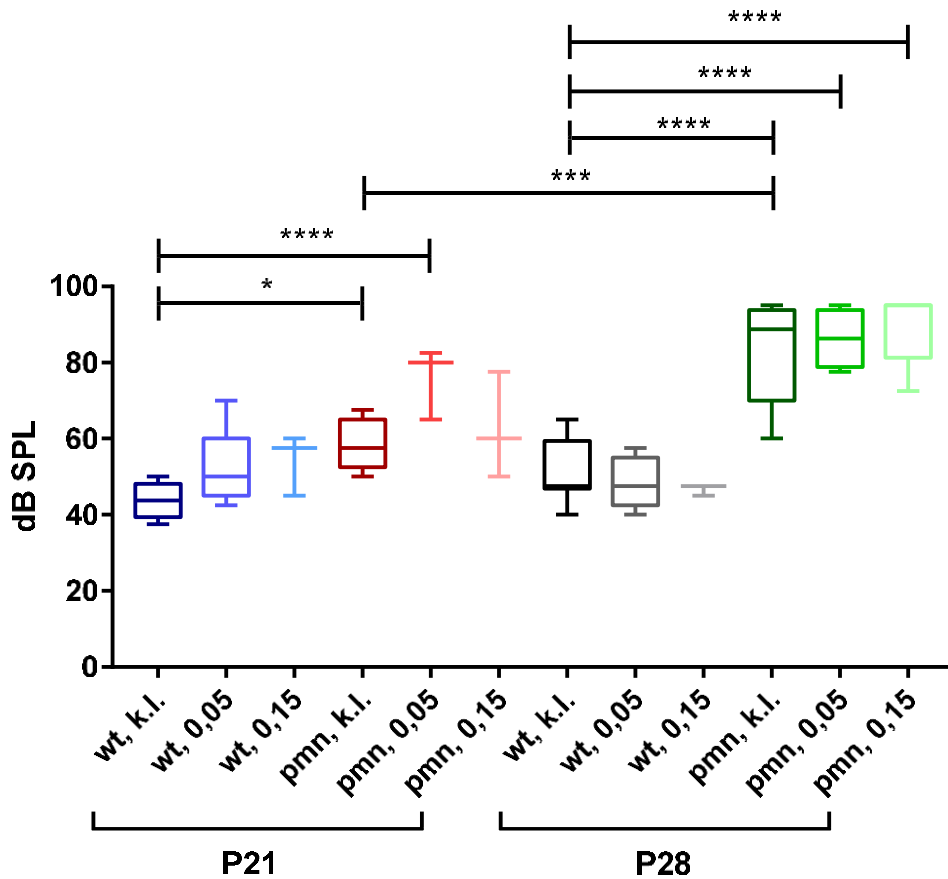


Abb. 5: Boxplots mit Min. und Max. Whiskers, Hörschwellen Click BERA der untersuchten Gruppen in dB SPL (Y-Achse), k.l. = keine Injektionen. 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

An P28 beträgt die Hörschwelle der wt-Mäuse ohne Injektionen $51,3 \pm 8,4$ dB SPL ($n=10$). Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 zeigt sich bei wt-Tieren eine Schwelle von $47,5 \pm 6,6$ dB SPL ($n=7$). Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist einen Wert von $46,7 \pm 1,4$ dB SPL ($n=3$) auf. Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen beobachtet man eine Hörschwelle von $83,4 \pm 13,4$ ($n=8$). Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 resultiert bei pmn-Tieren ein Wert von $86,3 \pm 7,8$ dB SPL ($n=4$). Bei Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich eine Schwelle von $89,5 \pm 9,7$ dB SPL ($n=5$).

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten, weisen eine signifikant niedrigere Hörschwelle als alle gleichaltrigen pmn-Gruppen auf ($p < 0,0001$), s. Abb. 6.

4.2.1.2 Evaluation der Latenz von Welle 2

Am 21. postnatalen Tag beträgt die Latenz der Welle 2 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, $2,8 \pm 0,2$ ms. Die wt-Gruppe, der 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist eine Latenz von $2,8 \pm 0,2$ ms auf. Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 zeigt sich bei den wt-Tieren ein Wert von $2,9 \pm 0,2$ ms. Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen beobachtet man eine Latenz von $3,0 \pm 0,1$ ms. Bei Dosen von 0,05 mg/kg KG ergibt sich bei pmn-Mäusen eine Latenz von $3,9 \pm 0,6$ ms. Bei Injektionen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 resultiert ein Mittelwert von $2,9 \pm 0,2$ ms.

Die Latenz der pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, ist signifikant länger als die von pmn-Mäusen ohne Injektionen, mit Injektionen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 (beide $p < 0,001$) und von wt-Tieren ohne Injektionen ($p < 0,0001$). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen beobachtet man außerdem eine signifikant kürzere Latenz als bei der gleichen Gruppe an P28 ($p < 0,0001$), s. Abb. 7.

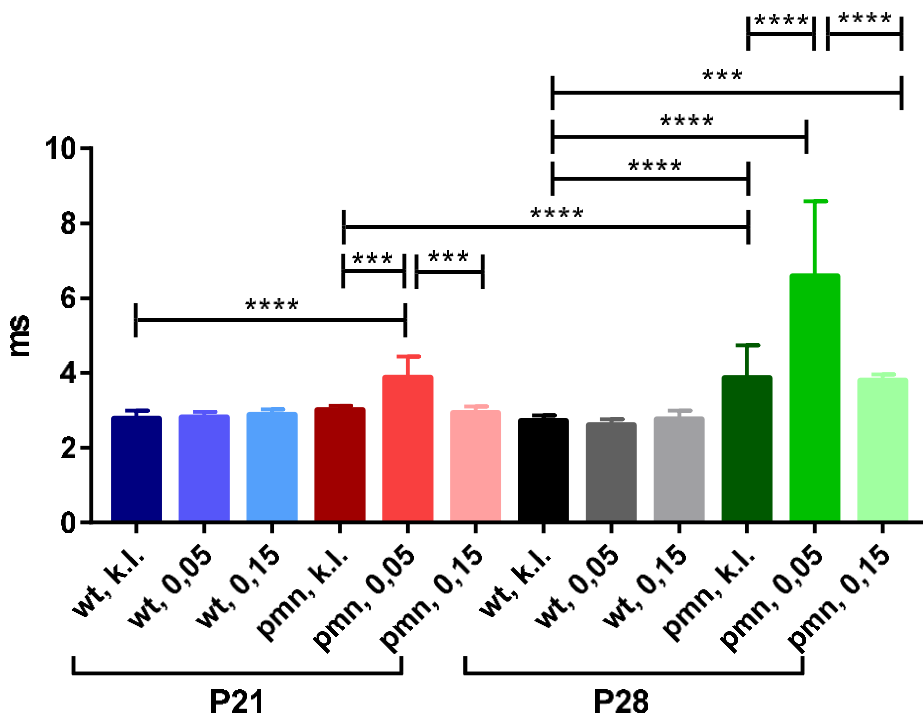


Abb. 6: Durchschnitt und Standardabweichung Latenz Welle 2 Click BERA in Millisekunden (Y-Achse) der untersuchten Gruppen bei SPLs von 30 bis 90 dB. k.l. = keine Injektionen. 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

An P28 beträgt die Latenz der wt-Mäuse ohne Injektionen $2,7 \pm 0,1$ ms. Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 zeigt sich bei wt-Tieren ein Mittelwert von $2,6 \pm 0,1$ ms. Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist eine Latenz von $2,8 \pm 0,2$ ms auf. Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen verabreicht bekamen, lässt sich eine Latenz der

zweiten Welle von $3,9 \pm 0,9$ ms nachweisen. Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 resultiert bei pmn-Tieren ein Wert von $6,6 \pm 2,0$ ms. Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich eine Latenz von $3,8 \pm 0,2$ ms.

Wt-Tiere ohne Injektionen weisen eine signifikant kürzere Latenz als alle pmn-Gruppen dieses Alters auf (ohne Injektionen und 0,05: $p < 0,0001$; 0,15: $p < 0,001$). Bei pmn-Mäusen, die 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen, lässt sich eine signifikant längere Latenz als bei pmn-Mäusen ohne Injektionen und denjenigen, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, nachweisen ($p < 0,0001$), s. Abb. 7.

Tab. 1: Mittelwerte der Latenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21. k. I. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. I. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. I. (n=7)	SD	pmn, 0,05 (n=3)	SD	pmn, 0,15 (n=3)	SD
90	2,6	0,2	2,6	0,2	2,8	0,1	2,8	0,4	3,5	1,5	2,7	0,2
85	2,7	0,2	2,7	0,2	2,8	0,1	3,0	0,6	3,9	1,8	2,7	0,2
80	2,7	0,2	2,7	0,2	2,8	0,1	3,0	0,8	3,1	0,1	2,8	0,2
75	2,7	0,2	2,8	0,2	2,8	0,1	3,1	0,9	3,5	0,5	2,9	0,2
70	2,7	0,3	2,8	0,3	2,9	0,2	3,0	0,4	3,9	0,9	3,0	0,1
65	2,8	0,3	2,9	0,3	2,9	0,2	3,1	0,5	4,2	0,8	3,0	0,1
60	2,8	0,3	3,0	0,3	2,9	0,1	3,0	0,2	4,1	0,8	3,1	0,1
55	3,3	1,5	3,1	0,5	3,2	0,5	3,1	0,2	4,9	1,2	3,2	0,1
50	3,1	0,6	3,3	0,5	3,0	0,0	3,4	0,4	4,6	1,4		
45	3,1	0,7	3,5	0,6	3,2	0,1	3,3	0,6	5,7	1,7		
40	3,3	0,8	3,6	0,8			6,6	1,9	8,1	1,2		
35	4,4	1,6	4,3	1,1								
30	4,3	0,4	4,9	0,9								

Tab. 2: Mittelwerte der Latenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28. k. I. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. I. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. I. (n=5)	SD	pmn, 0,05 (n=3)	SD	pmn, 0,15 (n=2)	SD
90	2,5	0,3	2,5	0,3	2,5	0,3	3,0	0,4	3,7	1,4	3,5	0,3
85	2,6	0,3	2,5	0,3	2,6	0,3	3,1	0,5	4,2	1,9	3,7	0,1
80	2,6	0,3	2,5	0,3	2,6	0,3	4,0	2,3	5,2	2,7		
75	2,7	0,3	2,5	0,3	2,7	0,3	4,5	2,5	6,8	1,9		
70	2,7	0,3	2,5	0,2	2,7	0,3	5,3	3,3	7,7	2,5		
65	2,8	0,5	2,7	0,7	2,7	0,3	4,6	3,1	7,4	2,5		
60	2,9	0,5	2,8	0,9	3,0	0,6	3,4	0,7	9,0	0,8		
55	2,9	0,5	2,8	0,7	3,3	1,0	3,1	0,3	8,7	0,6		
50	3,2	0,8	2,7	0,2	3,0	0,3						
45	3,3	0,9	2,8	0,2	2,9	0,3						
40	3,9	1,4	3,1	0,5	3,1	0,8						
35	5,8	2,3	4,1	1,0								
30	7,3	2,4	5,2	1,7								

4.2.1.3 Evaluation der Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2

Am 21. postnatalen Tag beträgt die Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, $1,2 \pm 0,06$ ms. Die wt-Gruppe, der 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist eine Differenz von $1,2 \pm 0,05$ ms auf. Bei Injektionen mit 0,15 mg /kg KG pegIGF-1 zeigt sich bei den wt-Tieren ein Wert von $1,2 \pm 0,03$ ms. Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lässt sich eine Latenzdifferenz von $1,2 \pm 0,08$ ms nachweisen. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich bei pmn-Tieren eine Differenz von $1,4 \pm 0,2$ ms. Bei Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 resultiert ein Mittelwert von $1,2 \pm 0,04$, ms.

Bei pmn-Tieren, die keine Injektionen erhielten, lassen sich signifikant kleinere Latenzdifferenzen als bei der gleichen Gruppe an P28 nachweisen ($p < 0,0001$), s. Abb. 8.

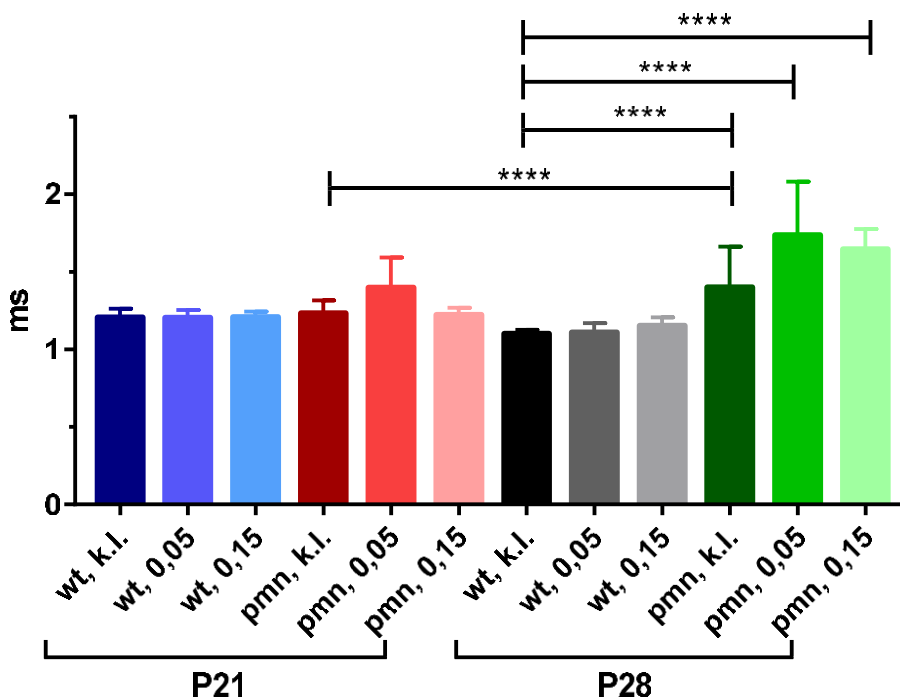


Abb. 7: Durchschnitt und Standardabweichung Latenzdifferenz Welle 1 und 2 bei Click BERA der untersuchten Gruppen in Millisekunden (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB. k.l. = keine Injektionen. 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert. Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

An P28 beträgt die Latenzdifferenz der wt-Mäuse ohne Injektionen $1,1 \pm 0,03$ ms. Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 zeigt sich bei wt-Tieren eine Differenz von $1,1 \pm 0,06$ ms. Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist einen Wert von $1,2 \pm 0,06$ ms auf. Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen verabreicht bekamen, lässt sich eine Latenzdifferenz von $1,4 \pm 0,26$ ms nachweisen. Durch Dosen von 0,05 mg/kg KG pegIGF-1

resultiert bei pmn-Tieren ein Wert von $1,7 \pm 0,35$ ms. Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich eine Differenz von $1,6 \pm 0,13$ ms.

Wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant kleinere Latenzdifferenzen als alle pmn-Gruppen auf ($p < 0,0001$), s. Abb 8.

Tab. 3: Mittelwerte der Latenzdifferenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21. k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. l. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. l. (n=7)	SD	pmn, 0,05 (n=3)	SD	pmn, 0,15 (n=3)	SD
90	1,2	0,1	1,2	0,1	1,3	0,1	1,2	0,2	1,2	0,1	1,3	0,2
85	1,3	0,1	1,2	0,1	1,2	0,0	1,3	0,2	1,6	0,3	1,2	0,0
80	1,2	0,1	1,2	0,1	1,2	0,0	1,2	0,2	1,1	0,1	1,2	0,0
75	1,2	0,1	1,2	0,1	1,2	0,0	1,2	0,2	1,3	0,2	1,2	0,1
70	1,2	0,1	1,3	0,3	1,2	0,0	1,2	0,2	1,3	0,1	1,2	0,0
65	1,1	0,1	1,2	0,1	1,2	0,1	1,2	0,2	1,6	0,8	1,2	0,1
60	1,1	0,1	1,2	0,1	1,2	0,1	1,2	0,1	1,3	0,3	1,3	0,0
55	1,3	0,3	1,1	0,2	1,2	0,1	1,2	0,1	1,5	0,7	1,3	0,1
50	1,3	0,2	1,2	0,3			1,4	0,4	1,7	0,0		
45	1,2	0,2	1,3	0,2			1,8	0,6	1,9	1,4		
40	1,3	0,2	1,4	0,2					2,9	0,5		
35	1,5	0,4	1,5	0,4								
30	1,4	0,1	1,2	0,6								

Tab. 4: Mittelwerte der Latenzdifferenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28. k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. l. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. l. (n=6)	SD	pmn, 0,05 (n=4)	SD	pmn, 0,15 (n=2)	SD
90	1,1	0,1	1,2	0,1	1,2	0,1	1,2	0,2	1,3	0,4	1,4	0,3
85	1,1	0,1	1,2	0,2	1,2	0,1	1,3	0,2	1,3	0,5	1,5	0,0
80	1,1	0,1	1,1	0,2	1,2	0,1	1,3	0,3	1,6	0,6	1,7	0,0
75	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,0	1,5	0,5	1,6	0,4	1,6	0,0
70	1,0	0,1	1,0	0,1	1,1	0,0	1,7	0,6	2,2	0,6		
65	1,1	0,1	1,1	0,2	1,1	0,1	1,7	0,7	1,9	0,4		
60	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,0	1,6	0,5	1,9	0,0		
55	1,1	0,1	1,1	0,2	1,3	0,2	1,2	0,2	2,1	0,2		
50	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,1						
45	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,2						
40	1,3	0,2	1,2	0,2	1,4	0,9						
35	1,5	0,4	1,6	0,3								
30	2,1	0,6	2,0	1,2								

4.2.1.4 Evaluation der Amplitude von Welle 1

Am 21. postnatalen Tag beträgt die Amplitude der Welle 1 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, $0,6 \pm 0,4 \mu\text{V}$. Die wt-Gruppe, der $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert wurde, weist eine Amplitude von $0,8 \pm 0,5 \mu\text{V}$ auf. Bei Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 zeigt sich bei den wt-Tieren ein Wert von $0,6 \pm 0,3 \mu\text{V}$. Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lässt sich eine Amplitude von $0,6 \pm 0,3 \mu\text{V}$ nachweisen. Bei Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 ergibt sich bei pmn-Tieren eine Amplitude von $0,3 \pm 0,1 \mu\text{V}$. Bei Dosen von $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 resultiert ein Mittelwert von $0,8 \pm 0,6 \mu\text{V}$.

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten ($p < 0,001$), pmn-Mäuse ohne Injektionen ($p < 0,01$) und pmn-Mäuse, die Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 ($p < 0,001$) erhielten, weisen signifikant höhere Amplituden auf als pmn-Mäuse, die Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 verabreicht bekamen. Pmn-Mäuse ohne Injektionen zeigen signifikant höhere Amplituden als die gleiche Gruppe an P28 ($p < 0,001$), s. Abb. 9.

