Einfluss der β-Sekretase BACE1 auf die Signalverarbeitung im auditiven System der Maus

Institut für Physiologie und Pathophysiologie

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. med.

vorgelegt von

Philip Möser

Als Dissertation genehmigt
von der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2022

Gutachter/in: Priv.-Doz. Dr. Dr. Tobias Huth
Prof. Dr. Christian Alzheimer

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract 1
2. Zusammenfassung 3
3. Einleitung 5
3.1 Morbus Alzheimer – Geschichte, Klinik und die Amyloidhypothese 5
3.2 Die β-Sekretase1 (BACE1): Rolle als Protease und Interaktionspartner im peripheren und zentralen Nervensystem 7
3.2.1 BACE1 im peripheren und zentralen Nervensystem 8
3.2.2 Interaktion von BACE1 mit der Familie der KCNQ-Kanäle 9
3.3 Aktuelle Studienlage in der Behandlung des M. Alzheimer 10
3.4 Die Hörbahn der Maus und deren elektrophysiologische Äquivalente in der BERA 11
3.5 Einfluss des Schalldruckpegels auf Innenohrschäden 13
4. Material und Methoden 15
4.1 Mauslinien 15
4.1.1 BACE1$^{-/-}$-Mäuse und Zuchthaltung 15
4.1.2 Genotypisierung 15
4.2 Hörschwellen-, Latenz- und Amplitudenbestimmung mittels BERA 17
4.2.1 Wahl und Transport der Versuchstiere 17
4.2.2 Die BERA-Setups 17
4.2.3 Versuchsvorbereitungen und Narkotisierung – Brainstem evoked response audiometry (BERA) 18
4.2.4 Tötung der Tiere 19
4.2.5 Hörschwellen-, Latenz- und Amplitudenbestimmung der BACE1$^{-/-}$- und WT-Maus-BERAs 19
4.3 Etablierung einer Versuchsreihe mit akustischem Stress 20
4.3.1 Setzen eines Schalltraumas 20
4.3.2 Präparation und Fixierung der Cochlea im Whole-mount-Verfahren 20
4.3.3 Lagerung der Cochleae 22
4.3.4 Färbung der Cortiorgane und Haltbarkeit der Präparate 22
4.3.5 Imaging mit dem konfokalen Mikroskop 23
4.4 BACE1-Inhibitor NB-360-Behandlung 23
4.5 Auswertung und statistische Analyse der Daten 24
5. Ergebnisse 25
5.1 BACE1$^{-/-}$-Mäuse weisen erhöhte Hörschwellen auf. 25

5.2 Die Latenz der Welle I (P1) ist in der BERA von BACE1$^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren verlängert 27

5.3 Signaltransduktion entlang der Hörbahn von BACE1$^{-/-}$-Mäusen 28

5.4 BACE1$^{-/-}$-Mäuse zeigen auffällige Amplituden in der evozierten Hirnstammaudiometrie. 30

5.5 Methodische Etablierung der Vertäubung, Präparation und Färbung von BACE1-knockout-Cochleae 32

5.6 Effekt einer sechswöchigen BACE1-/BACE2-Inhibitor-Behandlung mit NB-360 auf C57BL/6N-Mäuse 38

5.6.1 Eine sechswöchige NB-360-Verabreichung verursacht eine Störung der Melaninsynthese. 38

5.6.2 Die sechswöchige BACE1/2-Inhibition mit NB-360 beeinträchtigt die Hörschwellen nicht. 40

5.6.3 Sechs Wochen der NB-360-Verabreichung haben keinen Einfluss auf die Latenzen und Interlatenzen im auditorischen System. 42

5.6.4 Die sechswöchige NB-360-Gabe bewirkt keine Veränderung der Amplituden. 45

6. Diskussion 47

6.1 BACE1 ist bedeutsam in der Entwicklung des peripher-nervalen auditorischen Systems 47

6.2 Die sechswöchige BACE1/BACE2-Inhibition hat keinen Effekt auf die Elektrophysiologie des auditorischen Systems von C57BL/6-Mäusen. 51

7. Literatur- und Quellenverzeichnis 53

8. Anhang 65

8.1 Publikationsverzeichnis 65

8.2 Danksagung 65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BACE1	β- site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1
BERA	Brainstem evoked response audiometry
DPOAE	Distorsiv produzierte otoakustische Emissionen
Ggl.	Ganglion
IHC	inner hair cell (innere Haarzelle)
inf.	inferior
KO	Knockout
M.	Morbus
N.	nervus
NGSB	normal goat serum buffer
NRG1	Neuregulin 1
OHC	outer hair cell (äußere Haarzelle)
p	postpartum
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
SEM	standard error of the mean value (Standardfehler des Mittelwertes)
SGN	spiral ganglion neuron(s) (spiralganglionäre[r] Nerv[en])
SPL	sound pressure level (Schalldruckpegel)
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1	Vorbereitungen für die BERA-Messung	19
Abb. 4.2	Präparationsschritte der Cochleapräparation einer C57BL6-Maus	21
Abb. 5.1	Audiometrien und Hörschwellen der C57BL/6-N- und BACE1$^{-/-}$-Population bei 16 kHz	26
Abb. 5.2	Exemplarische BERA-Rohspuren und P1-Latenzen bei 16 kHz in BACE1$^{-/-}$- und WT-Mäusen	28
Abb. 5.3	Interlatenzen für 16 kHz in BACE1$^{-/-}$- und WT-Mäusen bei 80 dB und 20 dB über der Hörschwelle	30
Abb. 5.4	Amplituden der Wellen P1–P5 bei 16 kHz in BACE1$^{-/-}$- und WT-Mäusen bei 80 dB und 20 dB über der Hörschwelle	31
Abb. 5.5	Hörschwellen von Wildtyp- und BACE1$^{-/-}$-Mäusen vor und nach Lärmbelastung	33
Abb. 5.6	BACE1-Expression in Cortiorganen von BACE1$^{-/-}$- und Wildtyp-Mäusen	35
Abb. 5.7	Immunhistochemische Darstellung präsynaptischer Strukturen Synapsin-gefärbter, unvertäubter und vertäubter Cortiorgane von BACE1$^{-/-}$- und Wildtyp-Mäusen	37
Abb. 5.8	Fellphänotypen nach einer sechswöchigen Behandlung mit NB-360	39
Abb. 5.9	Hörschwellen von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen	41
Abb. 5.10	Frequenzspezifische P1-Latenz von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen	43
Abb. 5.11	Frequenzspezifische Interlatenzen von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen	44