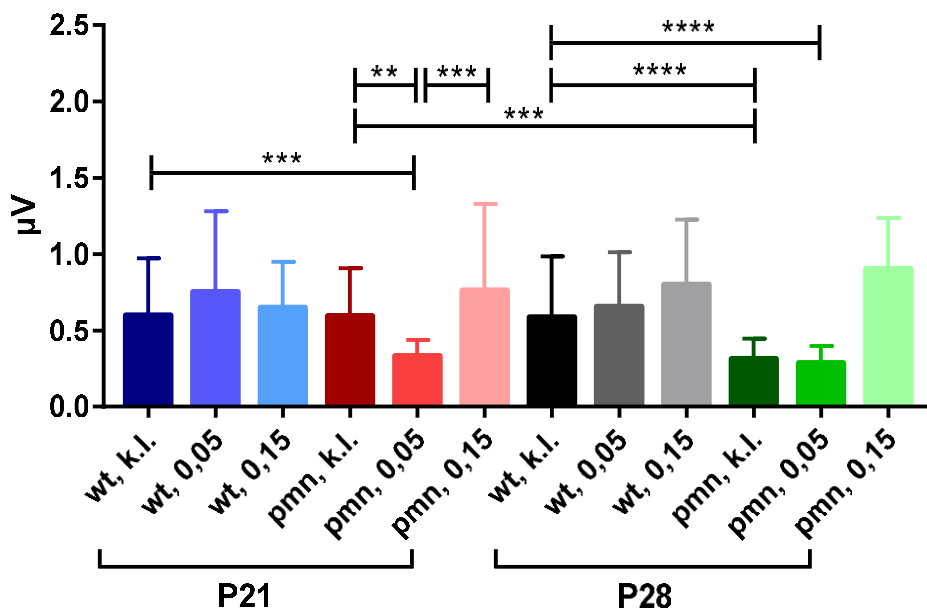


Abb. 8: Durchschnitt und Standardabweichung Amplitude Welle 1 in Mikrovolt (Y-Achse) Click BERA der untersuchten Gruppen bei SPL von 30–90 dB. k.i. = keine Injektionen; 0,05 = $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert; 0,15 = $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert; Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

An P28 beträgt die Amplitude der wt-Mäuse ohne Injektionen $0,6 \pm 0,4 \mu\text{V}$. Durch Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 zeigt sich bei wt-Tieren eine Amplitude von $0,7 \pm 0,4 \mu\text{V}$. Die wt-Gruppe, der $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert wurde, weist einen Wert von $0,8 \pm 0,4 \mu\text{V}$ auf. Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lässt sich eine Amplitude von $0,3 \pm 0,1 \mu\text{V}$ nachweisen. Durch Dosen von $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 resultiert bei pmn-Tieren ein Wert

von $0,3 \pm 0,1 \mu\text{V}$. Bei Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 ergibt sich eine Amplitude von $0,9 \pm 0,3 \text{ ms}$.

Wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant höhere Amplituden auf als pmn-Tiere ohne Injektionen und welche, die Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 verabreicht bekamen ($p < 0,0001$), s. Abb. 9.

Tab. 5: Mittelwerte der Amplitude von Welle 1 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21. k. l. = keine Injektionen; 0,05 = $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert; 0,15 = $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. l. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. l. (n=7)	SD	pmn, 0,05 (n=3)	SD	pmn, 0,15 (n=3)	SD
90	1,0	0,4	1,4	0,5	1,0	0,3	1,1	0,5	0,5	0,2	1,7	1,5
85	1,0	0,4	1,5	0,6	1,1	0,1	1,0	0,6	0,4	0,3	1,4	1,2
80	1,0	0,4	1,4	0,7	1,0	0,2	1,0	0,5	0,2	0,4	1,1	0,6
75	1,0	0,4	1,3	0,7	0,9	0,2	0,8	0,4	0,3	0,1	1,0	0,7
70	0,9	0,3	1,1	0,8	0,7	0,4	0,7	0,4	0,2	0,1	1,1	0,9
65	0,8	0,3	0,9	0,6	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3
60	0,7	0,3	0,6	0,4	0,6	0,2	0,6	0,4	0,4	0,4	0,5	0,2
55	0,5	0,2	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
50	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	0,0	0,3	0,2	0,4	0,0	0,2	0,0
45	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,0	0,3	0,1	0,4	0,0		
40	0,2	0,1	0,2	0,2			0,3	0,2	0,2	0,1		
35	0,1	0,1	0,2	0,1			0,2	0,0				
30	0,1	0,1	0,1	0,1								

Tab. 6: Mittelwerte der Amplitude von Welle 1 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28. k. l. = keine Injektionen; 0,05 = $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert; 0,15 = $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. l. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. l. (n=6)	SD	pmn, 0,05 (n=4)	SD	pmn, 0,15 (n=2)	SD
90	1,1	0,5	1,0	0,4	1,3	0,8	0,5	0,4	0,3	0,3	0,7	0,5
85	1,1	0,5	1,0	0,4	1,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1	0,8	0,0
80	1,0	0,5	1,0	0,4	1,2	0,7	0,4	0,2	0,2	0,1	1,4	0,0
75	0,9	0,4	1,0	0,4	1,1	0,8	0,1	0,1	0,1	0,0	1,2	0,0
70	0,9	0,4	1,0	0,4	1,1	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,9	0,0
65	0,7	0,4	0,9	0,3	0,6	0,3	0,3	0,2	0,5	0,4		
60	0,7	0,3	0,7	0,2	0,9	0,6	0,3	0,2	0,4	0,0		
55	0,4	0,3	0,5	0,2	0,5	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2		
50	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	0,0				
45	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,1	0,0				
40	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1						
35	0,0	0,0	0,4	0,5								
30	0,1	0,1	0,2	0,1								

4.2.1.5 Evaluation der Amplitude von Welle 2

Am 21. postnatalen Tag beträgt die Amplitude der Welle 2 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, $1,3 \pm 0,8 \mu\text{V}$. Die wt-Gruppe, der $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert wurde, weist eine Amplitude von $1,4 \pm 1,0 \mu\text{V}$ auf. Bei Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 zeigt sich bei den wt-Tieren ein Wert von $1,4 \pm 0,4 \mu\text{V}$. Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lässt sich eine Amplitude von $1,1 \pm 0,6 \mu\text{V}$ nachweisen. Bei Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 ergibt sich bei pmn-Tieren eine Amplitude von $0,7 \pm 0,4 \mu\text{V}$. Bei Dosen von $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 resultiert ein Mittelwert von $1,2 \pm 0,7 \mu\text{V}$.

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant höhere Amplituden auf als pmn-Tiere ohne Injektionen ($p < 0,05$) und pmn-Tiere, die Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 verabreicht bekamen ($p < 0,0001$). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich wiederum signifikant höhere Amplituden als bei der gleichen Gruppe an P28 nachweisen ($p < 0,001$), s. Abb. 10.

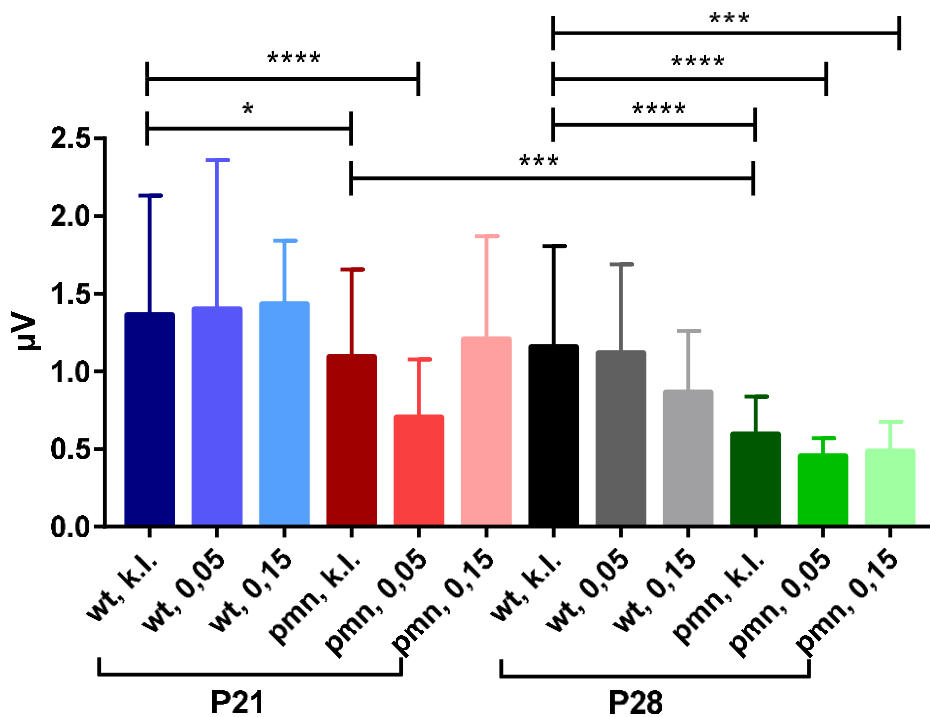


Abb. 9: Durchschnitt und Standardabweichung Amplitude Welle 2 Click BERA in Mikrovolt (Y-Achse) der untersuchten Gruppen bei SPL von 30–90 dB. k.l. = keine Injektionen; 0,05 = $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert; 0,15 = $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert. Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

An P28 beträgt die Amplitude der wt-Mäuse ohne Injektionen $1,2 \pm 0,6 \mu\text{V}$. Durch Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 zeigt sich bei wt-Tieren eine Amplitude von $1,1 \pm 0,6 \mu\text{V}$. Die wt-Gruppe, der $0,15 \text{ mg/kg KG}$ pegIGF-1 injiziert wurde, weist einen Wert von $0,9 \pm 0,4 \mu\text{V}$ auf. Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lässt sich eine Amplitude von $0,6 \pm 0,2 \mu\text{V}$

nachweisen. Durch Dosen von 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 resultiert bei pmn-Tieren ein Wert von $0,5 \pm 0,1 \mu\text{V}$. Bei Injektionen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich ein Mittelwert von $0,5 \pm 0,2 \mu\text{V}$.

Wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant höhere Amplituden als alle pmn-Gruppen dieses Alters auf (ohne Injektionen und mit 0,05: $p < 0,0001$; mit 0,15: $p < 0,001$), s. Abb. 10.

Tab. 7: Mittelwerte der Amplitude von Welle 2 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21. k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. l. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. l. (n=7)	SD	pmn, 0,05 (n=3)	SD	pmn, 0,15 (n=3)	SD
90	2,2	0,7	2,8	1,0	2,0	0,2	1,8	0,6	1,3	0,6	1,4	0,8
85	2,2	0,7	2,6	1,1	1,8	0,2	1,5	0,5	1,2	0,6	1,9	0,4
80	2,1	0,7	2,5	1,2	1,8	0,4	1,7	0,4	1,2	0,3	1,8	0,4
75	2,0	0,7	2,2	1,4	1,6	0,7	1,6	0,5	1,0	0,6	2,0	0,4
70	1,9	0,8	1,9	1,2	1,6	0,7	1,5	0,6	0,6	0,6	1,8	0,5
65	1,8	0,8	1,6	1,2	1,3	0,5	1,2	0,7	0,5	0,4	1,2	0,2
60	1,6	0,7	1,4	1,0	1,2	0,8	1,2	0,5	0,6	0,4	0,8	0,5
55	1,3	0,7	1,1	0,9	1,3	1,0	0,9	0,5	0,4	0,2	0,7	0,2
50	1,1	0,5	0,8	0,6	1,2	0,0	0,8	0,7	0,3	0,0	0,3	0,0
45	0,7	0,3	0,6	0,7			0,5	0,3	0,4	0,1		
40	0,4	0,1	0,3	0,4			0,3	0,1	0,3	0,1		
35	0,2	0,0	0,1	0,2								
30	0,2	0,1	0,2	0,0								

Tab. 8: Mittelwerte der Amplitude von Welle 2 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28. k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

dB SPL	wt, k. l. (n=10)	SD	wt, 0,05 (n=7)	SD	wt, 0,15 (n=3)	SD	pmn, k. l. (n=6)	SD	pmn, 0,05 (n=4)	SD	pmn, 0,15 (n=2)	SD
90	1,9	0,8	1,6	0,2	1,3	0,6	0,7	0,4	0,6	0,2	0,4	0,1
85	1,9	0,9	1,5	0,4	1,0	1,2	0,8	0,6	0,5	0,3	0,4	0,0
80	1,8	0,9	1,5	0,5	1,1	0,9	1,0	0,7	0,3	0,0	0,7	0,0
75	1,6	0,9	1,5	0,7	1,4	0,2	0,7	0,4	0,4	0,0	0,7	0,0
70	1,7	0,8	1,7	0,6	1,2	0,5	0,6	0,4	0,6	0,3		
65	1,5	0,8	1,5	0,5	0,8	0,6	0,4	0,2	0,4	0,0		
60	1,5	0,8	1,5	0,4	0,8	0,3	0,7	0,3	0,4	0,2		
55	1,2	0,8	1,4	0,4	0,8	0,2	0,3	0,3	0,5	0,2		
50	0,9	0,6	1,1	0,3	0,6	0,2	0,3	0,0				
45	0,6	0,4	0,7	0,2	0,4	0,4						
40	0,4	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1						
35	0,2	0,1	0,2	0,1								
30	0,2	0,1	0,2	0,1								

4.2.2 Audiologische Evaluation der verwendeten Mauslinien mittels BERA zwischen 4 und 24 kHz

4.2.2.1 Hörschwellen

4.2.2.1.1 Alter P21

Die wt-Tiere dieses Alters, die keine Injektionen erhielten, zeigen folgende Hörschwellen mit Standardabweichung für die einzelnen Frequenzen: 4 kHz: $88,8 \pm 7,9$ dB SPL; 8 kHz: $63,5 \pm 14,5$ dB SPL; 12 kHz: $57,3 \pm 9,2$ dB SPL; 16 kHz: $52,8 \pm 12,9$ dB SPL; 20 kHz: $50 \pm 12,2$ dB SPL; 24 kHz: $54,0 \pm 17,9$ dB SPL (n=10). Wt-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weisen folgende Hörschwellen auf: 4 kHz: $88,2 \pm 7,2$ dB SPL; 8 kHz: $73,2 \pm 11,0$ dB SPL; 12 kHz: $62,5 \pm 9,0$ dB SPL; 16 kHz: $61,1 \pm 9,4$ dB SPL; 20 kHz: $52,5 \pm 9,4$ dB SPL; 24 kHz: $44,6 \pm 11,1$ dB SPL (n=7). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei wt-Mäusen folgende Hörschwellen gemessen: 4 kHz: $83,3 \pm 5,2$ dB SPL; 8 kHz: $59,2 \pm 11,5$ dB SPL; 12 kHz: $62,5 \pm 9,0$ dB SPL; 16 kHz: $57,5 \pm 13,2$ dB SPL; 20 kHz: $50,8 \pm 14,6$ dB SPL; 24 kHz: $49,2 \pm 18,4$ dB SPL (n=3). Pmn-Mäuse ohne Injektionen weisen folgende Hörschwellen auf: 4 kHz: $86,4 \pm 5,4$ dB SPL; 8 kHz: $55,7 \pm 6,6$ dB SPL; 12 kHz: $62,5 \pm 9,1$ dB SPL; 16 kHz: $62,5 \pm 20,5$ dB SPL; 20 kHz: $70,7 \pm 19,3$ dB SPL; 24 kHz: $76,1 \pm 16,1$ dB SPL (n=7). Pmn-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, zeigen folgende Hörschwellen: 4 kHz: $95 \pm 0,0$ dB SPL; 8 kHz: $84,2 \pm 7,2$ dB SPL; 12 kHz: $87,5 \pm 7,5$ dB SPL; 16 kHz: $86,7 \pm 8,8$ dB SPL; 20 kHz: $93,3 \pm 2,9$ dB SPL; 24 kHz: $87,5 \pm 7,5$ dB SPL (n=3). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei pmn-Mäusen folgende Hörschwellen gemessen: 4 kHz: $84,2 \pm 12,8$ dB SPL; 8 kHz: $61,7 \pm 15,1$ dB SPL; 12 kHz: $62,5 \pm 10,9$ dB SPL; 16 kHz: $68,3 \pm 7,6$ dB SPL; 20 kHz: $79,2 \pm 12,3$ dB SPL; 24 kHz: $84,2 \pm 3,8$ dB SPL (n=3).

Pmn-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant niedrigere Hörschwellen als pmn-Mäuse auf, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,01$; bei 12 und 16 kHz: $p < 0,05$). Wt-Mäuse ohne Injektionen zeigen signifikant niedrigere Hörschwellen als pmn-Tiere, die keine Injektionen erhielten (bei 20 und 24 kHz: $p < 0,01$), als pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 12 kHz: $p < 0,01$; bei 16 und 24 kHz: $p < 0,001$; bei 20 kHz: $p < 0,0001$) und als pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 20 und 24 kHz: $p < 0,01$), s. Abb. 11.

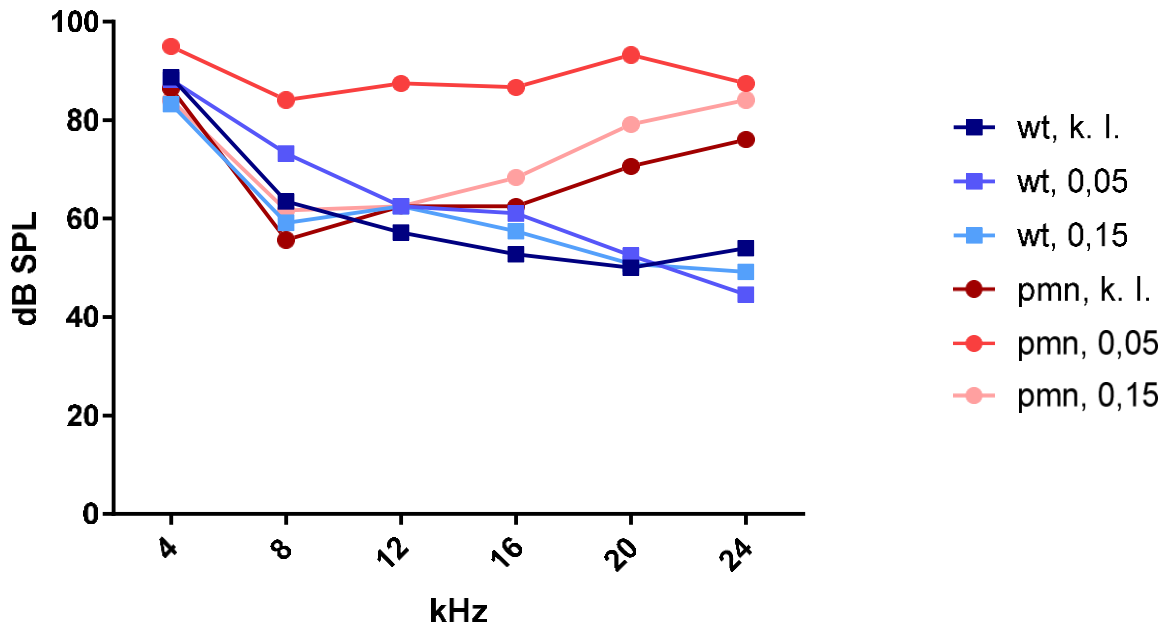


Abb. 10: Mittelwerte der Hörschwellen BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen (P21) bei sechs Frequenzen in dB SPL (Y-Achse) mit Signifikanzen zwischen pmn, k. l. und pmn 0,05 bei 8 kHz ($p < 0,01$), bei 12 und 16 kHz ($p < 0,05$), zwischen wt k. l. und pmn k.l. bei 20 und 24 kHz ($p < 0,01$), zwischen wt k.l. und pmn 0,05 bei 12 kHz ($p < 0,01$), bei 16 und 24 kHz ($p < 0,001$), bei 20 kHz ($p < 0,0001$), zwischen wt k. l. und pmn 0,15 bei 20 und 24 kHz ($p < 0,01$). k. l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert

4.2.2.1.2 Alter P28

Die wt-Tiere dieses Alters, die keine Injektionen erhielten, zeigen folgende Hörschwellen mit Standardabweichung für die einzelnen Frequenzen: 4 kHz: $89 \pm 4,9$ dB SPL; 8 kHz: $69,8 \pm 16,7$ dB SPL; 12 kHz: $67,5 \pm 13,9$ dB SPL; 16 kHz: $59,8 \pm 13,5$ dB SPL; 20 kHz: $54,3 \pm 18,1$ dB SPL; 24 kHz: $55,8 \pm 19,2$ dB SPL ($n=10$). Wt-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert wurde, weisen folgende Hörschwellen auf: 4 kHz: $90 \pm 7,2$ dB SPL; 8 kHz: $73,6 \pm 15,7$ dB SPL; 12 kHz: $62,9 \pm 10,7$ dB SPL; 16 kHz: $60,7 \pm 11,8$ dB SPL; 20 kHz: $55,4 \pm 9,6$ dB SPL; 24 kHz: $48,9 \pm 12,1$ dB SPL ($n=7$). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 werden bei wt-Mäusen folgende Hörschwellen gemessen: 4 kHz: $88,3 \pm 5,2$ dB SPL; 8 kHz: $69,2 \pm 11,3$ dB SPL; 12 kHz: $62,5 \pm 6,6$ dB SPL; 16 kHz: $55,0 \pm 9,0$ dB SPL; 20 kHz: $60,0 \pm 13,0$ dB SPL; 24 kHz: $65,0 \pm 26,0$ ($n=3$). Pmn-Mäuse, die keine Injektionen verabreicht bekamen, weisen folgende Hörschwellen auf: 4 kHz: $95,0 \pm 0,0$ dB SPL; 8 kHz: $86,6 \pm 9,2$ dB SPL; 12 kHz: $88,8 \pm 8,9$ dB SPL; 16 kHz: $88,1 \pm 5,5$ dB SPL; 20 kHz: $90,6 \pm 4,2$ dB SPL; 24 kHz: $87,5 \pm 5,7$ dB SPL ($n=8$). Pmn-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert wurde, zeigen folgende Hörschwellen: 4 kHz: $94,4 \pm 1,3$ dB SPL; 8 kHz: $89,4 \pm 6,6$ dB SPL; 12 kHz: $93,8 \pm 2,5$ dB

SPL; 16 kHz: $89,4 \pm 3,1$ dB SPL; 20 kHz: $91,9 \pm 2,4$ dB SPL; 24 kHz: $86,9 \pm 3,8$ dB SPL (n=4).
 Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 werden bei pmn-Mäusen folgende Hörschwellen gemessen: 4 kHz: $95,0 \pm 0,0$ dB SPL; 8 kHz: $83,5 \pm 3,8$ dB SPL; 12 kHz: $91,0 \pm 2,9$ dB SPL; 16 kHz: $87,0 \pm 4,1$ dB SPL; 20 kHz: $91,0 \pm 5,2$ dB SPL; 24 kHz: $87,0 \pm 3,3$ dB SPL (n=5).

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant niedrigere Hörschwellen auf als pmn-Mäuse ohne Injektionen (bei 8 kHz: $p < 0,05$; bei 12 kHz: $p < 0,001$; bei 16, 20, 24 kHz: $p < 0,0001$), als pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,05$; bei 12 kHz: $p < 0,001$; bei 16, 20 und 24 kHz: $p < 0,0001$) und als pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 12 kHz: $p < 0,01$; bei 16 kHz: $p < 0,001$; bei 20 und 24 kHz: $p < 0,0001$), s. Abb. 12.

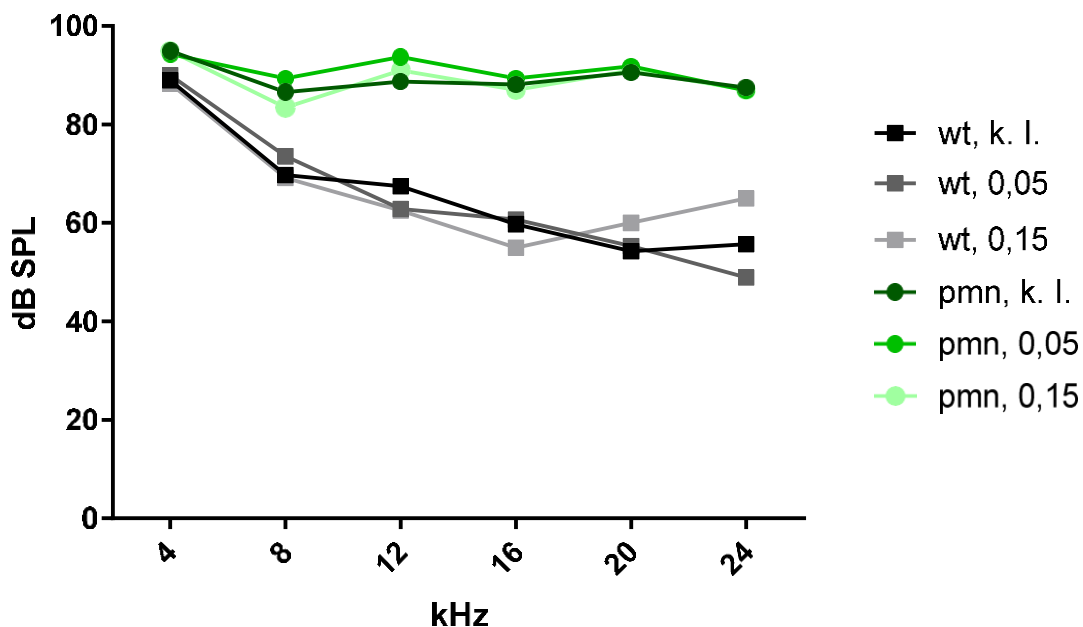


Abb. 11: Mittelwerte der Hörschwellen BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen (P28) bei sechs Frequenzen in dB SPL (Y-Achse) mit Signifikanzen zwischen wt k. I. und pmn k. I. bei 8 kHz ($p < 0,05$), bei 12 kHz ($p < 0,001$) und bei 16, 20, 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen wt k. I. und pmn 0,05 bei 8 kHz ($p < 0,05$), bei 12 kHz ($p < 0,001$), bei 16, 20 und 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen wt k. I. und pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,01$), bei 16 kHz ($p < 0,001$), bei 20 und 24 kHz ($p < 0,0001$). k. I. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert

4.2.2.2 Evaluation der Latenz von Welle 2

Am 21. postnatalen Tag betragen die Latenzen der Welle 2 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten: bei 8 kHz Input: $3,6 \pm 0,2$ ms (n=10); 12 kHz: $3,4 \pm 0,2$ (n=10); 16 kHz: $3,2 \pm 0,2$ (n=10); 20 kHz: $3,2 \pm 0,1$ (n=10); 24 kHz: $3,2 \pm 0,2$ (n=10). Die wt-Gruppe, der 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist folgende Werte auf: bei 8 kHz Input: $3,7 \pm 0,2$ ms (n=6); 12 kHz: $3,7 \pm 0,9$ (n=7); 16 kHz: $3,4 \pm 0,4$ (n=7); 20 kHz: $3,5 \pm 0,4$ (n=7); 24 kHz: $3,2 \pm 0,2$ (n=6). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 zeigen sich bei den wt-Tieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $3,8 \pm 0,2$ ms (n=3); 12 kHz: $3,6 \pm 0,1$ (n=3); 16 kHz: $3,4 \pm 0,1$ (n=3); 20 kHz: $3,4 \pm 0,11$ (n=3); 24 kHz: $3,3 \pm 0,1$ (n=3). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich folgende Latenzen nachweisen: bei 8 kHz Input: $3,8 \pm 0,4$ ms (n=7); 12 kHz: $3,6 \pm 0,4$ (n=7); 16 kHz: $3,7 \pm 0,5$ (n=6); 20 kHz: $3,9 \pm 0,5$ (n=7); 24 kHz: $4,0 \pm 0,5$ (n=7). Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergeben sich bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $3,8 \pm 0,02$ ms (n=2); 12 kHz: $4,1 \pm 0,7$ (n=2); 16 kHz: $4,3 \pm 0,6$ (n=2); 20 kHz: -; 24 kHz: $4,3$ (n=1). Bei Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 resultieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $3,6 \pm 0,1$ ms (n=3); 12 kHz: $3,4 \pm 0,04$ (n=3); 16 kHz: $3,5 \pm 0,4$ (n=3); 20 kHz: $3,7 \pm 0,7$ (n=3); 24 kHz: $3,9 \pm 0,7$ (n=3).

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant kürzere Latenzen auf als pmn-Mäuse ohne Injektionen (bei 24 kHz: $p < 0,0001$), als pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 12, 16 und 24 kHz: $p < 0,0001$) und als pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 24 kHz: $p < 0,0001$). Pmn-Tiere ohne Injektionen zeigen signifikant kürzere Latenzen als pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 12 und 16 kHz: $p < 0,0001$) und als pmn-Mäuse ohne Injektionen an P28 (bei 8, 16 und 20 kHz: $p < 0,0001$). Bei pmn-Mäusen, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, lassen sich signifikant längere Latenzen als bei pmn-Tieren, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen, nachweisen (bei 12 kHz: $p < 0,0001$; bei 16 kHz: $p < 0,001$), s. Abb. 13.

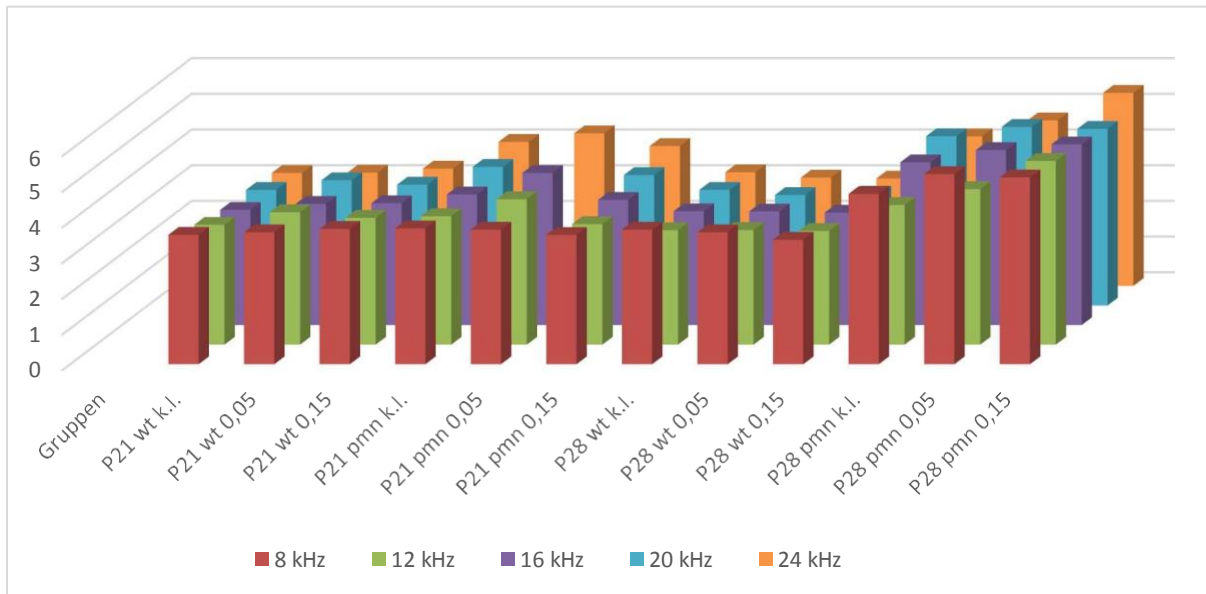


Abb. 12: Durchschnitt Latenzen Welle 2 BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Millisekunden (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB mit Signifikanzen zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn k. l. bei 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn 0,05 bei 12, 16 und 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn 0,15 bei 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P21 pmn k. l. und P21 pmn 0,05 bei 12 und 16 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P21 pmn 0,05 und P21 pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,0001$), bei 16 kHz ($p < 0,001$), zwischen P21 pmn k. l. und P28 pmn k. l. bei 8, 16 und 20 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P28 wt k. l. und P28 pmn k. l. bei 8, 16, 20 und 24 kHz ($p < 0,0001$), bei 12 kHz ($p < 0,01$), zwischen P28 wt k. l. und P28 pmn 0,05 bei 8, 16, 20 und 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P28 wt k. l. und P28 pmn 0,15 bei 8, 12, 16, 20 und 24 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P28 pmn k. l. und P28 pmn 0,05 bei 8 kHz ($p < 0,05$), zwischen P28 pmn k. l. und P28 pmn 0,15 bei 12 und 24 kHz ($p < 0,0001$). k. l. = keine Injektionen. 0,05 = 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert

An P28 betragen die Latenzen der wt-Mäuse ohne Injektionen: bei 8 kHz Input: $3,8 \pm 0,5$ ms ($n=9$); 12 kHz: $3,2 \pm 0,2$ ($n=9$); 16 kHz: $3,2 \pm 0,2$ ($n=10$); 20 kHz: $3,2 \pm 0,3$ ($n=10$); 24 kHz: $3,2 \pm 0,2$ ($n=10$). Durch Injektionen mit 0,05 mg/ kg KG peglGF-1 zeigen sich bei wt-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $3,7 \pm 0,5$ ms ($n=6$); 12 kHz: $3,2 \pm 0,3$ ($n=7$); 16 kHz: $3,2 \pm 0,4$ ($n=7$); 20 kHz: $3,1 \pm 0,3$ ($n=7$); 24 kHz: $3,0 \pm 0,3$ ($n=7$). Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert wurde, weist folgende Mittelwerte auf: bei 8 kHz Input: $3,5 \pm 0,2$ ms ($n=3$); 12 kHz: $3,2 \pm 0,1$ ($n=3$); 16 kHz: $3,2 \pm 0,2$ ($n=3$); 20 kHz: $3,1 \pm 0,2$ ($n=3$); 24 kHz: $3,0 \pm 0,1$ ($n=2$). Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lassen sich folgende Latenzen nachweisen: bei 8 kHz Input: $4,8 \pm 1,0$ ms ($n=5$); 12 kHz: $3,9 \pm 1,0$ ($n=4$); 16 kHz: $4,6 \pm 0,5$ ($n=6$); 20 kHz: $4,7 \pm 0,9$ ($n=5$); 24 kHz: $4,2 \pm 0,5$ ($n=7$). Durch Dosen von 0,05 mg/kg KG peglGF-1 resultieren bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $5,3 \pm 0,6$ ms ($n=3$); 12 kHz: $4,4$ ($n=1$); 16 kHz: $4,9 \pm 0,7$ ($n=4$); 20 kHz: $5,0 \pm 0,8$ ($n=2$); 24 kHz: $4,6 \pm 0,5$ ($n=4$). Bei Injektionen von 0,15 mg/kg KG peglGF-1 ergeben sich folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $5,2 \pm 0,7$ ms ($n=5$); 12 kHz: $5,1 \pm 0,9$ ($n=4$); 16 kHz: $5,1 \pm 0,7$ ($n=5$); 20 kHz: $5,0 \pm 0,3$ ($n=3$); 24 kHz: $5,4 \pm 0,8$ ($n=5$).

Wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, zeigen signifikant kürzere Latenzen als pmn-Mäuse ohne Injektionen (bei 8, 16, 20 und 24 kHz: $p < 0,0001$; bei 12 kHz: $p < 0,01$), als pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 8, 16, 20 und 24 kHz: $p < 0,0001$), und als pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 8, 12, 16, 20 und 24 kHz: $p < 0,0001$). Pmn-Mäuse ohne Injektionen weisen signifikant kürzere Latenzen auf als pmn-Tiere, die 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,05$), und als pmn-Mäuse die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten (bei 12 und 24 kHz: $p < 0,0001$), s. Abb. 13.

4.2.2.3 Evaluation der Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2

Am 21. postnatalen Tag betragen die Latenzdifferenzen zwischen Welle 1 und 2 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,1$ (n=10); 12 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=10); 16 kHz $1,3 \pm 0,1$ (n=10); 20 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=10); 24 kHz $1,3 \pm 0,1$ (n=10). Die wt-Gruppe, der 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist folgende Differenzen auf: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,2$ (n=6); 12 kHz: $1,5 \pm 0,2$ (n=7); 16 kHz: $1,4 \pm 0,2$ (n=7); 20 kHz: $1,4 \pm 0,1$ (n=7); 24 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=6). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 zeigen sich bei den wt-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $1,6 \pm 0,1$ (n=3); 12 kHz: $1,5 \pm 0,0$ (n=3); 16 kHz: $1,4 \pm 0,1$ (n=3); 20 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=3); 24 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=3). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich folgende Latenzdifferenzen nachweisen: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,2$ (n=7); 12 kHz: $1,3 \pm 0,2$ (n=7); 16 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=6); 20 kHz: $1,3 \pm 0,2$ (n=7); 24 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=7). Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergeben sich bei pmn-Tieren folgende Differenzen: bei 8 kHz Input: $1,1 \pm 0,1$ (n=2); 12 kHz: $1,1 \pm 0,1$ (n=2); 16 kHz: $1,1 \pm 0,0$ (n=2); 20 kHz: -; 24 kHz: $1,6$ (n=1). Bei Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 resultieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,2$ (n=3); 12 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=3); 16 kHz $1,2 \pm 0,1$ (n=3); 20 kHz: $1,1 \pm 0,1$ (n=3); 24 kHz: $1,2 \pm 0,2$ (n=3).

Pmn-Mäuse, die 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen, zeigen bei einer Frequenz von 24 kHz eine signifikant größere Latenzdifferenz als wt-Tiere ohne Injektionen, pmn-Mäuse ohne Injektionen und pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten ($p < 0,01$), s. Abb. 14.