Abb. 5.12	Frequenzspezifische Wellenamplituden von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	Sequenzen der Exon- und Neoprimer	16
Tabelle 4.2	PCR-Protokoll	16
Tabelle 5.1	Frequenzspezifische Interlatenzen von unbehandelten C57BL6/N-Mäusen gegenüber NB-360-behandelten Tieren	45

1. Abstract

Background: According to our current knowledge, β-secretase 1 (BACE1) is a central part of the amyloid hypothesis and therefore has a key role in Alzheimer's' pathogenesis. Thus, it is a promising medical target for treating patients with Alzheimer's disease. Since it has not yet been possible to develop a beneficial anti-BACE1 therapy, many aspects of the pathophysiology are still not understood. It is therefore important to obtain better insight into the role of BACE1 in the complexity of disease progression.

A proteolytic function has already been described in which BACE1 plays an important role in the myelination of peripheral nerve fibers and the development of neuromuscular junctions. BACE1 has also been identified as an interactive partner of the KCNQ family, which is expressed neuronal (KCNQ 2–5) and located in the inner ear (KCNQ1,4). Especially in the inner ear, these channels mediate potassium currents through the cell membrane and influence the potassium content of the endolymph and the main conductivity of the basal membrane of outer hair cells (OHC). The influence of BACE1 on auditory processing, particularly in the inner ear, has not been investigated. The hypothesis of this work is that hearing in BACE1-knockout mice is impaired.

Methods and Objectives: With brainstem evoked response audiometry (BERA), we (1) examined Bace1^{tm1Psa} knockout mice for alterations in hearing thresholds, wave amplitudes, and wave latencies. Furthermore, (2) we investigated if C57BL/6-N mice have electrophysiological differences in BERA after feeding them NB-360 (Novartis Pharma), a sufficient blood–brain barrier permeable BACE1/BACE2 inhibitor, for six weeks. Lastly (3), we established a model to cause synaptic damage in BACE1 deficient mice by noise-induced hearing loss. The long-term objective is to examine the vulnerability and regenerative potential of synaptic connections between inner hair cells (IHC) and type-I afferences of the spiral ganglion (SGN) depending on BACE1 expression.

Results and Observations: Adult BACE1 knockout mice showed a significant increase in hearing thresholds compared to those of wild-type litter mates. We also identified prolonged latencies of wave P1 (a characteristic wave formation in BERA assigned to the auditory path

of mice) in BERA recordings. For suprathreshold sound pressure levels, we observed a decrease in amplitudes from P1 to P4 and prolonged interlatencies from P1 to P5 in BACE1 knockout mice. After six weeks of feeding the mice NB-360, we could not detect any alterations in BERA. An audiometric trauma model was successfully established to investigate possible neuroregenerative aspects mediated by BACE1 in the future.

Conclusion: Unlike what was initially proposed, protease BACE1 impacts the postnatal myelination of spiral ganglion neurons and the formation of synapses between IHC and SGN (Dierich et al. 2019). The genetic silencing of BACE1 leads to morphological alterations and the functional impairment of signal processing in the auditory path in mice. The NB-360 trial data support a peripheral developmental origin of sound sensing disorder. My data also suggests an influence of BACE1 on central auditory processing, but further studies are required. Six weeks of the pharmacologic silencing of BACE1 and BACE2 in adult mice did not impact the morphology or functionality of the inner ear or the following auditory path. Nevertheless, a homeostatic function of BACE1 was not fully ruled out. The long-term consequences of permanent BACE1-inhibitor treatment on the auditive system can therefore not be excluded. Parts of this work were published in Dietrich et al. 2019.

2. Zusammenfassung

Hintergrund: Nach gegenwärtiger Auffassung spielt die β-sekretase1 (BACE1) im Rahmen der Amyloidhypothese eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer und stellt daher ein vielversprechendes medikamentöses Ziel dar. Bestrebungen, eine Anti-BACE1-Therapie zu entwickeln, waren bislang erfolglos, sodass viele Aspekte der Pathophysiologie noch unverstanden erscheinen. Um die komplexe Kaskade der Krankheitsentstehung zu entschlüsseln, werden die physiologischen Funktionen der BACE1 erforscht. So wurde eine proteolytische Funktion beschrieben, über die BACE1 eine zentrale Rolle in der Myelinisierung peripherer Nerven und der Ausbildung motorischer Endplatten einnimmt. Darüber hinaus wurde BACE1 als direkter Interaktionspartner der Familie der KCNQ-Kanäle identifiziert, die Kaliumströme über Zellmembranen mediieren und sowohl neuronal (KCNQ 2–5) als auch im Innenohr (KCNQ 1,4) exprimiert werden. Im Innenohr nehmen sie Einfluss auf den Kaliumgehalt der Endolymphe und auf die Leitfähigkeit der basalen Membran äußerer Haarzellen (OHC). Ob BACE1 dadurch das Hörvermögen von Mäusen beeinflusst, wurde bislang nicht beschrieben. Auf Grundlage zuvor genannter Aspekte war die Hypothese für diese Arbeit, dass die Hörfunktion in BACE1-knockout-Mäusen beeinträchtigt ist. Folglich untersuchten wir den Einfluss der BACE1 auf die Funktion des auditiven Systems, insbesondere der peripheren Anteile.

Methoden und Ziele: In dieser Arbeit wurden mit Hilfe evozierter Hirnstammaudiometrie (BERA) (1) Tiere der Bace1^{tm1Psa}-knockout-Mauslinie auf elektrophysiologische Auffälligkeiten der Hörschwellen, Amplituden und Latenzen untersucht. Zudem untersuchten wir (2) C57BL/6-N-Mäuse nach sechswöchiger oraler Verabreichung des BACE1/BACE2-Inhibitors NB-360 (Novartis Pharma) auf elektrophysiologische Veränderungen in der Hirnstammaudiometrie. Es wurde (3) die Etablierung einer Versuchsreihe zur Verursachung lärmbedingter synaptischer Schäden in BACE1-defizienten Mäusen beschrieben. Das zukünftige Ziel besteht darin, die Vulnerabilität und das Regenerationspotential synaptischer Verbindungen zwischen inneren Haarzellen (IHC) und den Typ-I-Afferenzen der spiralganglionären Neurone (SGN) zu untersuchen.