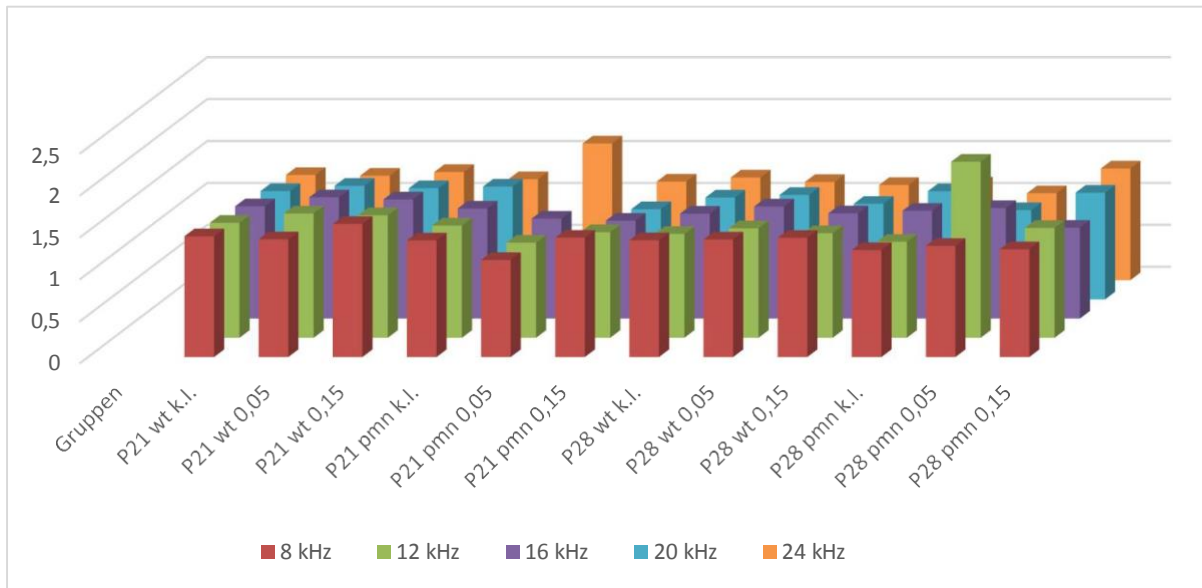


Abb. 13: Durchschnitt Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2 BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Millisekunden (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB mit Signifikanzen zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn 0,05 bei 24 kHz ($p < 0,01$), zwischen P21 pmn k. l. und P21 pmn 0,05 bei 24 kHz ($p < 0,01$), zwischen P21 pmn 0,05 und P21 pmn 0,15 bei 24 kHz ($p < 0,01$), zwischen P28 pmn k. l. und P28 pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,01$), zwischen P28 pmn 0,05 und P28 pmn 0,15 bei 24 kHz ($p < 0,05$). k.l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG peglGF-1; 0,15 = 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert

An P28 betragen die Latenzdifferenzen der wt-Mäuse, die keine Injektionen verabreicht bekamen: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,2$ (n=9); 12 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=9); 16 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=10); 20 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=10); 24 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=10). Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG peglGF-1 zeigen sich bei wt-Tieren folgende Differenzen: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,2$ (n=6); 12 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=7); 16 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=7); 20 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=7); 24 kHz: $1,1 \pm 0,1$ (n=7). Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert wurde, weist folgende Werte auf: bei 8 kHz Input: $1,4 \pm 0,2$ (n=3); 12 kHz: $1,2 \pm 0,1$ (n=3); 16 kHz: $1,3 \pm 0,1$ (n=3); 20 kHz: $1,1 \pm 0,1$ (n=3); 24 kHz: $1,1 \pm 0,1$ (n=2). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich folgende Latenzdifferenzen nachweisen: bei 8 kHz Input: $1,3 \pm 0,1$ (n=5); 12 kHz: $1,1 \pm 0,1$ (n=4); 16 kHz: $1,3 \pm 0,2$ (n=6); 20 kHz: $1,1 \pm 0,3$ (n=5); 24 kHz: $1,1 \pm 0,3$ (n=7). Durch Dosen von 0,05 mg/kg KG peglGF-1 resultieren bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $1,3 \pm 0,3$ (n=3); 12 kHz: 2,1 (n=1); 16 kHz: $1,3 \pm 0,5$ (n=4); 20 kHz: $1,1 \pm 0,4$ (n=2); 24 kHz: $1,0 \pm 0,2$ (n=4). Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 ergeben sich folgende Differenzen: bei 8 kHz Input: $1,3 \pm 0,3$ (n=5); 12 kHz: $1,3 \pm 0,3$ (n=4); 16 kHz: $1,1 \pm 0,2$ (n=5); 20 kHz: $1,3 \pm 0,2$ (n=3); 24 kHz: $1,3 \pm 0,2$ (n=5).

Pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 erhielten, weisen signifikant größere Latenzdifferenzen auf als pmn-Mäuse ohne Injektionen (bei 12 kHz: $p < 0,01$) und als pmn-Tiere, die 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert bekamen (bei 24 kHz: $p < 0,05$), s. Abb. 14.

4.2.2.4 Evaluation der Amplitude von Welle 1

Am 21. postnatalen Tag betragen die Amplituden der Welle 1 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten: bei 8 kHz Input: $0,12 \pm 0,07 \mu\text{V}$ (n=10); 12 kHz: $0,19 \pm 0,05$ (n=10); 16 kHz: $0,17 \pm 0,04$ (n=10); 20 kHz: $0,22 \pm 0,1$ (n=10); 24 kHz: $0,2 \pm 0,04$ (n=10). Die wt-Gruppe, der $0,05 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist folgende Werte auf: bei 8 kHz Input: $0,18 \pm 0,09 \mu\text{V}$ (n=6); 12 kHz: $0,21 \pm 0,06$ (n=7); 16 kHz: $0,2 \pm 0,07$ (n=7); 20 kHz: $0,32 \pm 0,1$ (n=7); 24 kHz: $0,34 \pm 0,1$ (n=6). Bei Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 zeigen sich bei den wt-Tieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $0,14 \pm 0,06 \mu\text{V}$ (n=3); 12 kHz: $0,16 \pm 0,01$ (n=3); 16 kHz: $0,13 \pm 0,01$ (n=3); 20 kHz: $0,2 \pm 0,02$ (n=3); 24 kHz: $0,2 \pm 0,07$ (n=3). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich folgende Amplituden nachweisen: bei 8 kHz Input: $0,28 \pm 0,15 \mu\text{V}$ (n=7); 12 kHz: $0,34 \pm 0,1$ (n=7); 16 kHz: $0,23 \pm 0,06$ (n=6); 20 kHz: $0,6 \pm 0,8$ (n=7); 24 kHz: $0,2 \pm 0,12$ (n=7). Bei Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 ergeben sich bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $0,4 \pm 0,15 \mu\text{V}$ (n=2); 12 kHz: $0,26 \pm 0,04$ (n=2); 16 kHz: $0,26 \pm 0,2$ (n=2); 20 kHz: -; 24 kHz: $0,2$ (n=1). Bei Dosen von $0,15 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 resultieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $0,5 \pm 0,42 \mu\text{V}$ (n=3); 12 kHz: $0,5 \pm 0,36$ (n=3); 16 kHz: $0,34 \pm 0,2$ (n=3); 20 kHz: $0,4 \pm 0,3$ (n=3); 24 kHz: $0,2 \pm 0,3$ (n=3).

Wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, weisen signifikant niedrigere Amplituden auf als pmn-Mäuse ohne Injektionen (bei 12 kHz: $p < 0,01$) und als pmn-Mäuse, die $0,15 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 injiziert bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,001$; bei 12 kHz: $p < 0,0001$; bei 16 und 24 kHz: $p < 0,05$). Pmn-Tiere, die Injektionen mit $0,05 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 verabreicht bekamen, zeigen signifikant niedrigere Amplituden als pmn-Mäuse, die $0,15 \text{ mg/kg}$ KG pegIGF-1 injiziert bekamen (bei 12 kHz: $p < 0,05$), s. Abb. 15.

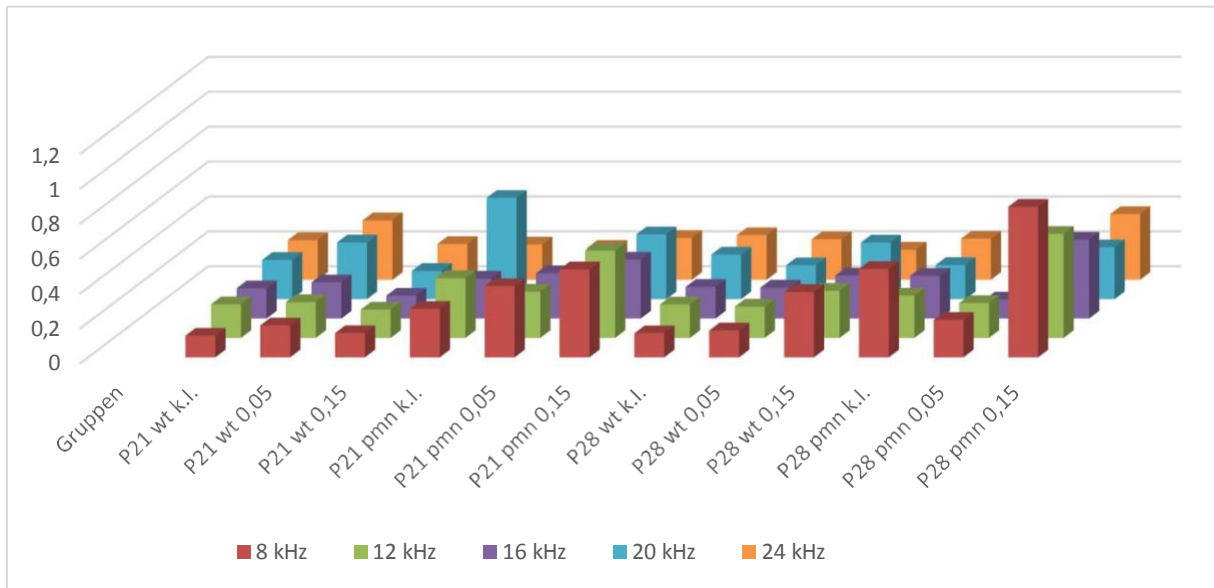


Abb. 14: Durchschnitt Amplituden Welle 1 BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Mikrovolt (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB mit Signifikanzen zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn k. l. bei 12 kHz ($p < 0,01$), zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn 0,15 bei 8 kHz ($p < 0,001$), bei 12 kHz ($p < 0,0001$), bei 16 und 24 kHz ($p < 0,05$), zwischen P21 pmn 0,05 und P21 pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,05$), zwischen P28 wt k. l. und P28 pmn k. l. bei 8 kHz ($p < 0,01$), zwischen P28 wt k. l. und P28 pmn 0,15 bei 8 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P28 pmn k. l. und P28 pmn 0,15 bei 8 kHz ($p < 0,01$), zwischen P28 pmn 0,05 und P28 pmn 0,15 bei 8 kHz ($p < 0,0001$), bei 16 kHz ($p < 0,01$). k.l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert

An P28 betragen die Amplituden der wt-Mäuse ohne Injektionen: bei 8 kHz Input: $0,14 \pm 0,05$ μV ($n=9$); 12 kHz: $0,19 \pm 0,08$ ($n=9$); 16 kHz: $0,18 \pm 0,08$ ($n=10$); 20 kHz: $0,3 \pm 0,1$ ($n=10$); 24 kHz: $0,26 \pm 0,1$ ($n=10$). Durch Injektionen mit 0,05 mg/kg KG peglGF-1 zeigen sich bei wt-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $0,15 \pm 0,1$ μV ($n=6$); 12 kHz: $0,18 \pm 0,07$ ($n=7$); 16 kHz: $0,18 \pm 0,06$ ($n=7$); 20 kHz: $0,2 \pm 0,08$ ($n=7$); 24 kHz: $0,2 \pm 0,06$ ($n=7$). Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert wurde, weist folgende Mittelwerte auf: bei 8 kHz Input: $0,37 \pm 0,31$ μV ($n=3$); 12 kHz: $0,27 \pm 0,15$ ($n=3$); 16 kHz: $0,25 \pm 0,2$ ($n=3$); 20 kHz: $0,3 \pm 0,3$ ($n=3$); 24 kHz: $0,2 \pm 0,07$ ($n=2$). Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lassen sich folgende Amplituden nachweisen: bei 8 kHz Input: $0,5 \pm 0,25$ μV ($n=5$); 12 kHz: $0,24 \pm 0,16$ ($n=4$); 16 kHz: $0,24 \pm 0,2$ ($n=6$); 20 kHz: $0,2 \pm 0,1$ ($n=5$); 24 kHz: $0,2 \pm 0,2$ ($n=7$). Durch Dosen von 0,05 mg/kg KG peglGF-1 resultieren bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $0,21 \pm 0,2$ μV ($n=4$); 12 kHz: $0,2$ ($n=1$); 16 kHz: $0,1 \pm 0,15$ ($n=4$); 20 kHz: $0,2 \pm 0,02$ ($n=2$); 24 kHz: $0,1 \pm 0,3$ ($n=4$). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 ergeben sich folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $0,9 \pm 0,5$ μV ($n=4$); 12 kHz: $0,59 \pm 0,27$ ($n=4$); 16 kHz: $0,5 \pm 0,3$ ($n=5$); 20 kHz: $0,3 \pm 0,45$ ($n=3$); 24 kHz: $0,38 \pm 0,2$ ($n=5$).

Wt-Tiere ohne Injektionen zeigen signifikant niedrigere Amplituden als pmn-Mäuse, die keine Injektionen erhielten (bei 8 kHz: $p < 0,01$), und als pmn-Tiere, die 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,0001$). Letztgenannte pmn-Tiere weisen signifikant höhere

Amplituden auf als pmn-Mäuse ohne Injektionen (8 kHz: $p < 0,01$) und als pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 8 kHz: $p < 0,0001$; bei 16 kHz: $p < 0,01$), s. Abb. 15.

4.2.2.5 Evaluation der Amplitude von Welle 2

Am 21. postnatalen Tag betragen die Amplituden der Welle 2 der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten: bei 8 kHz Input: $0,35 \pm 0,09 \mu\text{V}$ ($n=10$); 12 kHz: $0,48 \pm 0,1$ ($n=10$); 16 kHz: $0,48 \pm 0,16$ ($n=10$); 20 kHz: $0,6 \pm 0,17$ ($n=10$); 24 kHz: $0,6 \pm 0,3$ ($n=10$). Die wt-Gruppe, der 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, weist folgende Werte auf: bei 8 kHz Input: $0,47 \pm 0,2 \mu\text{V}$ ($n=7$); 12 kHz: $0,21 \pm 0,06$ ($n=7$); 16 kHz: $0,48 \pm 0,12$ ($n=7$); 20 kHz: $0,7 \pm 0,2$ ($n=7$); 24 kHz: $0,7 \pm 0,2$ ($n=6$). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 zeigen sich bei den wt-Tieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $0,32 \pm 0,07 \mu\text{V}$ ($n=3$); 12 kHz: $0,36 \pm 0,1$ ($n=3$); 16 kHz: $0,38 \pm 0,1$ ($n=3$); 20 kHz: $0,5 \pm 0,16$ ($n=3$); 24 kHz: $0,5 \pm 0,15$ ($n=3$). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich folgende Amplituden nachweisen: bei 8 kHz Input: $0,42 \pm 0,16 \mu\text{V}$ ($n=7$); 12 kHz: $0,57 \pm 0,19$ ($n=7$); 16 kHz: $0,41 \pm 0,21$ ($n=6$); 20 kHz: $1,0 \pm 1,4$ ($n=7$); 24 kHz: $0,4 \pm 0,2$ ($n=7$). Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergeben sich bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $0,79 \pm 0,31 \mu\text{V}$ ($n=2$); 12 kHz: $0,68 \pm 0,16$ ($n=2$); 16 kHz: $0,8 \pm 0,46$ ($n=2$); 20 kHz: -; 24 kHz: $0,33$ ($n=1$). Bei Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 resultieren folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $0,73 \pm 0,33 \mu\text{V}$ ($n=3$); 12 kHz: $0,9 \pm 0,4$ ($n=3$); 16 kHz: $0,83 \pm 0,45$ ($n=3$); 20 kHz: $0,8 \pm 0,3$ ($n=3$); 24 kHz: $0,7 \pm 0,6$ ($n=3$).

Pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, zeigen signifikant höhere Amplituden als wt-Tiere ohne Injektionen (bei 8 und 16 kHz: $p < 0,01$; bei 12 kHz: $p < 0,0001$), als pmn-Tiere ohne Injektionen (bei 12 und 16 kHz: $p < 0,01$) und als pmn-Tiere, die 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen (bei 12 kHz: $p < 0,05$), s. Abb. 16.

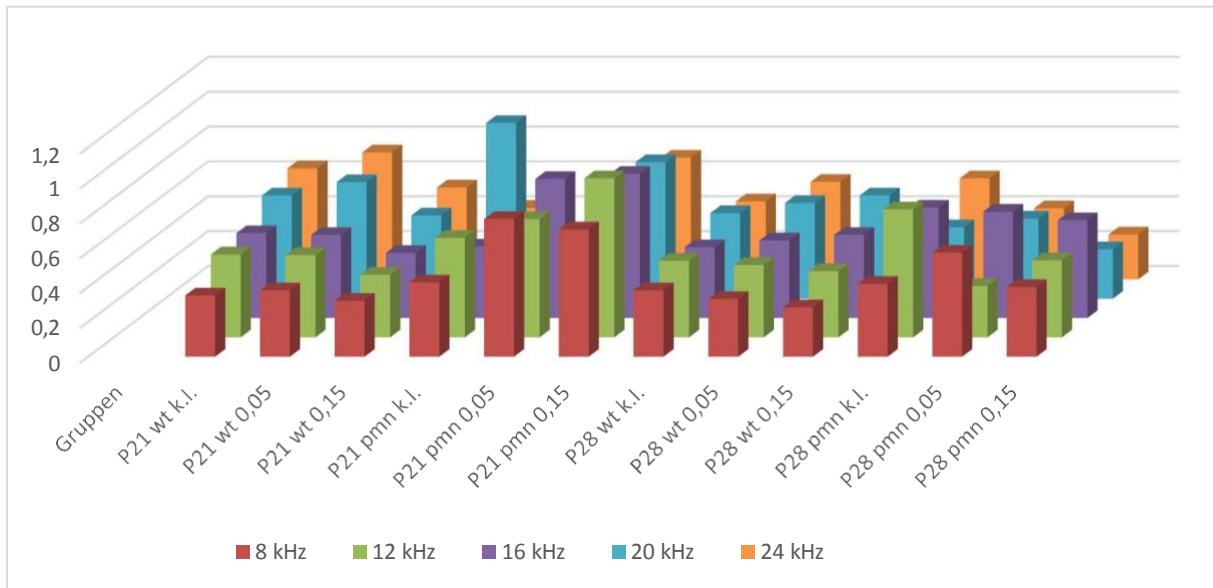


Abb. 15: Durchschnitt Amplituden Welle 2 BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Mikrovolt (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB mit Signifikanzen zwischen P21 wt k. l. und P21 pmn 0,15 bei 8 und 16 kHz ($p < 0,01$), bei 12 kHz ($p < 0,0001$), zwischen P21 pmn k. l. und P21 pmn 0,15 bei 12 und 16 kHz ($p < 0,01$), zwischen P21 pmn 0,05 und P21 pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,05$), zwischen P28 pmn k. l. und P28 pmn 0,15 bei 12 kHz ($p < 0,05$). k.l. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG peglGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert

An P28 betragen die Amplituden der wt-Mäuse ohne Injektionen: bei 8 kHz Input: $0,38 \pm 0,21$ μV ($n=9$); 12 kHz: $0,44 \pm 0,11$ ($n=9$); 16 kHz: $0,4 \pm 0,1$ ($n=10$); 20 kHz: $0,5 \pm 0,16$ ($n=10$); 24 kHz: $0,45 \pm 0,17$ ($n=10$). Durch Injektionen mit 0,05 mg /kg KG peglGF-1 zeigen sich bei wt-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $0,33 \pm 0,11$ μV ($n=6$); 12 kHz: $0,4 \pm 0,07$ ($n=7$); 16 kHz: $0,45 \pm 0,1$ ($n=7$); 20 kHz: $0,55 \pm 0,06$ ($n=7$); 24 kHz: $0,6 \pm 0,08$ ($n=7$). Die wt-Gruppe, der 0,15 mg/kg KG peglGF-1 injiziert wurde, weist folgende Mittelwerte auf: bei 8 kHz Input: $0,28 \pm 0,12$ μV ($n=3$); 12 kHz: $0,38 \pm 0,03$ ($n=3$); 16 kHz: $0,48 \pm 0,2$ ($n=3$); 20 kHz: $0,6 \pm 0,3$ ($n=3$); 24 kHz: $0,35 \pm 0,15$ ($n=2$). Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lassen sich folgende Amplituden nachweisen: bei 8 kHz Input: $0,41 \pm 0,26$ μV ($n=5$); 12 kHz: $0,73 \pm 0,3$ ($n=4$); 16 kHz: $0,6 \pm 0,2$ ($n=6$); 20 kHz: $0,4 \pm 0,13$ ($n=5$); 24 kHz: $0,6 \pm 0,3$ ($n=7$). Durch Dosen von 0,05 mg/kg KG peglGF-1 resultieren bei pmn-Tieren folgende Werte: bei 8 kHz Input: $0,6 \pm 0,35$ μV ($n=4$); 12 kHz: $0,3$ ($n=1$); 16 kHz: $0,6 \pm 0,3$ ($n=4$); 20 kHz: $0,46 \pm 0,16$ ($n=2$); 24 kHz: $0,4 \pm 0,2$ ($n=4$). Bei Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 ergeben sich folgende Mittelwerte: bei 8 kHz Input: $0,4 \pm 0,8$ μV ($n=4$); 12 kHz: $0,44 \pm 0,32$ ($n=4$); 16 kHz: $0,6 \pm 0,4$ ($n=5$); 20 kHz: $0,28 \pm 0,2$ ($n=3$); 24 kHz: $0,2 \pm 0,08$ ($n=5$).

Pmn-Tiere ohne Injektionen zeigen signifikant höhere Amplituden als pmn-Tiere, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG peglGF-1 erhielten (bei 12 kHz: $p < 0,05$), s. Abb. 16.

4.2.3 Analyse von β -III-positiven Spiralganglienfasern und cholinergischer Synapsen mittels immunhistochemischer Färbung von Wholemoutpräparaten

4.2.3.1 Quantitative Analyse β -III-positiver Spiralganglienfasern

In einem Alter von 21 Tagen zeigen sich bei wt-Tieren ohne Injektionen $17,1 \pm 3,5$ ($n=3$) Neuronenfasern. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 lassen sich bei wt-Mäusen $15,0 \pm 2,4$ ($n=3$) Neuronenfasern nachweisen. Erhielten die wt-Mäuse Dosen von 0,15 mg/kg KG, ergibt sich ein Mittelwert von $11,8 \pm 1,1$ ($n=3$). Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lassen sich $9,5 \pm 1,4$ ($n=3$) Neuronenfasern nachweisen. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich bei pmn-Tieren eine Anzahl von $9,1 \pm 0,9$ ($n=3$). Wurde den pmn-Tieren Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht, resultiert ein Wert von $9,0 \pm 0,6$ ($n=3$).

Bei wt-Mäusen ohne Injektionen lassen sich signifikant mehr Neuronenfasern als bei allen gleichaltrigen pmn-Gruppen nachweisen (ohne Injektionen: $p < 0,05$; bei Injektionen mit 0,05 und 0,15 mg/kg KG pegIGF-1: $p < 0,01$), s. Abb. 17 und Abb. 22-25 (S.56-59).

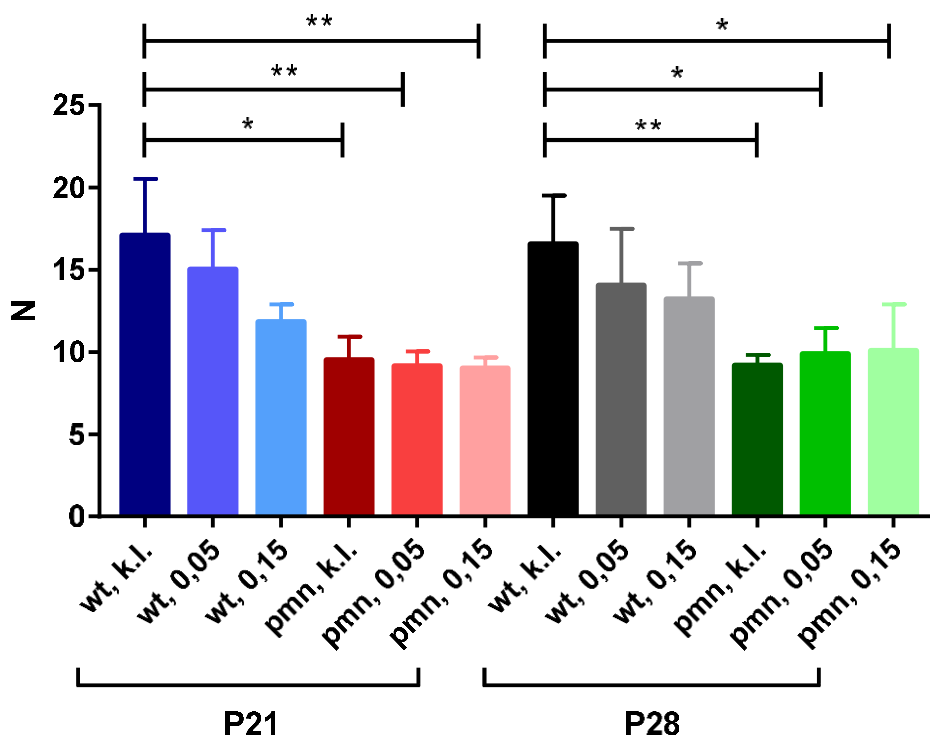


Abb. 16: Anzahl (N) β -III-positiver Spiralganglienfasern pro 100 μ m der untersuchten Gruppen (Y-Achse), k.I. = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

An P28 zeigen sich bei wt-Tieren ohne Injektionen $16,6 \pm 2,9$ ($n=4$) Neuronenfasern. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 lassen sich bei wt-Mäusen $14,0 \pm 3,4$ ($n=3$) Neuronenfasern nachweisen. Erhielten die wt-Mäuse Dosen von 0,15 mg/kg KG, ergibt sich

ein Wert von $13,2 \pm 2,1$ ($n=3$). Bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, lassen sich $9,1 \pm 0,6$ ($n=3$) Neuronenfasern nachweisen. Bei Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ergibt sich bei pmn-Mäusen eine Anzahl von $9,8 \pm 1,6$ ($n=3$). Wurden den pmn-Tieren Dosen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert, resultiert ein Wert von $10,1 \pm 2,8$ ($n=3$).

Wt-Tiere, die keine Injektionen erhielten, zeigen signifikant mehr Neuronenfasern als alle gleichaltrigen pmn-Gruppen (ohne Injektionen: $p < 0,05$; bei Injektionen mit 0,05 und 0,15 mg/kg KG pegIGF-1: $p < 0,05$), s. Abb. 17 und Abb. 20-23 (S.56-59).

4.2.3.2 Analyse des mittleren Graustufenwerts cholinergischer Synapsen

Bei der Untersuchung des mittleren Graustufenwerts werden folgende Mittelwerte bestimmt. An P21 weist der Graustufenwert der wt-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, einen Wert von 2328 ± 370 auf. Pmn-Tiere dieses Alters und ohne Injektionen zeigen einen Wert von 2491 ± 453 . Wurden pmn-Tieren Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht, resultiert ein Graustufenwert von 2728 ± 467 .

Der Graustufenwert der wt-Mäuse ohne Injektionen ist signifikant niedriger als der der pmn-Mäuse ohne Injektionen ($p < 0,05$). Pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, weisen einen signifikant höheren Graustufenwert auf als pmn-Mäuse ohne Injektionen ($p < 0,001$) und wt-Tiere ohne Injektionen ($p < 0,0001$), s. Abb. 18, und Abb. 22-25 (S.56-59).

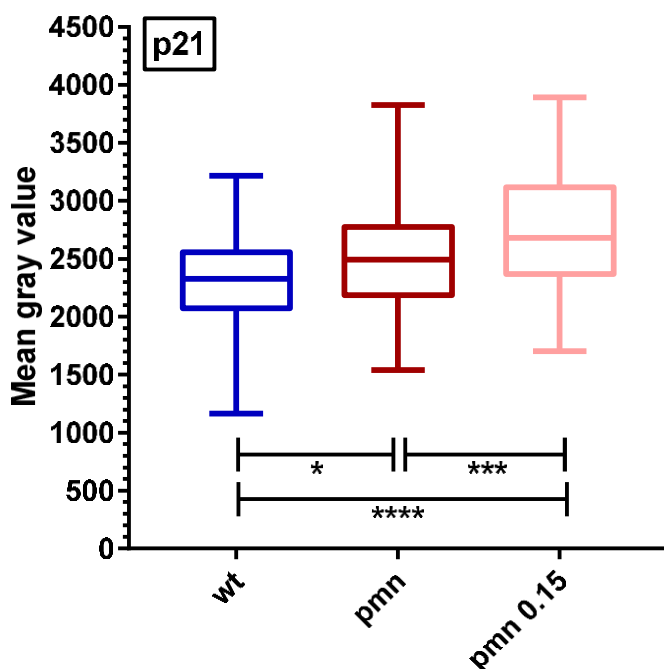


Abb. 17: mittlerer Graustufenwert cholinergischer Synapsen an P21, k. I. = keine Injektionen; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

In einem Alter von P28 lässt sich bei wt-Tieren ohne Injektionen ein Graustufenwert von 3082 ± 349 nachweisen. Bei pmn-Tieren ohne Injektionen wird ein Wert von 2538 ± 560 ermittelt. Pmn-Tiere, denen 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, zeigen einen Graustufenwert von 2927 ± 553 .

Der Graustufenwert der wt-Mäuse ohne Injektionen ist signifikant höher als der der pmn-Mäuse ohne Injektionen ($p < 0,0001$) und der pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen ($p < 0,05$). Letztgenannte pmn-Mäuse zeigen einen signifikant höheren Wert als pmn-Tiere ohne Injektionen ($p < 0,0001$), s. Abb. 19, und Abb. 22-25 (S.56-59).

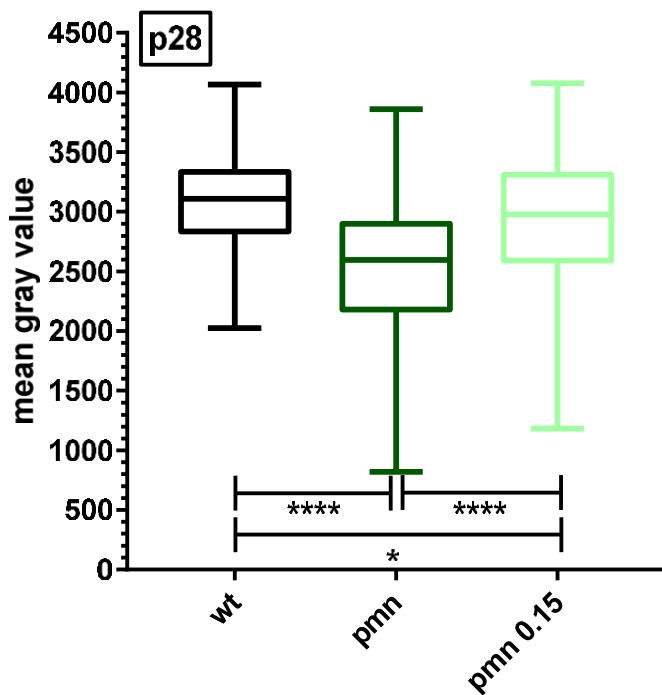


Abb. 18: mittlerer Graustufenwert cholinergischer Synapsen an P28, k. I. = keine Injektionen; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

4.2.3.3 Analyse der Fläche cholinergischer Synapsen

Bei der Untersuchung der Fläche cholinergischer Synapsen werden folgende Mittelwerte gemessen. An P21 weist die Fläche der Synapsen von wt-Mäusen, die keine Injektionen erhielten, $6,9 \pm 2,2 \mu\text{m}^2$ auf. Pmn-Tiere ohne Injektionen zeigen eine Fläche von $8,5 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$. Erhielten pmn-Tiere dieses Alters Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG pegIGF-1}$, lässt sich eine Fläche von $5,1 \pm 2,3 \mu\text{m}^2$ nachweisen.

Die Fläche cholinergischer Synapsen ist bei wt-Mäusen ohne Injektionen signifikant größer als bei pmn-Mäusen, die Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG pegIGF-1}$ erhielten ($p < 0,0001$). Pmn-Mäuse ohne Injektionen weisen signifikant größere Synapsen auf als wt-Mäuse ohne Injektionen ($p < 0,0001$) und als pmn-Tiere, die $0,15 \text{ mg/kg KG pegIGF-1}$ injiziert bekamen ($p < 0,0001$), s. Abb. 20, und Abb. 22-25 (S.56-59).

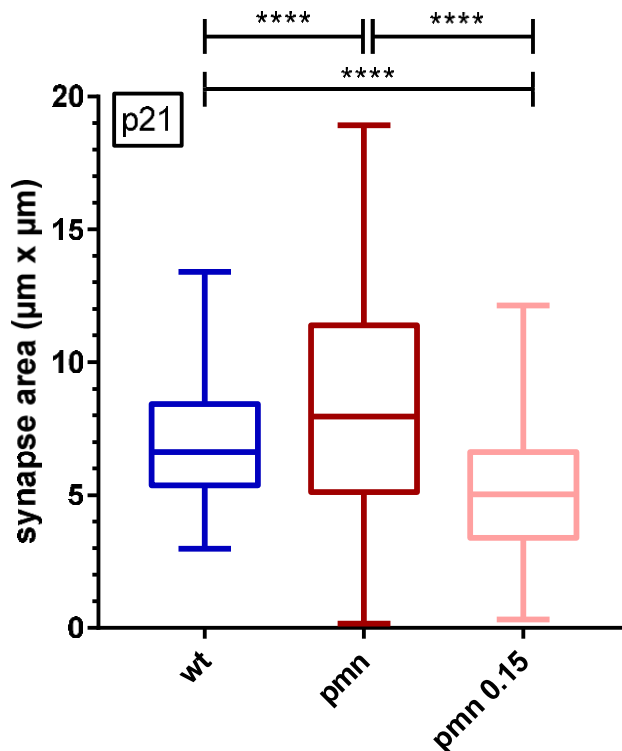


Abb. 19: Fläche cholinergischer Synapsen an P21, k. I. = keine Injektionen; 0,15 = $0,15 \text{ mg/kg KG pegIGF-1}$ injiziert; Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

In einem Alter von P28 lassen sich bei wt-Tieren, die keine Injektionen erhielten, $9,3 \pm 2,9 \mu\text{m}^2$ große cholinerge Synapsen messen. Bei pmn-Mäusen ohne Injektionen lässt sich eine Fläche von $6,1 \pm 3,1 \mu\text{m}^2$ nachweisen. Pmn-Tiere, die Injektionen mit $0,15 \text{ mg/kg KG pegIGF-1}$ verabreicht bekamen, zeigen Synapsen mit einer Fläche von $6,2 \pm 3,2 \mu\text{m}^2$.

Wt-Tiere ohne Injektionen weisen eine signifikant größere Fläche der cholinergen Synapsen auf als beide pmn-Gruppen (jeweils $p < 0,0001$), s. Abb. 21, und Abb. 22-25 (S.56-59).