Ergebnisse und Beobachtungen: (1) Adulte BACE1-knockout-Mäuse weisen eine deutlich erhöhte Hörschwelle gegenüber ihren Wildtypgeschwistern auf. Dazu passend zeigten sich Latenzverlängerungen in der ersten positiven Reizantwort (P1) der evozierten Hirnstammaudiometrie. Bei überschwelligen Schalldruckpegeln konnten wir bei BACE1$^{-/-}$-Mäusen

Amplitudenminderungen in P1–P4 sowie Interlatenzverlängerungen zwischen P1 und P5 identifizieren. (2) Nach sechswöchiger Verabreichung von NB-360, einem Blut-Hirn-Schranken-gängigen BACE1/BACE2-Inhibitor, konnten keine Auffälligkeiten in den BERAs detektiert werden. (3) In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Schalltrauma-Modell etabliert werden, um mögliche neuroprotektive Effekte der BACE1 zu untersuchen.

Schlussfolgerungen: BACE1 spielt als Protease eine zentrale Rolle in der postnatalen Entwicklung der spiralganglionären Myelinisierung und der Ausbildung suffizienter Synapsen zwischen inneren Haarzellen (IHC) und spiralganglionären Neuronen (SGN) (Dierich et al. 2019). Die genetische Ausschaltung von BACE1 führt in Mäusen zu morphologisch und funktionell bedingten Störungen der Signalweiterleitung. Die Daten aus den NB-360-Inhibitor-Versuchen untermauern dabei einen peripheren, entwicklungsbedingten Ursprung der Schallempfindungsstörung. Anhand unserer elektrophysiologischen Daten erscheint ein Einfluss der BACE1 auf die Synapsen zentraler Hörbahnanteile wahrscheinlich, es bedarf hier jedoch weiterer Untersuchungen. Eine sechswöchige medikamentöse Ausschaltung von BACE1 & BACE2 hat im auditiven System keine morphologischen Veränderungen oder funktionellen Einschränkungen zur Folge. Die Auswirkung einer langfristigen BACE1-Inhibition auf das auditive System ist bislang nicht ausreichend untersucht. Eine homöostatische Funktion der BACE1 bezüglich der Myelinisierung und der Synapsenunterhaltung an den inneren Haarzellen kann anhand der aktuellen Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Teile dieser Arbeit wurden in Dierich et al. 2019 veröffentlicht.

3. Einleitung

3.1 Morbus Alzheimer – Geschichte, Klinik und die Amyloidhypothese

Beim Morbus (M.) Alzheimer handelt es sich um eine erstmals im Jahre 1906 beschriebene Erkrankung des Gehirns (Alzheimer 1907), die eine chronische Form der Neurodegeneration umfasst und mit einer progredienten Hirnatrophie einhergeht (Gao & Hong 2008, Behl et al. 2020). Zwei Drittel aller Demenzerkrankungen sind auf einen M. Alzheimer zurückzuführen, der somit die häufigste Ursache einer Demenz darstellt (Weyerer 2005, Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung 2011). Hierbei handelt es sich um ein wachsendes Problem in der heutigen Gesellschaft: Die Lebenserwartung der Menschen steigt (Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung 2011) und es existiert weder Heilung noch eine krankheitsmodifizierende medikamentöse Therapie (Rombouts et al. 2021). Das Erkrankungsalter eines Patienten bzw. einer Patientin mit einer klassischen senilen Form des M. Alzheimer liegt bei ≥ 65 Jahren, wobei eine jährliche Inzidenz von circa 1 % für über 65-Jährige zu verzeichnen ist (Bickel 2005, Weyerer 2005). Hinzu kommt, dass die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit steigendem Alter (≥ 65a) exponentiell zunimmt. Allein für Deutschland ergibt sich eine geschätzte Zahl von 120.000 bis 160.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Weyerer 2005).

Klinisch kommt es zu einem schleichend-progressiven Prozess, dominiert durch kognitive Dysfunktionen, der mit Gedächtnisstörungen, Orientierungsstörungen und der Beeinträchtigung weiterer höherer kortikaler Funktionen (z. B. Lesen, Rechnen, Transferleistungen) einhergeht (Dilling 2015). Der hierfür als ursächlich angenommene Verlust des Neurotransmitters Acetylcholin (ACH) beruht womöglich auf einem Untergang cholinerger Neurone (Lombardo & Maskos 2015, Godyń et al. 2016, Behl et al. 2020), weshalb im Frühstadium der Erkrankung Acetylcholinesterasehemmer als symptomatische Therapie eingesetzt werden. In Metaanalysen konnte belegt werden, dass die kognitiven Leistungen der Patienten/-innen durch diese Therapie um bis zu sechs Monate verbessert werden können (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2007). In fortgeschritteneren Krankheitsstadien können die aktuellen medikamentösen Therapien den voranschreitenden neurodegenerativen Prozess schließlich kaum noch beeinflussen, woraus eine rasche Pflegebedürftigkeit resultiert. Nahrungsverweigerung und Folgen von Infektionen stellen dann häufige Todesursachen dar.

Nachdem bereits früh postuliert wurde, dass eine Beeinträchtigung des Hörens mit der Entwicklung kognitiver Dysfunktionen assoziiert ist (Uhlmann et al. 1989), konnte in mehreren prospektiven Beobachtungsstudien schließlich eine positive Korrelation zwischen bilateralen Hörverlusten und der Entwicklung einer Demenzerkrankung hergestellt werden (Lin et al.

2013, Fritze et al. 2016). Lin und Mitarbeiter/-innen zeigten auf, dass Patienten/-innen mit bereits vorliegender Hörminderung zum Studieneintritt (im Mittel 77 Jahre) ein 24 % höheres Risiko haben, im Verlauf kognitive Beeinträchtigungen zu entwickeln (Lin et al. 2013). Dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der initialen Hörminderung und dem Schweregrad der kognitiven Einschränkungen hergestellt.