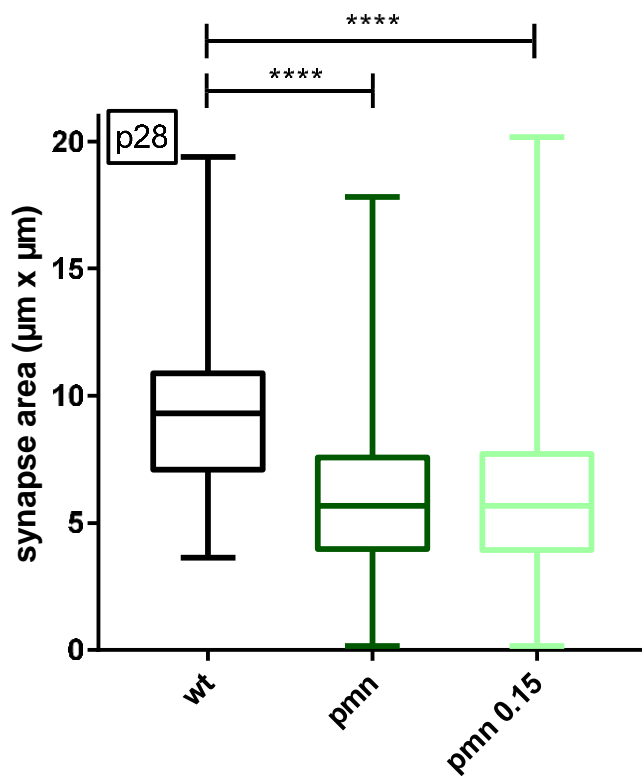


Abb. 20: Fläche cholinerger Synapsen an P28, k. I. = keine Injektionen; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert; Signifikanzen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

4.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Wholemount-Aufnahmen als Grundlage zur Evaluation von ÄHZ, β -III-positiven Spiralganglienfasern und cholinergen Synapsen

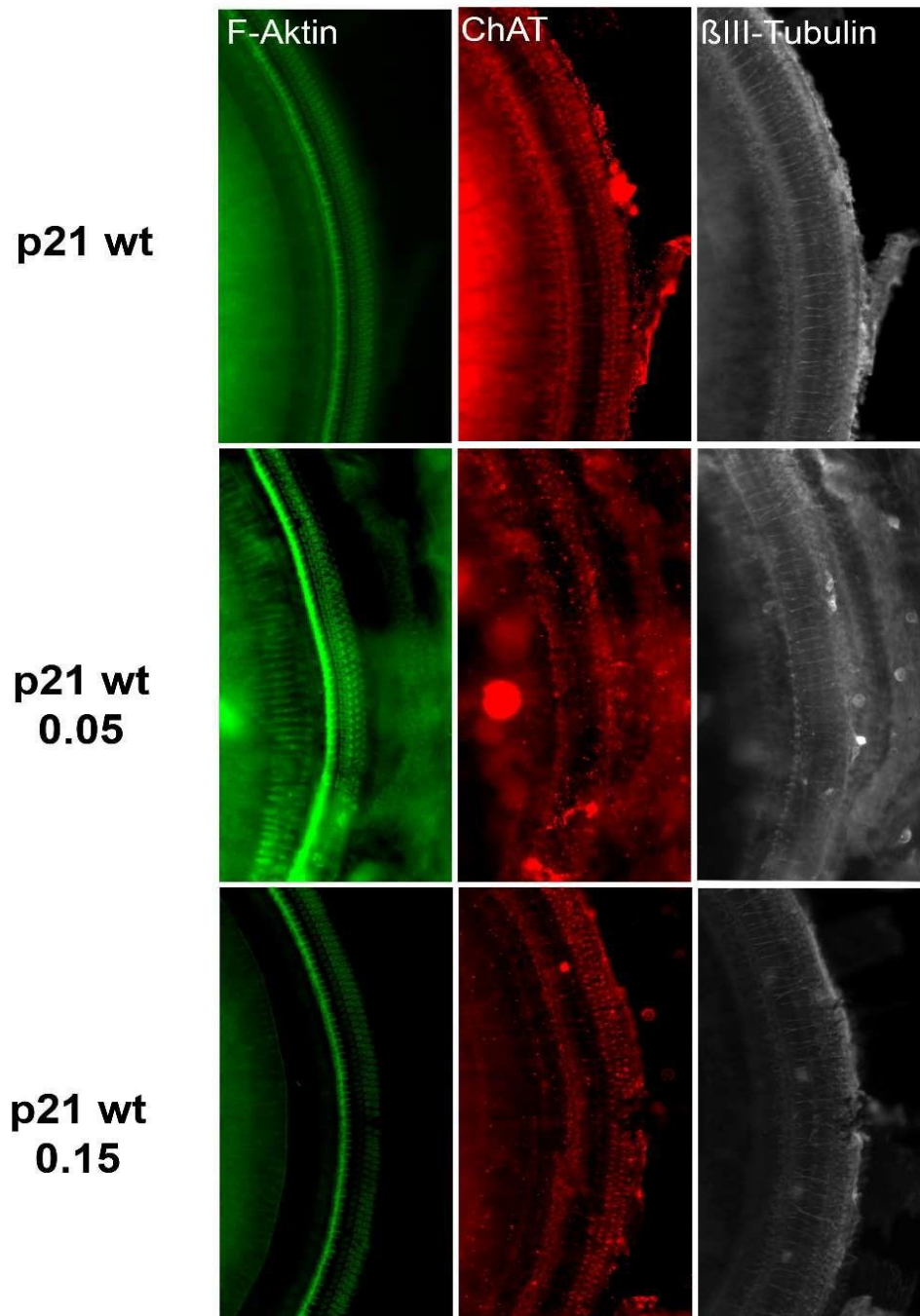


Abb. 21: Wholemountpräparation der Cochlea P21 wt; ohne Zusatz = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; F-Aktin: ÄHZ, ChAT: cholinerge Synapsen, β -III-Tubulin: Spiralganglienfasern

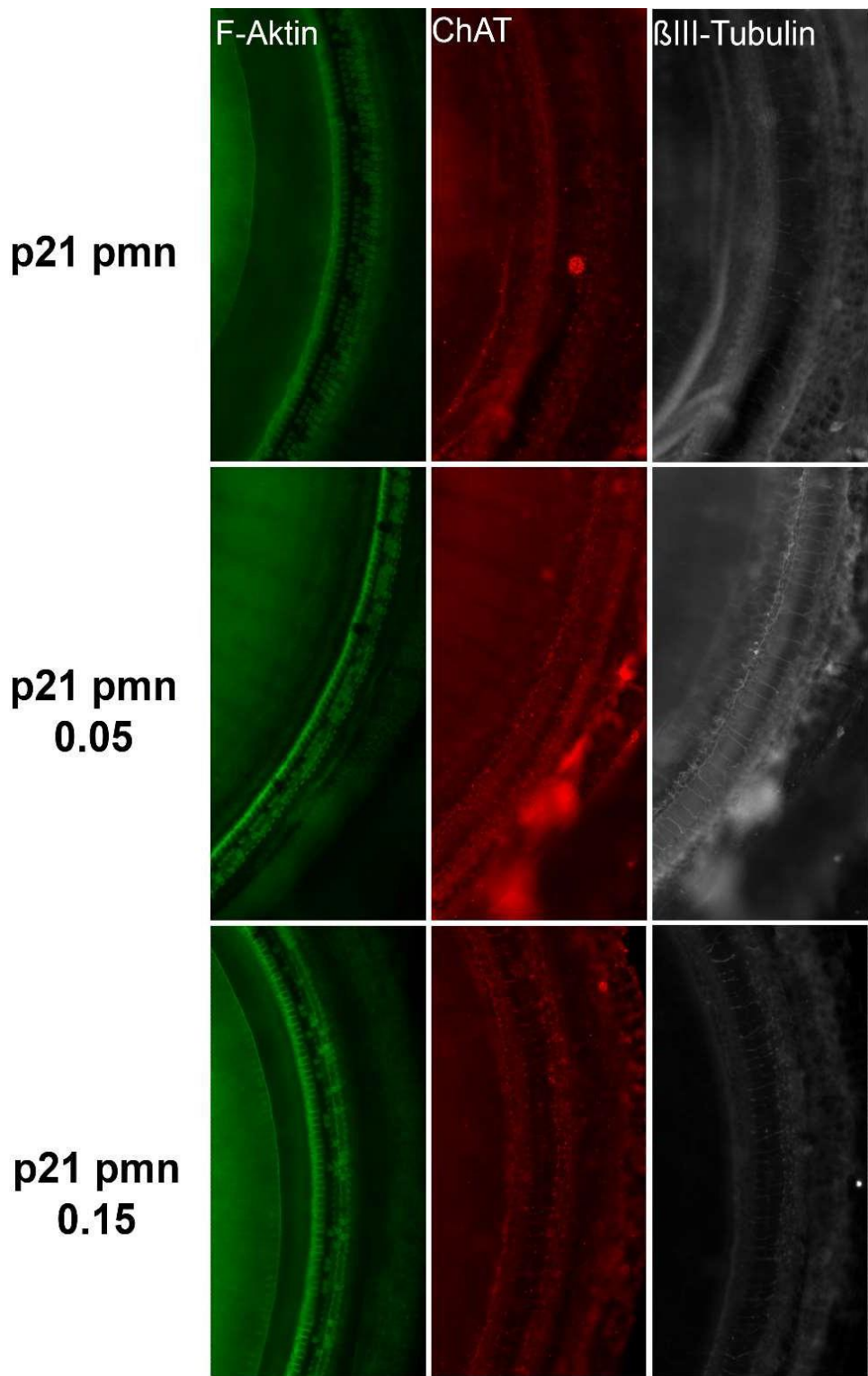


Abb. 22: Wholemoutpräparation der Cochlea P21 pmn; ohne Zusatz = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; F-Aktin: ÄHZ, ChAT: cholinerge Synapsen, β -III-Tubulin: Spiralganglienfasern

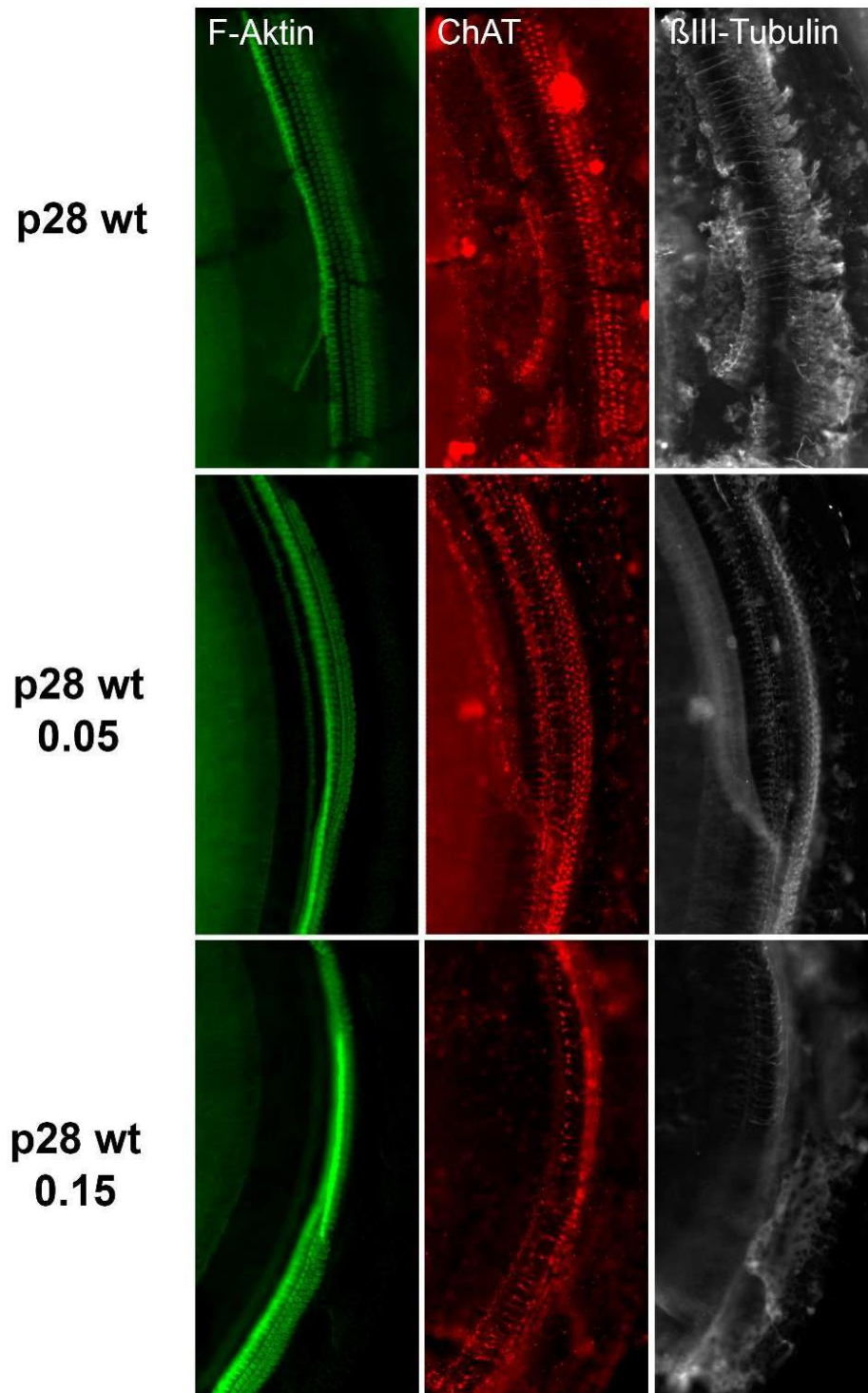


Abb. 23: Wholemoutpräparation der Cochlea P28 wt; ohne Zusatz = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1behandelt; 0,15 = 0,15 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; F-Aktin: ÄHZ, ChAT: cholinerge Synapsen, β -III-Tubulin: Spiralganglienfasern

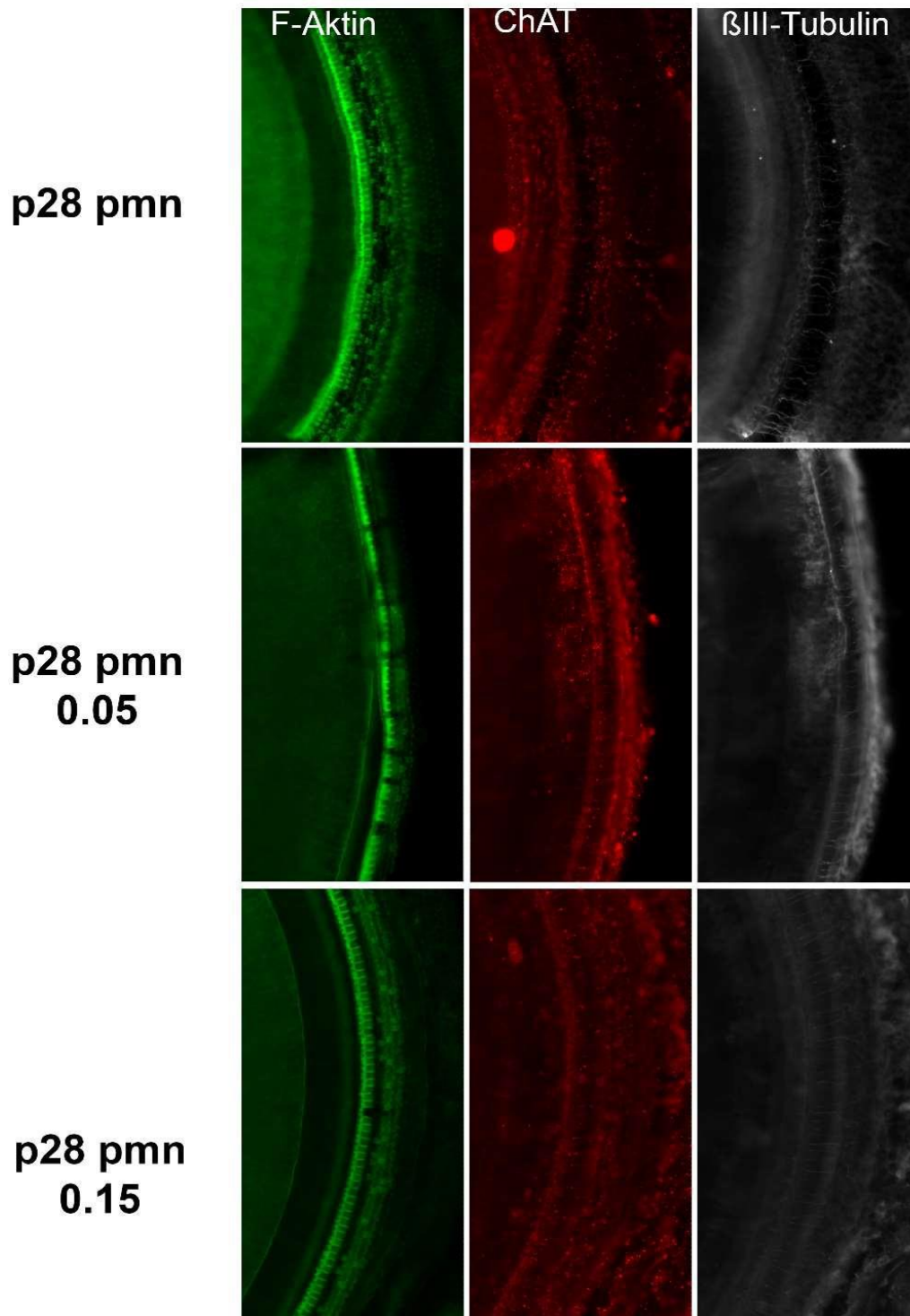


Abb. 24: Wholemoutpräparation der Cochlea P28 pmn; ohne Zusatz = keine Injektionen; 0,05 = 0,05 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; 0,15 = mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1injiziert; F-Aktin: ÄHZ, ChAT: cholinerge Synapsen, β -III-Tubulin: Spiralganglienfasern

5. Diskussion

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde der Effekt des Wachstumsfaktors pegIGF-1 bei wt- und pmn-Tieren in einem Alter von P21 und P28 zu untersucht. Funktionalität und Anzahl der ÄHZ wurden mit Hilfe von DPOAEs und Immunhistochemie analysiert. Durch die Durchführung einer Click-BERA wurde die Funktion der afferenten Hörbahn untersucht. Zusätzlich wurden BERA-Messungen zwischen 4 und 24 kHz durchgeführt, um zu bewerten, ob der Effekt von pegIGF-1 für bestimmte Frequenzen selektiv ist. Zuletzt wurden die Anzahl von Neuronen und die Dichte in Relation zur Größe von cholinergen Synapsen durch Immunhistochemie eruiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse zusammengefasst, interpretiert und mit aktueller Literatur verglichen. Abschließend erfolgen eine Zusammenfassung und ein Ausblick auf die Notwendigkeit weiterer Forschung bezüglich dieser Thematik.

5.1 DPOAEs und ÄHZ

Otoakustische Emissionen sind Schallwellen, die im äußeren Gehörgang gemessen werden können und ein Randphänomen des nichtlinearen Verstärkermechanismus in der Cochlea darstellen. Durch niedrige oder moderate akustische Reize ausgelöste Schwingungen der Basilarmembran werden durch Kontraktion oder Streckung der ÄHZ lokal verstärkt, wodurch bei einem SPL unter 50 dB IZH überhaupt erst erregt werden können. Bis zu einem SPL von 80 dB tragen die ÄHZ zu hoher Frequenzselektivität und einem breiten Dynamikbereich bei. Dabei entstehende Vibrationen werden auch retrograd weitergeleitet, versetzen das Mittelohr in Schwingung und erreichen so den äußeren Gehörgang (Avan, Buki et al. 2013). OAEs können durch Stimulation mit Reintönen evoziert werden, wobei man von distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen spricht. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Studie angewandt.

Zunächst wurde der SPL betrachtet, an dem das letzte Mal DPOAEs gemessen werden konnten. Bei einem Alter von P21 war die Schwelle der wt-Tiere (bei 16 kHz), denen 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, signifikant höher als die der wt-Gruppe ohne Injektionen, im Folgenden als Kontrollgruppe bezeichnet. Auch bei pmn-Mäusen, die entweder keine Injektionen erhielten (bei 20 kHz), oder welche mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen (bei 8 und 24 kHz), lag die Schwelle signifikant über der der Kontrollgruppe. Bei P28 ließ sich bei pmn-Mäusen, die entweder keine (bei 8, 16 und 20 kHz) oder Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 (bei 8, 12, 16, 20 und 24 kHz) erhielten, eine signifikant erhöhte Schwelle der DPOAEs im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Pmn-Mäuse, denen 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde, wiesen eine signifikant niedrigere Schwelle auf als pmn-Tiere, die

Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen. Dass pmn-Mäuse höhere DPOAE-Schwellenwerte als wt-Tiere aufweisen bzw. ein erhöhter Stimuluspegel nötig ist, um DPOAEs zu erzeugen, wurde schon in vorherigen Untersuchungen festgestellt (Rak, Frenz et al. 2013). Die Injektionen mit pegIGF-1 hatten keinen positiven Einfluss auf die DPOAEs.

Durch die Pathologie der DPOAEs bei pmn-Mäusen stellte sich die Frage nach einer möglichen Degeneration der ÄHZ. An P21 konnten bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen oder welche mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, signifikant weniger ÄHZ als bei der gleichaltrigen Kontrollgruppe gezählt werden. Pmn-Mäuse, die 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen, besaßen signifikant mehr ÄHZ als pmn-Mäuse ohne und Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1. In einem Alter von P28 wiesen alle pmn-Gruppen signifikant erniedrigte ÄHZ-Werte im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe auf. Dass pmn-Mäuse signifikant weniger ÄHZ besitzen als wt-Tiere und diese Differenz mit fortschreitendem Alter ansteigt, korreliert mit den Ergebnissen von Rak et al (Rak, Frenz et al. 2013). Die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 schienen bei P21 einen positiven Einfluss auf die Anzahl der ÄHZ zu haben.