Wie bei den meisten neurodegenerativen Erkrankungen, handelt es sich beim M. Alzheimer um einen chronisch progredienten Prozess. Dieser beginnt bereits mehrere Jahre vor klinischer Manifestation im *Locus coeruleus* und dessen Projektion in den *Hippocampus*, bevor er sich allmählich auf das gesamte Hirn ausbreitet (Braak et al. 2011). Die exakte Pathogenese des M. Alzheimer ist bislang nicht hinreichend aufgeklärt. Es existieren mehrere Hypothesen, von denen die Amyloidhypothese die am meisten Vertretene ist. Diese besagt, dass es aufgrund von interzellulärer Akkumulation und Polymerisierung von Amyloid-β1-42-Monomeren zu einer (tertiären) Proteinfehlfaltung (β-Faltblattstruktur) kommt, die wiederum zu einer Kaskade neurodegenerativer Prozesse führt (Querfurth & LaFerla 2010, Behl et al. 2020).

Unter physiologischen Bedingungen überwiegt eine sequentielle Spaltung des transmembranen *Amyloid Precursor Proteins* (APP) durch die α- und die γ-Sekretase (Mattson & Chan 2003). Bei den so generierten Spaltprodukten handelt es sich nicht per se um toxische Fragmente. Zudem existiert eine ausgewogene Amyloidclearance, die eine Akkumulation potentiell toxischen Amyloids verhindert (Hardy & Selkoe 2002). Das Überwiegen der sequentiellen Spaltung des überwiegend neuronal und glial lokalisierten transmembranen APP (Thinakaran & Koo 2008, U. C. Müller & Zheng 2012) durch die β-Sekretase1 (BACE1) und die γ-Sekretase wird als Beginn des pathogenen Pfades angesehen (Cole & Vassar 2008). Durch BACE1-Spaltung entstehen Amyloid-β1-42-Monomere, die in hoher Konzentration Oligomere ausbilden. Jene vollziehen daraufhin eine Konformationsänderung in die β-Faltblattstruktur und fallen aufgrund des niedrigen Löslichkeitsprodukts in der extrazellulären Matrix aus (Breydo et al. 2016, Sun & Roy 2018). Auf diese Weise entstehen die sog. β-Amyloidplaques (Roeters et al. 2017, Olsson et al. 2018), die aber im Vergleich zu den eben beschriebenen löslichen Oligomeren als weniger toxisch angesehen werden (Benilova et al. 2012). Die Amyloid-β-Oligomere und Amyloidplaques reichern sich an den neuronalen Zelloberflächen an und bewirken eine Veränderung der Zellstruktur (Drolle et al. 2012, Cecchi & Stefani 2013, Matsuzaki 2014, Wilkins & Swerdlow 2017). Infolgedessen wird die Verteilung der dort integrierten Rezeptorproteine und folglich die neuronale Signalübertragung gestört (Arispe et al.

1993, Haass & Selkoe 2007, Cecchi & Stefani 2013). Schreitet die Erkrankung weiter fort, kommt es aufgrund der beeinträchtigten Integrität der Zellmembran zu einer Porenbildung (Arispe et al. 1993, Demuro et al. 2011), was wiederrum zum Zelluntergang führen kann. Die löslichen Aβ-Oligomere induzieren außerdem über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Bamberger et al. 2003) eine endogene Neuroinflammation (Solleiro-Villavicencio & Rivas-Arancibia 2018), die die neurogliale Signalübertragung stört (Suescun et al. 2019) und zu neuronaler Degeneration beitragen kann (Tramutola et al. 2017). Ebenfalls wird eine durch Amyloid-β-Ablagerung angetriebene oder dadurch tolerierte Expansion mikrotubuliassoziierter Tauproteine diskutiert (Hampel et al. 2020), die unter physiologischen Bedingungen der Mikrotubulistabilisierung dienen, in erkrankten Gehirnen jedoch hyperphosphoryliert vorliegen (Goedert et al. 2006). Das hyperphosporylierte Tau bildet intraneuronale fibrilläre Strukturen, die Stabilitätsverluste des nervalen Zytoskeletts hervorrufen (Gray et al. 1987) und Apoptosen induzieren (Z. Liu et al. 2017).

Einen interessanten Aspekt stellen im APP beschriebene Mutationen dar, die die Resilienz gegenüber M. Alzheimer fördern oder aber dessen frühes Auftreten verursachen (Hampel et al. 2020). Dem gegenüber wird bislang keine Mutation im BACE1-Gen mit solch einer Beeinflussung der Krankheitsentstehung in Verbindung gebracht. So resultiert eine natürlich vorkommende A673T-APP-Mutation im humanen Genom in einer reduzierten Aβ1-42-Produktion, was zu einer deutlichen Risikoreduktion führt, an M. Alzheimer zu erkranken (Jonsson et al. 2012, Hampel et al. 2020). Vor diesem Hintergrund vermuten Hampel und Mitarbeiter/-innen eine reduzierte APP-Spaltung aufgrund einer beeinträchtigten Identifizierung des APP durch die BACE1, was wiederum die aktuell bestehende Amyloidhypothese untermauert.

3.2 Die β-Sekretase1 (BACE1): Rolle als Protease und Interaktionspartner im peripheren und zentralen Nervensystem

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des *β- site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1* (BACE1), oder auch β-Sekretase1. Hierbei handelt es sich um ein Transmembranprotein aus der Familie der Proteasen, das in der Prozessierung des transmembranen *Amyloid Precursor Proteins* (APP) involviert ist und nach aktueller Annahme maßgeblich an der Entstehung eines M. Alzheimer beteiligt ist (siehe vorheriger Abschnitt). Jene hat jedoch mehr Funktionen inne als die Spaltung von APP. Nachfolgend werden einige wesentliche Funktionen der β-Sekretase1, insbesondere im peripheren und zentralen Nerven-

system, aufgeführt, da dieses Wissen für etwaige (langfristige) Therapien mit BACE1-Inhibitoren von Relevanz sein könnte.

Es ist zudem notwendig, die Funktionen der BACE1 im Rahmen der Entwicklung und der fortwährenden Homöostase des Organismus zu untersuchen. In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf die funktionelle Untersuchung des auditorischen Systems im BACE1-knockout-Mausmodell und nach medikamentöser Ausschaltung des Enzyms im Adulten gelegt.