5.2 Analyse der afferenten Hörbahn mittels Click-BERA

Zusätzlich wurden bei pmn- und wt-Tieren Hirnstammpotenziale abgeleitet, die durch einen breitbandigen Klickreiz ausgelöst wurden. Solche evozierten Potenziale erlauben die Reizverarbeitung im Hirnstamm zu messen und dienen zur Abgrenzung cochleärer und retrocochleärer Hörstörungen.

Zunächst wurde analysiert, bei welchem SPL zuletzt physiologische Potentiale beobachtet werden konnten. Diese Hörschwellen waren an P21 bei pmn-Mäuse ohne Injektionen und pmn-Mäusen, die 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen, signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz erreichte außerdem der Vergleich bei P28. Hier lagen die Hörschwellen aller pmn-Gruppen signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Auch innerhalb der pmn-Tiere verschlechterte sich die Hörschwelle von P21 zu P28 signifikant. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einer früheren Studie festgestellt, hier war die Differenz der Hörschwelle von pmn-Mäuse zu wt-Tieren jedoch erst ab P26 signifikant (Volkenstein, Brors et al. 2009).

Diese Ergebnisse warfen die Frage nach der Ursache der erhöhten Hörschwellen auf. Es wurde sich auf die ersten beiden Wellen der BERA-Messungen fokussiert, da bei pmn-Mäusen eine axonale Degeneration der peripheren Hörbahn vorliegt, die retrograd verläuft. Hierbei

wurde zunächst die Länge der Latenz bis zum NC (Welle 2) untersucht, ob also die neuronale Weiterleitung des akustischen Reizes schon zu Beginn der afferenten Hörbahn zeitlich verzögert war. In einem Alter von P21 war die Latenz der pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, signifikant länger als die der Kontrollgruppe, der pmn-Tiere ohne Injektionen und der pmn-Tiere, denen 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert wurde. Das gleiche Bild ergab sich bei P28. Hier waren zusätzlich die Latenzen aller pmn-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängert. Außerdem ließ sich eruieren, dass die Latenz der pmn-Mäuse bei P28 signifikant höher war als bei P21. Warum die mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injizierten pmn-Mäuse höhere Latenzen als die restlichen pmn-Gruppen aufwiesen, ist schwierig zu erklären. Ließ man diese Gruppe außer Acht, war die Verarbeitung des akustischen Reizes im NC erst bei P28 signifikant verzögert. PegIGF-1 hatte keinen Einfluss.

Um festzustellen, ob die neuronale Reizweiterleitungsgeschwindigkeit durch Injektionen mit pegIGF-1 beeinflusst wurde, wurden die Latenzen eines Reizes zum Nervus cochlearis und zum NC gemessen und die Differenz zwischen beiden miteinander verglichen. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen allen pmn-Gruppen des Alters P28 und der gleichaltrigen Kontrollgruppe festgestellt. Die Latenzdifferenzen der pmn-Gruppen waren deutlich verlängert. Zudem waren die Werte der P28 pmn-Mäuse, die keine Injektionen erhielten, signifikant höher als die der P21 pmn-Tiere ohne Injektionen. Auch hier war die Reizweiterleitungsgeschwindigkeit der pmn-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe erst bei P28 signifikant verzögert und pegIGF-1 zeigte keine Wirkung. Dass pmn-Mäuse erhöhte Latenzen und verringerte Leitungsgeschwindigkeiten zeigen, wurde bereits bei Untersuchungen von Motoneuronen des Nervus ischiadicus nachgewiesen. Hier konnten bereits ab P13 signifikante Unterschiede gemessen werden (Holtmann, Zielasek et al. 1999).

Des Weiteren wurde die Fragestellung untersucht, ob und wie sich die Amplituden des weitergeleiteten Reizes in den beiden Kerngebieten Nervus cochlearis und NC verändern. Auch hier war bei P21 auffällig, dass die pmn-Gruppe, die Injektionen mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekam, signifikant erniedrigte Amplituden im Vergleich zu pmn-Mäuse ohne Injektionen, pmn-Mäusen mit Injektionen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 und der Kontrollgruppe aufzeigten. An P28 wiesen pmn-Mäuse ohne Injektionen und solche, die 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen, signifikant niedrigere Amplituden als die gleichaltrige Kontrollgruppe auf, während die Amplitude der pmn-Mäuse, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, vergleichbare Werte wie wt-Tiere zeigten. Wurde die Amplitude der Welle 2 in den Fokus der Analyse gerückt, ergaben sich folgende Konstellationen. An P21 wurden bei pmn-Mäusen, die keine Injektionen oder welche mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, signifikant niedrigere Amplituden des NC als bei der gleichaltrigen Kontrollgruppe gemessen.

An P28 wiesen alle pmn-Gruppen signifikant niedrigere Werte als die Kontrollgruppe auf. Sowohl bei Betrachtung des Nervus cochlearis als auch des NC zeigten pmn-Mäuse ohne Injektionen an P28 signifikant niedrigere Amplituden auf als die pmn-Gruppen im Alter von P21. Ließ man bei Welle 1 erneut die pmn-Gruppe mit 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 außen vor, zeigte sich hier erst ab P28 eine signifikante Verringerung der Amplitude der pmn-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Welle 2 wurden schon an P21 signifikante Reduzierungen nachgewiesen, pmn-Tiere mit Injektionen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 ausgenommen. Eine signifikante Verringerung der Amplituden bei pmn-Mäusen in Motoneuronen der Nervi facialis und ischiadicus konnten ebenfalls Holtmann et al. (Holtmann, Zielasek et al. 1999) feststellen.

5.3 Analyse der afferenten Hörbahn mittels BERA zwischen 4 und 24 kHz

Da eine Click-BERA hauptsächlich die Funktion der basalen Cochleawindung untersucht (Volkenstein, Brors et al. 2009), wurde zusätzlich eine BERA mit Frequenzen zwischen 4 und 24 kHz durchgeführt. Durch die Tonotopie der Cochlea konnte so eruiert werden, in welchem Abschnitt Pathologien vorliegen.

Bei der Betrachtung der Hörschwelle konnten bei Frequenzen von 20 und 24 kHz schon ab einem Alter von P21 signifikant erhöhte Hörschwellen bei pmn-Mäusen festgestellt werden (pmn-Mäuse mit Injektionen von 0,05 mg/kg KG pegIGF-1 ausgenommen). An P28 waren alle Frequenzen von allen pmn-Gruppen von einem signifikanten Hörverlust betroffen. Auch Rak et.al (Rak, Frenz et al. 2013) fanden in ihren frequenzspezifischen Untersuchungen heraus, dass Frequenzen von 12 und 16 kHz anfangs nicht so stark von einer Funktionsstörung betroffen sind. Bei der Analyse der Latenz konnte im Vergleich zur Click-BERA bei pmn-Mäusen schon an P21 eine signifikante Verlängerung gemessen werden. Frequenzbezüglich konnte kein Muster erkannt werden. Die Latenzdifferenz wies hauptsächlich bei einer Frequenz von 24 kHz ähnlich signifikante Unterschiede wie bei der Click-BERA auf. Bei der Untersuchung der Amplitude der Welle 1 konnte die Sonderstellung der pmn-Mäuse, die Injektionen von 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, zu beiden Zeitpunkten bestätigt werden, indem sie bei 8 kHz eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den anderen pmn-Gruppen aufzeigten. Dass die Amplituden der Welle 2 der pmn-Mäuse, die 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 verabreicht bekamen, in einem Alter von P21 bei der Click-BERA als einzige Gruppe der pmn-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verringert waren, konnte ebenfalls bestätigt werden, da sie bei 12 kHz signifikant höher waren. Insgesamt ließ sich keine Frequenz eruieren, bei der gehäufte Anzeichen einer Funktionsstörung oder ein Effekt von pegIGF-1 vorlagen.

5.4 Analyse β -III-positiver Spiralganglienfasern und cholinergere Synapsen mittels immunhistochemischer Färbung von Wholemoutpräparaten

Die elektrophysiologische Pathologie von pmn-Mäusen legte den Verdacht einer morphologischen Veränderung des Hörnervs nahe. Rak et al (Rak, Frenz et al. 2013) fanden bei der Analyse der Anzahl von Somata der Spiralganglienzellen und zentralen Axone keine signifikanten Unterschiede. Schmalbruch et al (Schmalbruch, Jensen et al. 1991) eruierten, dass sensorische Neuronen nicht von der Neuronopathie betroffen sind. In dieser Studie wurde die Anzahl β -III-positiver Spiralganglienfasern untersucht. Diese war sowohl an P21, als auch an P28 bei allen pmn-Gruppen signifikant geringer als bei den gleichaltrigen Kontrollgruppen. Das lässt sich dadurch erklären, dass mit β -III-Tubulin die MT der Nervenfasern markiert werden und diese durch die Mutation im TBCE-Gen bei pmn-Mäusen degeneriert sind. Rak et al. (Rak, Frenz et al. 2013) fanden zwar keine verringerte Anzahl von Neuronen, aber eine Verringerung der Anzahl und Dichte von MT.

ÄHZ werden hauptsächlich durch efferente Neuronen innerviert (Warren and Liberman 1989). Der absteigende Teil der Hörbahn teilt sich in die laterale (LOC) und mediale Olive (MOC). Nervenfasern aus der lateralen oberen Olive innervieren IHZ und mediale Nervenfasern innervieren ausschließlich ÄHZ (Guinan, Warr et al. 1984). Diese Neuronen sind die längstem im auditorischen System und deswegen möglicherweise von der TBCE Mutation am meisten betroffen. Da diese cholinerge Neuronen sind, konnten deren Synapsen mit Hilfe der cholinergen Acetyltransferase (ChAT) untersucht werden. Da bei Injektionen von wt-Tieren mit beiden Dosen und bei pmn-Tieren mit 0,05 mg/kg KG zuvor keine Effekte gemessen werden konnten, wurden diese Gruppen nicht evaluiert. Die Injektionen mit pegIGF-1 an P21 führten bei pmn-Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den pmn-Mäusen ohne Injektionen zu einer Verkleinerung der synaptischen Fläche, aber auch zu einer Verstärkung der ChAT-Intensität. An P28 zeigten beide pmn-Gruppen eine Verkleinerung der Fläche mit einer Verringerung der Intensität von ChAT, die jedoch durch die Injektionen mit pegIGF-1 fast komplett kompensiert wurde. Dass IGF-1 bei molekularen Mechanismen an der Synapse eine Rolle spielt, zeigten bereits Cao et al (Cao, Maximov et al. 2011). Die positive Wirkung von pegIGF-1 könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass IGF-1 durch Aktivierung von Proteinen des SNARE-Komplexes, insbesondere Synaptotagmin, eine Exozytose in Präsynapsen stimuliert (Cao, Maximov et al. 2011, Grassi, Plonka et al. 2015, Parker, Berretta et al. 2017).

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die pmn-Maus ist ein interessantes Tiermodell für eine sensorineurale Schwerhörigkeit und/oder eine auditorische Neuropathie, da sie einen Verlust der ÄHZ, aber auch eine Dysfunktion des Hörnervs aufweist. Jablonka et al. (Jablonka, Holtmann et al. 2011) zeigten bereits, dass mit Injektionen von pegIGF-1 die motorischen Symptome gelindert werden können. In dieser Studie wurde untersucht, ob pegIGF-1 auch einen Einfluss auf das beeinträchtigte auditorische System dieser Maus hat.

Zunächst konnte in dieser Dissertation der progressive Hörverlust der pmn-Maus im Vergleich zu wt-Mäusen, der schon 2013 (Rak, Frenz et al. 2013) beschrieben wurde, bestätigt werden.

Es konnte kein Effekt von pegIGF-1 auf die Hörfunktion der pmn-Mäuse gefunden werden. Die Anzahl der ÄHZ war an P21 bei pmn-Mäusen, die 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 injiziert bekamen, signifikant höher als bei den übrigen pmn-Gruppen. Im Alter von P28 wurden jedoch in allen pmn-Gruppen signifikant weniger ÄHZ als bei der Kontrollgruppe nachgewiesen. Die Anzahl der β -III-positiven Spiralganglienfasern, die den Tunnel des Corti'schen Organ durchqueren, war bei pmn-Tieren sowohl an P21 als auch P28 niedriger als die der wt-Mäuse. Auf die Anzahl der Neuronenfasern konnte mit einer Behandlung von pegIGF-1 kein positiver Effekt beobachtet werden. Bei der Analyse der Konzentration von ChAT in den Synapsen efferenter MOC Neuronen jedoch konnte eruiert werden, dass diese bei pmn-Mäusen, die Injektionen mit 0,15 mg/kg KG pegIGF-1 erhielten, an P21 und P28 signifikant höher war als bei jeweils gleichaltrigen pmn-Mäusen ohne Injektionen und der Kontrollgruppe. Somit kann eine neuroprotektive Wirkung von pegIGF-1 vermutet werden, die schon 2008 beschrieben wurde (Ferrer-Alcon, Winkler-Hirt et al. 2008). Es stellt sich die Frage, ob mit einer Erhöhung der Dosis oder einer früheren Applikation von pegIGF-1 auch die Funktion der Neuronen stabilisiert werden kann und dadurch ein Verlust der ÄHZ vermindert werden hätte können.

Außerdem wäre es interessant zu eruieren, ab welchem Zeitpunkt in der Entwicklung des Cortischen Organs der pmn-Maus eine Degeneration morphologisch erkennbar ist. Dies könnte weitere therapeutische Ansätze ermöglichen, um die Symptomatik der neurodegenerativen Pathologie zu mindern.

Da es bis dato wenige vergleichbare Studien gibt, ist bei der Interpretation des Ergebnisses allerdings Vorsicht geboten. Dennoch sollte es angesichts der kontinuierlich hohen Inzidenz von Schwerhörigkeit in Bezug auf Neuronopathie ein großes Anliegen sein die Forschungsarbeit auf diesem Gebiet zu intensivieren.

I. Literaturverzeichnis

Angelborg, C. and H. Engstrom (1972). "Supporting elements in the organ of Corti. I. Fibrillar structures in the supporting cells of the organ of Corti of mammals." Acta Otolaryngol Suppl **301**: 49-46.

Avan, P., B. Buki and C. Petit (2013). "Auditory distortions: origins and functions." Physiol Rev **93**(4): 1563-1619.

Basu, A., K. Yang, M. Wang, S. Liu, R. Chintala, T. Palm, H. Zhao, P. Peng, D. Wu, Z. Zhang, J. Hua, M. C. Hsieh, J. Zhou, G. Petti, X. Li, A. Janjua, M. Mendez, J. Liu, C. Longley, Z. Zhang, M. Mehlig, V.

Borowski, M. Viswanathan and D. Filpula (2006). "Structure-function engineering of interferon-beta-1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation." Bioconjug Chem **17**(3): 618-630.

Bazwinsky, I., H. Hilbig, H. J. Bidmon and R. Rubsamen (2003). "Characterization of the human superior olivary complex by calcium binding proteins and neurofilament H (SMI-32)." J Comp Neurol **456**(3): 292-303.

Bommel, H., G. Xie, W. Rossoll, S. Wiese, S. Jablonka, T. Boehm and M. Sendtner (2002). "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 **159**(4): 563-569.

Borasio, G. D., W. Robberecht, P. N. Leigh, J. Emile, R. J. Guilloff, F. Jerusalem, V. Silani, P. E. Vos, J. H. Wokke and T. Dobbins (1998). "A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group." Neurology **51**(2): 583-586.

Bourk, T. R., J. P. Mielcarz and B. E. Norris (1981). "Tonotopic organization of the anteroventral cochlear nucleus of the cat." Hear Res **4**(3-4): 215-241.

Braun, M. (1999). "Auditory midbrain laminar structure appears adapted to f0 extraction: further evidence and implications of the double critical bandwidth." Hear Res **129**(1-2): 71-82.

Brown, M. C. (1987). "Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea." J Comp Neurol **260**(4): 605-618.

Bulinski, J. C. and G. G. Gundersen (1991). "Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis." Bioessays **13**(6): 285-293.

Cao, P., A. Maximov and T. C. Sudhof (2011). "Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled by the Ca²⁺-sensor synaptotagmin-10." Cell **145**(2): 300-311.

Caspary, D. M., L. Ling, J. G. Turner and L. F. Hughes (2008). "Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system." J Exp Biol **211**(Pt 11): 1781-1791.

Cho, T. H., C. Fischer, N. Nighoghossian, M. Hermier, M. Sindou and F. Mauguiere (2005). "Auditory and electrophysiological patterns of a unilateral lesion of the lateral lemniscus." Audiol Neurootol **10**(3): 153-158.

Cooper, N. P. and J. J. Guinan, Jr. (2006). "Efferent-mediated control of basilar membrane motion." J Physiol **576**(Pt 1): 49-54.

Darrow, K. N., S. F. Maison and M. C. Liberman (2006). "Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity." Nat Neurosci **9**(12): 1474-1476.

Doleviczenyi, Z., G. Halmos, G. Repassy, E. S. Vizi, T. Zelles and B. Lendvai (2005). "Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission." Neurosci Lett **385**(2): 93-98.

Elgoyhen, A. B. and E. Katz (2012). "The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse." J Physiol Paris **106**(1-2): 47-56.

Eybalin, M. (1993). "Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea." Physiol Rev **73**(2): 309-373.

Ferrer-Alcon, M., C. Winkler-Hirt, R. Madani, F. E. Perrin and A. C. Kato (2008). "Low intensity exercise attenuates disease progression and stimulates cell proliferation in the spinal cord of a mouse model with progressive motor neuronopathy." Neuroscience **152**(2): 291-295.

Fex, J. and R. A. Altschuler (1986). "Neurotransmitter-related immunocytochemistry of the organ of Corti." Hear Res **22**: 249-263.

Fink, J. K., S. M. Jones, C. Esposito and J. Wilkowski (1996). "Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: genomic organization, cDNA sequence, and developmental- and tissue-specific expression." Genomics **35**(3): 577-585.

Frago, L. M., S. Canon, E. J. de la Rosa, Y. Leon and I. Varela-Nieto (2003). "Programmed cell death in the developing inner ear is balanced by nerve growth factor and insulin-like growth factor I." J Cell Sci **116**(Pt 3): 475-486.

Gekle, M., E. Wischmeyer, S. Gründer, M. Peterson and A. Schwab (2010). Taschenlehrbuch Physiologie, Thieme.

Giess, R., B. Holtmann, M. Braga, T. Grimm, B. Muller-Myhsok, K. V. Toyka and M. Sendtner (2002). "Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene." Am J Hum Genet **70**(5): 1277-1286.

Gonzalez-Billault, C., E. M. Jimenez-Mateos, A. Caceres, J. Diaz-Nido, F. Wandosell and J. Avila (2004). "Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system." J Neurobiol **58**(1): 48-59.