3.2.1 BACE1 im peripheren und zentralen Nervensystem

Die β-Sekretase1 (BACE1) hat neben der Spaltung des APP auch einen Einfluss auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem. Neuregulin 1 (NRG1) Typ III, ein wesentliches Protein für die Myelinisierung peripherer Nerven (Michailov et al. 2004), wird durch BACE1 gespalten (Cheret et al. 2013) und nimmt anschließend über die Bindung an ErbB-Rezeptoren seine Funktion wahr (Hu et al. 2016). Entsprechend sind die axonalen NRG1-Expressionslevel ein entscheidender Faktor für die Dicke der Myelinschicht (Michailov et al. 2004, Taveggia et al. 2005). Eine reduzierte NRG1-III-Expression führt zu Hypomyelinisierungen, Myelinisierungsdefekten und damit einhergehend zu reduzierten Nervenleitgeschwindigkeiten peripherer Nerven (Taveggia et al. 2005). Dem gegenüber verursachen Überexpressionen Hypermyelinisierungen (Michailov et al. 2004, Taveggia et al. 2005).

In der Frühphase nach Beschädigung eines peripheren Nervs ist NRG1 ein zentraler Bestandteil für die Expression myelinassoziierter Gene und somit für die Initiierung und Ausbildung einer neuen, suffizienten Myelinschicht (Fricker et al. 2013). Ein BACE1-Defizit resultiert dabei in der Akkumulation von unprozessiertem NRG1 (Garratt et al. 2000, Lemke 2006). In der Folge zeigen sich beeinträchtigte Remyelinisierungsprozesse (Fricker et al. 2011) trotz unbeeinflusster Schwannzellproliferation (Fricker et al. 2013).

BACE1$^{-/-}$-Mäuse weisen ähnliche periphere Hypomyelinisierungen auf, wie sie auch in NRG1-III heterozygoten Tieren beobachtet wurden (Nave & Salzer 2006, Willem et al. 2006). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Axonen des *Nervus* (*N.) ischiadicus* und des *N. opticus* von zwei bis vier Monate alten BACE 1$^{-/-}$-Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtypen deutliche Hypomyelinisierungen bei scheinbar normaler Axonentwicklung (Hu et al. 2006). Die Nervenleitgeschwindigkeit jener Nerven wurde durch die Autoren jedoch nicht untersucht. Neben NRG1 wird das *seizure protein 6* (Sez6), dabei im Mausgehirn fast ausschließ-

lich, durch BACE1 prozessiert (Zhu et al. 2018, Hampel et al. 2020). Sez6 spielt eine Rolle im Rahmen der synaptischen Plastizität und Homöostase. Die medikamentöse BACE-Inhibition und auch das genetische Ausschalten von Sez6 bewirkte *in vivo* eine gestörte Langzeitpotenzierung hippocampaler Neuronen (Zhu et al. 2018).

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, welche Auswirkungen ein genetisch bedingter NRG1-Mangel bzw. eine ausbleibende BACE1-induzierte NRG1-Prozessierung auf die Myelinisierung peripherer Nerven hat. Da der *N. cochlearis* als Hirnnerv Teil des peripheren Nervensystems ist, kann angenommen werden, dass auch dieser in Abwesenheit von BACE1 von Hypomyelinisierungen betroffen sein könnte. Die evozierte Hirnstammaudiometrie (BERA) an BACE1-defizienten Tieren kann hierfür wegweisende Befunde liefern und soll daher in dieser Arbeit Anwendung finden.

3.2.2 Interaktion von BACE1 mit der Familie der KCNQ-Kanäle

BACE1 interagiert direkt mit der Familie neuronaler KCNQ(2-5)-Kanäle, die einen auswärts gerichteten K^+-Strom (M-Strom) bedingen und somit einen bedeutenden Einfluss auf die Exzitabilität exprimierender Zellen nehmen (Hessler et al. 2015). Die Abwesenheit von BACE1 resultiert in einem reduzierten M-Strom und folglich in einer Hyperexzitabilität zentralnervöser Zellen, was die Autoren/ -innen wiederum als epileptogenen Faktor ansehen.

KCNQ1, als weiterer BACE1-Interaktionspartner, wird in kardialen Myozyten (Agsten et al. 2015) und in der *stria vaskularis* exprimiert (Offner et al. 1987, Maljevic et al. 2010). In der *stria vaskularis* stellt der Kanal die hohe K^+-Konzentration der Endolymphe sicher, die eine Voraussetzung für das endocochleäre Potential darstellt. Dabei verlangsamt die direkte Interaktion mit BACE1 die Inaktivierung der KCNQ1-Kanäle, nach stattgehabter Depolarisation der Zelle (Agsten et al. 2015). Mutationen des KCNQ1-Kanals verursachen das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom, das durch QT-Zeit-Verlängerungen und eine angeborene Innenohrschwerhörigkeit charakterisiert ist.

KCNQ4 wird insbesondere in den äußeren Haarzellen des Cortiorgans exprimiert (Mammano & Ashmore 1996, Kubisch et al. 1999, Marcotti & Kros 1999, Kharkovets et al. 2006, Holt et al. 2007) und beeinflusst entscheidend die Leitfähigkeit an der basolateralen Membran (Kubisch et al. 1999, Kharkovets et al. 2000, 2006). Darüber hinaus ist KCNQ4 in den inneren (IHC) (Oliver et al. 2003) und vestibulären Haarzellen zu finden (Holt et al. 2007). Kanalmutationen resultieren in einem progressiven, nonsyndromalen Hörverlust (DFNA2) (Kubisch et

al. 1999, Kharkovets et al. 2000). Die Folgen einer gestörten BACE1-Funktion auf die KCNQ4-Kanäle und die Hörfunktion wurden bisher nicht untersucht.

3.3 Aktuelle Studienlage in der Behandlung des M. Alzheimer

Zum aktuellen Zeitpunkt existieren, wie bereits oben erwähnt, nur wenige etablierte Behandlungsoptionen in der Therapie des M. Alzheimer. Hierzu zählen die Acetylcholinesteraseinhibitoren wie Rivastigmin, die in Studien einen positiven Effekt bei milden bis mittelschweren Formen der Alzheimer Erkrankung gezeigt hatten (Winblad et al. 2007), sowie Memantin, ein NMDA-Rezeptorantagonist, für den eine Verzögerung der klinischen Krankheitsprogression in moderaten bis schweren Verläufen nachgewiesen wurde (Reisberg et al. 2003).

Behandlungsansätze wie die medikamentöse Inhibierung der β-Sekretase1 (BACE1) oder der γ-Sekretase, durch die eine Verringerung der Aβ1-42-Produktion erwirkt werden soll, sind bislang Inhalt klinischer Forschung (Rombouts et al. 2021). Alle bisherigen Phase-II- und -III-Studien mit BACE-Inhibitoren wurden aufgrund von Organotoxizität (retinal, hepatisch, kardiogen), Ineffizienz oder eines ungünstigen Risiko-Nutzen-Profils abgebrochen (Hampel et al. 2020, Rombouts et al. 2021). Ein großer Diskussionspunkt ist, ob den beobachteten Nebenwirkungen und ungünstigen Risikoprofilen sowohl zu hohe BACE1-Inhibitordosierungen als auch eine zu geringe Medikamentenselektivität gegenüber der BACE1 zugrunde liegen (Hampel et al. 2020). Da neben der BACE1- auch eine BACE2-Inhibition zentrale wie auch periphere Nebenwirkungen hervorrufen kann (Stützer et al. 2013, Rulifson et al. 2016, Shimshek et al. 2016, Voytyuk et al. 2018), liegt der aktuelle Fokus auf der Sicherheit und Selektivität der BACE-Inhibitoren (Rombouts et al. 2021). Es wird zudem postuliert, betroffene Patienten/-innen womöglich zu spät in entsprechende Studien eingeschlossen zu haben, an einem ‚point of no return' der neurodegenerativen Kaskade (Hampel et al. 2020, Rombouts et al. 2021).

Einige Pharmafirmen verlassen bereits das Feld der BACE-Inhibitoren und widmen sich anderen pharmakologischen Zielen, wie etwa den Taufibrillen (Rombouts et al. 2021). Grund dafür sind unter anderem klinische Hinweise, dass BACE-Inhibitoren den kognitiven Abbau (reversibel) negativ beeinflussen könnten. Dennoch gilt die Verwendung von BACE1-Inhibitoren nach aktuellem Stand der Wissenschaft als gut begründet und könnte weiterhin eine Zukunft in der Therapie des M. Alzheimer haben (Hampel et al. 2020).

Als weiterer therapeutischer Ansatz existieren seit mehreren Jahren Bestrebungen, die β-Amyloidplaques medikamentös zu eliminieren. Sämtliche Studien zur antikörpergestützten

Therapie schienen bislang gescheitert (Panza et al. 2019). Aducanumab, ein solcher β-Amyloid-Antikörper, der dessen Abbau bewirkt, habe jedoch im hochdosis-Arm der Zulassungsstudien eine signifikante Reduktion des klinischen Krankheitsprogresses aufgezeigt (Zylka-Menhorn & Grunter 2019, Howard & Liu 2020). Dabei gelte bei der Behandlung mit Aducanumab als bedeutendes Risiko die Entwicklung eines Hirnödems mit den daraus resultierenden neurologischen Komplikationen (Zylka-Menhorn & Grunter 2019). Nach einer Nutzen-Risiko-Abwägung durch die *Food and Drug Administration* (FDA) kam es in den USA kürzlich zu einer Zulassung des Medikamentes. Jedoch ist jene Zulassung an eine prospektive Phase-4-Studie geknüpft. In Europa steht die Entscheidung der zuständigen Behörde (*European Medicines Agency*, EMA) noch aus.

In der bisherigen Erforschung der BACE-Inhibitoren und deren unerwünschten Arzneimittelwirkungen wurden primär die laborchemisch gut monitorierbaren Organsysteme (Herz, Leber, Nieren) betrachtet. Hingegen wurden bislang keine funktionellen Untersuchungen am auditiven System beschrieben. Vor dem Hintergrund des erwiesenen Einflusses der BACE1 auf periphere Myelinisierungsprozesse sollen in dieser Arbeit mittels BERA die Auswirkungen einer sechswöchigen BACE1/BACE2-Inhibition (NB-360) auf die Hörfunktion von C57BL/6N-Mäusen untersucht werden. Aus den erhaltenen Daten können Anhaltspunkte gewonnen werden, ob eine Behandlung mit NB-360 kurzfristig unerwünschte Folgen auf die Hörfähigkeit der adulten Mäuse hat und ob Hinweise für neu entstandene Leitungsdefizite bestehen. Dies geschieht im Hinblick auf eine potentielle Behandlung von an M. Alzheimer erkrankten Menschen und auf mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen einer Dauermedikation mit BACE1-Inhibitoren.

3.4 Die Hörbahn der Maus und deren elektrophysiologische Äquivalente in der BERA

Die BERA (brainstem evoked response audiometry) oder auch Hirnstammaudiometrie ist ein elektrophysiologisches Verfahren zur objektiven Beurteilung der Hörfähigkeit. Hierbei werden klassischerweise nicht oder minimalinvasiv evozierte Potentiale entlang der Hörbahn zwischen Innenohr und Hirnstamm abgeleitet, die durch mechano- und chemoelektrische Verarbeitung eines akustischen Reizes entstehen. Durch die Aktivität der neuronalen Strukturen entstehen Spannungsänderungen, die als spezifische Wellenformationen identifiziert werden können. Für die Untersuchung werden Ableit- und Referenzelektroden zur Detektion der Spannungsänderungen angebracht. Das Verfahren ist nahezu unabhängig von der Vigilanz des Subjektes. Am Menschen dient die Hirnstammaudiometrie als diagnostisches Tool in der