Grassi, D., F. B. Plonka, M. Oksdath, A. N. Guil, L. J. Sosa and S. Quiroga (2015). "Selected SNARE proteins are essential for the polarized membrane insertion of igf-1 receptor and the regulation of initial axonal outgrowth in neurons." Cell Discov **1**: 15023.

Guinan, J. J., Jr. (2006). "Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans." Ear Hear **27**(6): 589-607.

Guinan, J. J., Jr., W. B. Warr and B. E. Norris (1984). "Topographic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex." J Comp Neurol **226**(1): 21-27.

Hallworth, R. and R. F. Luduena (2000). "Differential expression of beta tubulin isotypes in the adult gerbil cochlea." Hear Res **148**(1-2): 161-172.

Hallworth, R., M. McCoy and J. Polan-Curtain (2000). "Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti." Hear Res **139**(1-2): 31-41.

Harris, J. M. and R. B. Chess (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." Nat Rev Drug Discov **2**(3): 214-221.

Hernandez-Zamora, E. and A. Poblano (2014). "[The auditory pathway: levels of integration of information and principal neurotransmitters]." Gac Med Mex **150**(5): 450-460.

Holtmann, B., J. Zielasek, K. V. Toyka and M. Sendtner (1999). "Comparative analysis of motoneuron loss and functional deficits in PMN mice: implications for human motoneuron disease." Journal of the Neurological Sciences **169**(1-2): 140-147.

Holtmann, B., J. Zielasek, K. V. Toyka and M. Sendtner (1999). "Comparative analysis of motoneuron loss and functional deficits in PMN mice: implications for human motoneuron disease." J Neurol Sci **169**(1-2): 140-147.

Hughes, R. A., M. Sendtner and H. Thoenen (1993). "Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo." J Neurosci Res **36**(6): 663-671.

Hunter, C., K. Doi and R. J. Wenthold (1992). "Neurotransmission in the auditory system." Otolaryngol Clin North Am **25**(5): 1027-1052.

Hurley, L. M. and I. C. Hall (2011). "Context-dependent modulation of auditory processing by serotonin." Hear Res **279**(1-2): 74-84.

Hutton, M., J. Lewis, D. Dickson, S. H. Yen and E. McGowan (2001). "Analysis of tauopathies with transgenic mice." Trends Mol Med **7**(10): 467-470.

Ishihara, T., M. Hong, B. Zhang, Y. Nakagawa, M. K. Lee, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1999). "Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform." Neuron **24**(3): 751-762.

Jablonka, S., B. Holtmann, M. Sendtner and F. Metzger (2011). "Therapeutic effects of PEGylated insulin-like growth factor I in the pmn mouse model of motoneuron disease." Exp Neurol **232**(2): 261-269.

Jensen-Smith, H. C., J. Eley, P. S. Steyger, R. F. Luduena and R. Hallworth (2003). "Cell type-specific reduction of beta tubulin isotypes synthesized in the developing gerbil organ of Corti." J Neurocytol **32**(2): 185-197.

Kirschner, M. and T. Mitchison (1986). "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." Cell **45**(3): 329-342.

Kortazar, D., M. L. Fanarraga, G. Carranza, J. Bellido, J. C. Villegas, J. Avila and J. C. Zabala (2007). "Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation." Exp Cell Res **313**(3): 425-436.

Krieger, F., N. Elflein, S. Saenger, E. Wirthgen, K. Rak, S. Frantz, A. Hoeflich, K. V. Toyka, F. Metzger and S. Jablonka (2014). "Polyethylene glycol-coupled IGF1 delays motor function defects in a mouse model of spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1." Brain **137**(Pt 5): 1374-1393.

- Krieger, F., F. Metzger and S. Jablonka (2014). "Differentiation defects in primary motoneurons from a SMARD1 mouse model that are insensitive to treatment with low dose PEGylated IGF1." Rare Dis **2**: e29415.
- Lai, E. C., K. J. Felice, B. W. Festoff, M. J. Gawel, D. F. Gelinas, R. Kratz, M. F. Murphy, H. M. Natter, F. H. Norris and S. A. Rudnicki (1997). "Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group." Neurology **49**(6): 1621-1630.
- Leake, P. A., O. Stakhovskaya, A. Hetherington, S. J. Rebscher and B. Bonham (2013). "Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and electrical stimulation on survival and function of cochlear spiral ganglion neurons in deafened, developing cats." J Assoc Res Otolaryngol **14**(2): 187-211.
- Lee, K. Y., T. Nakagawa, T. Okano, R. Hori, K. Ono, Y. Tabata, S. H. Lee and J. Ito (2007). "Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel." Otol Neurotol **28**(7): 976-981.
- Liem, F., T. Zaehle, A. Burkhard, L. Jancke and M. Meyer (2012). "Cortical thickness of supratemporal plane predicts auditory N1 amplitude." Neuroreport **23**(17): 1026-1030.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson and A. Efstratiadis (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)." Cell **75**(1): 59-72.
- Luduena, R. F. (1998). "Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications." Int Rev Cytol **178**: 207-275.
- Lustig, L. R. (2006). "Nicotinic acetylcholine receptor structure and function in the efferent auditory system." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **288**(4): 424-434.
- Maison, S. F., J. C. Adams and M. C. Liberman (2003). "Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization." J Comp Neurol **455**(3): 406-416.
- Maison, S. F., E. Casanova, G. R. Holstein, B. Bettler and M. C. Liberman (2009). "Loss of GABAB receptors in cochlear neurons: threshold elevation suggests modulation of outer hair cell function by type II afferent fibers." J Assoc Res Otolaryngol **10**(1): 50-63.
- Mese, G., G. Richard and T. W. White (2007). "Gap junctions: basic structure and function." J Invest Dermatol **127**(11): 2516-2524.
- Metzger, F., W. Sajid, S. Saenger, C. Staudenmaier, C. van der Poel, B. Sobottka, A. Schuler, M. Sawitzky, R. Poirier, D. Tuerck, E. Schick, A. Schaubmar, F. Hesse, K. Amrein, H. Loetscher, G. S. Lynch, A. Hoeflich, P. De Meyts and H. J. Schoenfeld (2011). "Separation of fast from slow anabolism by site-specific PEGylation of insulin-like growth factor I (IGF-I)." J Biol Chem **286**(22): 19501-19510.
- Mhatre, A. N., B. Tajudeen, E. M. Welt, C. Wartmann, G. R. Long and A. K. Lalwani (2010). "Temporary reduction of distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) immediately following auditory brainstem response (ABR)." Hear Res **269**(1-2): 180-185.

Murillo-Cuesta, S., L. Rodriguez-de la Rosa, R. Cediell, L. Lassaletta and I. Varela-Nieto (2011). "The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing." Front Mol Neurosci **4**: 11.

Musiek, F. E. (1986). "Neuroanatomy, neurophysiology, and central auditory assessment. Part II: The cerebrum." Ear Hear **7**(5): 283-294.

Musiek, F. E. and J. A. Baran (1986). "Neuroanatomy, neurophysiology, and central auditory assessment. Part I: Brain stem." Ear Hear **7**(4): 207-219.

Nakagawa, T., T. Sakamoto, H. Hiraumi, Y. S. Kikkawa, N. Yamamoto, K. Hamaguchi, K. Ono, M. Yamamoto, Y. Tabata, S. Teramukai, S. Tanaka, H. Tada, R. Onodera, A. Yonezawa, K. Inui and J. Ito (2010). "Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial." BMC Med **8**: 76.

Neff, N. T., D. Pevette, L. J. Houenou, M. E. Lewis, M. A. Glicksman, Q. W. Yin and R. W. Oppenheim (1993). "Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival." J Neurobiol **24**(12): 1578-1588.

Ota, C. Y. and R. S. Kimura (1980). "Ultrastructural study of the human spiral ganglion." Acta Otolaryngol **89**(1-2): 53-62.

Parker, K., A. Berretta, S. Saenger, M. Sivaramakrishnan, S. A. Shirley, F. Metzger and A. N. Clarkson (2017). "PEGylated insulin-like growth factor-I affords protection and facilitates recovery of lost functions post-focal ischemia." Sci Rep **7**(1): 241.

Pollak, G. D., R. M. Burger and A. Klug (2003). "Dissecting the circuitry of the auditory system." Trends Neurosci **26**(1): 33-39.

Rak, K., S. Frenz, A. Radeloff, J. Groh, S. Jablonka, R. Martini, R. Hagen and R. Mlynski (2013). "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." Exp Neurol **250**: 333-340.

Ren, D. (2011). "Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors." Neuron **72**(6): 899-911.

Rommel, C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001). "Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways." Nat Cell Biol **3**(11): 1009-1013.

Saenger, S., C. Goeldner, J. R. Frey, L. Ozmen, S. Ostrowitzki, W. Spooren, T. M. Ballard, E. Prinssen, E. Borroni and F. Metzger (2011). "PEGylation enhances the therapeutic potential for insulin-like growth factor I in central nervous system disorders." Growth Horm IGF Res **21**(5): 292-303.

Schmalbruch, H., H. J. Jensen, M. Bjaerg, Z. Kamieniecka and L. Kurland (1991). "A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy." J Neuropathol Exp Neurol **50**(3): 192-204.

Schünke, M., E. Schulte and U. Schumacher (2006). Prometheus Lernatlas der Anatomie, Kopf, Hals und Neuroanatomie, Thieme

- Sendtner, M., H. Schmalbruch, K. A. Stockli, P. Carroll, G. W. Kreutzberg and H. Thoenen (1992). "Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy." Nature **358**(6386): 502-504.
- Sferra, A., G. Baillat, T. Rizza, S. Barresi, E. Flex, G. Tasca, A. D'Amico, E. Bellacchio, A. Ciolfi, V. Caputo, S. Cecchetti, A. Torella, G. Zanni, D. Diodato, E. Piermarini, M. Niceta, A. Coppola, E. Tedeschi, D. Martinelli, C. Dionisi-Vici, V. Nigro, B. Dallapiccola, C. Compagnucci, M. Tartaglia, G. Haase and E. Bertini (2016). "TBCE Mutations Cause Early-Onset Progressive Encephalopathy with Distal Spinal Muscular Atrophy." Am J Hum Genet **99**(4): 974-983.
- Slepecky, N. B., C. G. Henderson and S. Saha (1995). "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 **91**(1-2): 136-147.
- Slepecky, N. B. and M. Ulfendahl (1992). "Actin-binding and microtubule-associated proteins in the organ of Corti." Hear Res **57**(2): 201-215.
- Sorenson, E. J., A. J. Windbank, J. N. Mandrekar, W. R. Bamlet, S. H. Appel, C. Armon, P. E. Barkhaus, P. Bosch, K. Boylan, W. S. David, E. Feldman, J. Glass, L. Gutmann, J. Katz, W. King, C. A. Luciano, L. F. McCluskey, S. Nash, D. S. Newman, R. M. Pascuzzi, E. Piore, L. J. Sams, S. Scelsa, E. P. Simpson, S. H. Subramony, E. Tiryaki and C. A. Thornton (2008). "Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial." Neurology **71**(22): 1770-1775.
- Steyger, P. S., D. N. Furness, C. M. Hackney and G. P. Richardson (1989). "Tubulin and microtubules in cochlear hair cells: comparative immunocytochemistry and ultrastructure." Hear Res **42**(1): 1-16.
- Streppel, M., M. Walger, H. v. Wedel and E. Gaber (2006). Themenheft 29 "Hörstörungen und Tinnitus", Robert Koch-Institut: 42.
- Tannenbaum, J. and N. B. Slepecky (1997). "Localization of microtubules containing posttranslationally modified tubulin in cochlear epithelial cells during development." Cell Motil Cytoskeleton **38**(2): 146-162.
- Tian, G., Y. Huang, H. Rommelaere, J. Vandekerckhove, C. Ampe and N. J. Cowan (1996). "Pathway leading to correctly folded beta-tubulin." Cell **86**(2): 287-296.
- Usami, S. I., Y. Takumi, A. Matsubara, S. Fujita and O. P. Ottersen (2001). "Neurotransmission in the vestibular endorgans--glutamatergic transmission in the afferent synapses of hair cells." Biol Sci Space **15**(4): 367-370.
- Vetter, D. E., E. Katz, S. F. Maison, J. Taranda, S. Turcan, J. Ballesteros, M. C. Liberman, A. B. Elgoyhen and J. Boulter (2007). "The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20594-20599.
- Vetter, D. E., M. C. Liberman, J. Mann, J. Barhanin, J. Boulter, M. C. Brown, J. Saffioti-Kolman, S. F. Heinemann and A. B. Elgoyhen (1999). "Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation." Neuron **23**(1): 93-103.
- Volkenstein, S., D. Brors, S. Hansen, A. Berend, R. Mlynski, C. Aletsee and S. Dazert (2009). "Auditory development in progressive motor neuronopathy mouse mutants." Neurosci Lett **465**(1): 45-49.

Warren, E. H., 3rd and M. C. Liberman (1989). "Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. Contributions of cochlear efferents." Hear Res **37**(2): 89-104.

Wedemeyer, C., J. Zorrilla de San Martin, J. Ballesterro, M. E. Gomez-Casati, A. V. Torbidoni, P. A. Fuchs, B. Bettler, A. B. Elgoyhen and E. Katz (2013). "Activation of presynaptic GABA(B(1a,2)) receptors inhibits synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear-hair cell synapses." J Neurosci **33**(39): 15477-15487.

Wersinger, E., W. J. McLean, P. A. Fuchs and S. J. Pyott (2010). "BK channels mediate cholinergic inhibition of high frequency cochlear hair cells." PLoS One **5**(11): e13836.

Winer, J. A. (1984). "The human medial geniculate body." Hear Res **15**(3): 225-247.

Ye, Z., J. D. Goutman, S. J. Pyott and E. Glowatzki (2017). "mGluR1 enhances efferent inhibition of inner hair cells in the developing rat cochlea." J Physiol **595**(11): 3483-3495.

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vergleich Phänotyp wt- und pmn-Maus	10
Abb. 2: Mittelwerte der Hörschwellen DPOAE der untersuchten Gruppen (Alter: P21) bei sechs Frequenzen	27
Abb. 3: Mittelwerte der Hörschwellen DPOAE der untersuchten Gruppen (Alter: P28) bei sechs Frequenzen	28
Abb. 4: Anzahl (N) der ÄHZ pro 100 μm der untersuchten Gruppen (Y-Achse)	29
Abb. 5: Boxplots mit Min. und Max. Whiskers, Hörschwellen Click-BERA der untersuchten Gruppen in dB SPL (Y-Achse)	31
Abb. 6: Durchschnitt und Standardabweichung Latenz Welle 2 Click-BERA in Millisekunden (Y-Achse) der untersuchten Gruppen bei SPLs von 30 bis 90 dB	32
Abb. 7: Durchschnitt und Standardabweichung Latenzdifferenz Welle 1 und 2 Click-BERA der untersuchten Gruppen in Millisekunden (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB	34
Abb. 8: Durchschnitt und Standardabweichung Amplitude Welle 1 in Mikrovolt (Y-Achse) Click-BERA der untersuchten Gruppen bei SPL von 30–90 dB	36
Abb. 9: Durchschnitt und Standardabweichung Amplitude Welle 2 Click-BERA in Mikrovolt (Y-Achse) der untersuchten Gruppen bei SPL von 30–90 dB	38
Abb. 10: Mittelwerte der Hörschwellen der BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen (P21) in dB SPL (Y-Achse)	41
Abb. 11: Mittelwerte der Hörschwellen der BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen (P28) in dB SPL (Y-Achse)	42
Abb. 12: Durchschnitt Latenzen Welle 2 der BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Millisekunden (Y-Achse)	44
Abb. 13: Durchschnitt Latenzdifferenz zwischen Welle 1 und 2 der BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Millisekunden (Y-Achse)	46
Abb. 14: Durchschnitt Amplituden Welle 1 der BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Mikrovolt (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB	48
Abb. 15: Durchschnitt Amplituden Welle 2 der BERA zwischen 4 und 24 kHz der untersuchten Gruppen in Mikrovolt (Y-Achse) bei SPL von 30–90 dB	50

Abb. 16: Anzahl (N) β -III-positiver Spiralganglienfasern pro 100 μ m der untersuchten Gruppen (Y-Achse)	51
Abb. 17: mittlerer Graustufenwert zu Fläche cholinerges Synapsen an P21	52
Abb. 18: mittlerer Graustufenwert cholinerges Synapsen an P28.....	53
Abb. 19: Fläche cholinerges Synapsen an P21	54
Abb. 20: Fläche cholinerges Synapsen an P28	55
Abb. 21: Wholemoutpräparation der Cochlea p21 wt.....	56
Abb. 22: Wholemoutpräparation der Cochlea p21 pmn.....	57
Abb. 23: Wholemoutpräparation der Cochlea p28 wt.....	58
Abb. 24: Wholemoutpräparation der Cochlea p28 pmn.....	59

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mittelwerte der Latenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21	33
Tab. 2: Mittelwerte der Latenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28	33
Tab. 3: Mittelwerte der Latenzdifferenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21	35
Tab. 4: Mittelwerte der Latenzdifferenz mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28	35
Tab. 5: Mittelwerte der Amplitude von Welle 1 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21	37
Tab. 6: Mittelwerte der Amplitude von Welle 1 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28	37
Tab. 7: Mittelwerte der Amplitude von Welle 2 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P21	39
Tab. 8: Mittelwerte der Amplitude von Welle 2 mit Standardabweichung (SD) bei verschiedenen SPLs und P28	39

IV. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Linda Bieniussa, die diese Dissertation zu jeder Zeit mit größter Motivation und Expertise betreut hat. Ich kann nur jedem Promotionsstudenten eine solche Betreuerin wünschen. Deine Hilfsbereitschaft und Ausdauer schätze ich wirklich sehr an dir.

Ebenso danke ich Priv.-Doz. Dr. med. Kristen Rak für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, die Unterstützung bei der Fällung wichtiger Entscheidungen im Rahmen der weiteren Vorgehensweise und die Hilfe bei der endgültigen Fertigstellung dieser Doktorarbeit.

Ich danke dem ganzen Team des HNO-Forschungslabors, das mir durch die Bank freundlich und hilfsbereit gegenüberstand. Besonders möchte ich Laura Halbhuber danken, die mir bei jeder Frage weiterhelfen konnte und mich tatkräftig bei der Durchführung der Laborarbeiten unterstützt hat.

Zusätzlich möchte ich den Mitarbeiter*innen des Instituts für klinische Neurobiologie danken, die für die Entdeckung der pmn-Maus und die Versorgung aller hier verwendeten Mäuse verantwortlich sind. Vor allem Regine Sendtner, mit der ich bei der Organisation der Tiere in regem Kontakt stand, wird mir mit ihrer überaus freundlichen und interessierten Art positiv in Erinnerung bleiben.

Danke an Rene Ehrenmann Sampers für das Korrekturlesen der Arbeit.

Zuletzt ein herzliches Danke an meine Freundin Eva für die durchgängige Unterstützung, du bist die Beste.