Neurologie, Neurochirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, insbesondere jedoch in der Pädiatrie zur Detektion und Differenzierung unterschiedlichster Erkrankungen, die das Hörvermögen beeinträchtigen (Starr et al. 1977, Guerit 1985). In dieser Arbeit soll es der Hörschwellenbestimmung und der elektrophysiologischen Untersuchung am narkotisierten Tier dienen. Für die Untersuchung etwaiger Latenz- oder Amplitudenveränderungen ist die Kenntnis der Hörbahn wie auch die Zuordnung der entstehenden Wellen zu den anatomischen Strukturen der Hörbahn von großer Bedeutung und soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Wellen P1 bis P5 repräsentieren soma- und synapsenhaltige (Kern-)Gebiete der Hörbahn. Mittels Läsionsstudien an Mäusen (Henry 1979, Land et al. 2016) und Katzen (Achor & Starr 1980, Melcher et al. 1996, Melcher & Kiang 1996) wurden die anatomischen Äquivalente der Wellen identifiziert (Suthakar & Liberman 2019). Welle I (P1) wird durch Zellen im *Ganglion (Ggl.) spirale* (Melcher & Kiang 1996) bzw. des *N. cochlearis* (Henry 1979) generiert. Auf der Grundlage zurückliegender Studien wird vermutet, dass Welle P1 durch Schwannzellbeteiligung nahe der synaptischen Verbindung zwischen innerer Haarzelle und den spiralganglionären Afferenzen mitgeneriert wird und so eine Zweigipfeligkeit der Welle möglich ist (Long et al. 2018). Welle II (P2) wird durch Zellen generiert, die die Kerngebiete der *Ncll. cochleares* bilden (Henry 1979, Melcher et al. 1996, Melcher & Kiang 1996, Suthakar & Liberman 2019). Welle III (P3) lässt sich nicht mehr nur einer singulären Hirnstammstruktur zuordnen. Die Entstehung scheint auf elektrischer Aktivität von Anteilen der ipsilateralen *Ncll. cochleares* sowie des jeweils kontralateralen *Nucleus (Ncl.) olivaris superior* zu beruhen (Henry 1979, Melcher et al. 1996). Welle IV (P4) wie auch Welle V (P5) werden durch verschiedene parallellaufende Leitungsbahnen generiert, die in die *Colliculi inferiores (inff.)* projizieren und dadurch unterschiedliche Formationen wie auch Latenzen dieser Wellen hervorrufen können (Ryugo et al. 1981, Ponton et al. 1996). Durch Läsionsversuche konnte die Beteiligung des *Lemniscus lateralis* an P4 bei kontralateralen akustischen Reizen festgestellt werden (Henry 1979, Achor & Starr 1980). Hierbei handelt sich um eine Verbindung zwischen *superiorer Olive* und *ipsilateralem Colliculus inferior (inf.)*. Anhand von Läsionsversuchen am Maushirnstamm kann die Annahme getroffen werden, dass die Generation der Welle P5 von lateralen Regionen des zur Seite der akustischen Stimulation *contralateralen Colliculus inf.* abhängig ist (Henry 1979). Durch variierende Positionierung der ableitenden Elektrode am *Colliculus inf.* konnte an C57BL6/J-Mäusen gezeigt werden, dass dieser die Amplituden und Formation der Wellen P4 und P5 beeinflusst (Land et al. 2016). In der BERA einer C57BL6/J-Maus folgt eine sechste Welle, die weitere Verarbeitungsschritte repräsentiert und

laut Land und Mitarbeiter/-innen als indirekter Marker für die Aktivität des *Colliculus inf.* genutzt werden kann.

3.5 Einfluss des Schalldruckpegels auf Innenohrschäden

Jede innere Haarzelle wird von etwa 10 bis 30 spiralganglionären Neuronen (SGN) innerviert (Liberman 1980, M. Charles Liberman et al. 1990, Meyer et al. 2009, Furman et al. 2013). Dabei zeigen sich die inneren Haarzellen (IHC), entgegen früheren Annahmen, relativ insensitiv gegenüber lärminduziertem Zelltod. Primär kommt es zu einer Schädigung der Synapsen zwischen innerer Haarzelle und spiralganglionären Afferenzen (Spoendlin 1971, Robertson 1983). Die vermutete glutamatbedingte Exzitotoxizität führt innerhalb von 24 Stunden zu einem Anschwellen der afferenten, terminalen Endigungen der SGNs (Spoendlin 1971, Robertson 1983, Wang et al. 2002) und hält abhängig von der ausgesetzten Lautstärke mindestens zwei Wochen an (Wang et al. 2002). Bei sechs Wochen alten CBA/CaJ-Mäusen ist ein Schalldruckpegel ≤ 94 dB bei einer Breitbandbeschallung (8–16 kHz, 2 h) als nicht synaptopathisch beschrieben: weder kurz- (24 h) noch langfristig (16 Monate) wurden signifikante Veränderungen an der Anzahl präsynaptischer (CtBP2-)Signale objektiviert (Jensen et al. 2015). Allerdings wurden keine postsynaptischen Kolokalisationsfärbungen durchgeführt, sodass die Schlussfolgerungen dieser Arbeit kritisch zu betrachten sind. Eine zweistündige Breitbandbeschallung (8–16 kHz) ≥ 97 dB hingegen führte zu bleibenden neuropathischen Schäden in Form eines Synapsenverlustes an den IHC, was eine lärmbedingte morphologische Denervation untermauert (Kujawa & Liberman 2009, Jensen et al. 2015, L. D. Liberman et al. 2015). Diesbezüglich wird bislang diskutiert, ob nach stattgehabter Schädigung eine (partielle) Regeneration der Synapsen an den inneren Haarzellen möglich ist (M. Charles Liberman 2017). Die Präsynapsen der äußeren Haarzellen (CtBP2-gefärbt) blieben *post expositionem* entlang der gesamten Cochlea unverändert (Kujawa & Liberman 2009). Zellkernschwellungen der äußeren Haarzellen als Ausdruck akuter Schäden am Cortiorgan finden sich ab 100 dB, Schalldruckpegel ≥ 106 dB erzeugen ausgedehnte Schäden an den Stereozilien der inneren und äußeren Haarzellen und sind unmittelbar nach Lärmexposition identifizierbar (Wang et al. 2002). Zudem zeigen sich die Zellen der IHC vakuolisiert. Schalldruckpegel von 116 dB in Breitbandbeschallung bedingen einen Riss der *Lamina reticularis* mit anschließendem Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (Wang et al. 2002).

Gegenüber den akuten Schädigungen verursachen Schalldruckpegel von 97 dB (8–16 kHz) in zwei Stunden exponierten Mäusen elektrophysiologisch nur temporäre Hörschwellenanstiege,

führen aber langfristig zu einem 40- bis 50-prozentigen Synapsenverlust an den IHC (Jensen et al. 2015). Durch Lärm verursachte permanente oder temporäre Hörschwellenänderungen in der BERA (brainstem evoked response audiometry) sind durch eine Funktionsstörung der OHC bedingt (Kujawa & Liberman 2009, Jensen et al. 2015). Erholen sich die äußeren Haarzellen nach stattgehabter Schädigung, erholen sich ebenfalls die in der BERA gemessenen Hörschwellen (Jensen et al. 2015). Langfristig kommt es aber durch den Verlust der synaptischen Verbindungen an den IHC zu einem sog. noise induced hidden hearing loss (NIHHL). Pathomechanistisch wird nach einem lärminduzierten Synapsenverlust zwischen IHC und Typ-I-Afferenzen der langfristige Untergang der SGN angesehen, wobei die Hörschwellen in der Hirnstammaudiometrie unauffällig erscheinen (M C Liberman 1980, Kujawa & Liberman 2009, L. Liu et al. 2012, Furman et al. 2013, L. D. Liberman et al. 2015, Lijuan Shi et al. 2016b, 2016a, Song et al. 2016). Erstaunlich ist, dass sich ein solcher lärminduzierter Verlust der SGN in Mäusen erst mit einer Latenz von bis zu zwei Jahren demaskiert (Kujawa & Liberman 2006, 2009, Jensen et al. 2015). Die detaillierte Pathogenese ist jedoch bis dato noch nicht entschlüsselt (Wei et al. 2020). Der NIHHL betrifft überschwellige Schalldruckpegel und ist in der Hirnstammaudiometrie nicht offensichtlich detektierbar (Moser & Starr 2016, Plack et al. 2016, Kobel et al. 2017, M. Charles Liberman & Kujawa 2017, Lobarinas et al. 2017). Er manifestiert sich beim Menschen klinisch in einer reduzierten Sprachdiskrimination in lauten Umgebungen (Gordon-Salant 2005, Bharadwaj et al. 2015). Als objektivierbares Korrelat gilt ein reduzierter Output des *N. cochlearis* im Sinne reduzierter P1-Amplituden bei hohen Lautstärken (Kujawa & Liberman 2009, Lijuan Shi et al. 2013, Sergeyenko et al. 2013, L. Shi et al. 2015, Plack et al. 2016, Lobarinas et al. 2017, Wei et al. 2020). Langfristig veränderte P1-Amplituden werden daher als Indikatoren für einen lärminduzierten Verlust der terminalen Endigungen des *N. cochlearis* diskutiert (Kujawa & Liberman 2009, Sergeyenko et al. 2013).

Bislang wurden keine Untersuchungen zur Lärmvulnerabilität des Innenohres an BACE1$^{-/-}$-Mäusen beschrieben. Unter Kenntnis kritischer Schalldruckpegel und deren kurz- wie auch langfristigen Auswirkungen auf die Morphologie synaptischer Verbindungen der inneren und äußeren Haarzellen soll eine dezidierte Untersuchung lärmbedingter Folgeerscheinungen in oben genanntem Mausmodell erfolgen. Ein Schalltrauma-Modell soll in der vorliegenden Arbeit etabliert werden, um mittelfristig der Frage eines neuroprotektiven Effektes der BACE1 nach Lärmexposition nachzugehen.

4. Material und Methoden

4.1 Mauslinien

4.1.1 BACE1$^{-/-}$-Mäuse und Zuchthaltung

Für den Großteil der Versuche wurden Mäuse aus der Mauslinie Bace1^{tm1Psa} verwendet, die einen C57BL6-Hintergrund aufweisen (Dominguez et al. 2005). Die Ausschaltung des Bace1-Gens wurde durch eine Neomycinkassette erwirkt, die in das erste kodierende Exon des Bace1-Genes eingeschleust wurde. Diese Neomycinkassette führt zu einem vorzeitigen Ablesestopp der mRNA (Dominguez et al. 2005).

Für die Hörschwellenversuche wurden BACE1$^{+/+}$-Mäuse und BACE1$^{-/-}$-Mäuse aus einer Heterozygotenzucht verwendet. Die Züchtung und Haltung erfolgte im Institut für Physiologie und Pathophysiologie der FAU Erlangen-Nürnberg. Für die Etablierung der Vertäubungsversuche wechselten wir auf eine BACE1$^{-/-}$-Homozygotenzucht, um die Anzahl der KO-Tiere (bei vergleichbarer Letalität) zu erhöhen. In einem Alter von zehn Tagen wurden die Jungtiere mit gestanzten Ohrmarkierungen versehen, um sie später identifizieren zu können. Mit diesen biologischen Proben wurde anschließend eine Genotypisierung durchgeführt. Im Alter von drei Wochen wurden die Wildtyp-Jungmäuse von ihren Eltern abgesetzt, wohingegen BACE1$^{-/-}$-Tiere insgesamt fünf Wochen bei den Elterntieren verblieben. Die Separierung erfolgte nach Geschlecht und vorliegendem Genotyp. Es wurde darauf geachtet, Tiere gleichen Alters und Geschlechtes in einem Käfig zu halten. Sämtliche Tiere hatten jederzeit unlimitierten Zugang zu Wasser und Futtermittel. Die Unterbringung, Versorgung, Züchtung und Handhabung der Tiere erfolgten nach Maßgabe der Regierung von Unterfranken.

4.1.2 Genotypisierung

Die von den zehn Tagen alten Jungtieren erhaltenen Ohrstanzen wie auch die von den adulten Versuchstieren erneut entnommenen Gewebeproben wurden in 50 µL (Jungtiere) oder 150 µL (adulte Tiere) alkalischen Lysepuffer (25 mM NaOh [Merck], 0,2 mM EDTA [Carl Roth]) inkubiert und bei 4 °C gelagert. Die DNA-Extraktion erfolgte unter Schwenken (Thermomixer comfort, Eppendorf) für 35 Minuten bei 95 °C. Die extrahierte DNA wurde anschließend auf Eis 1:1 mit Elution Buffer (Qiagen) verdünnt. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden dann der PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific) sowie die *forward* und *reverse* Primer (siehe Tab. 4.1, eurofins genomics) hinzugegeben. Für die PCR des Exon-Allels wurden 11 µL des DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) mit 4,6 µL destilliertem

(dest.) Wasser sowie 440 nm des *forward* und des *reverse* Primers mit 6,5 µL der verdünnten DNA versetzt. Für die PCR der Neomycinkassette wurden 180 nm des *forward* und des *reverse* Primers, 5,35 µL dest. Wasser sowie 6 µL der verdünnten DNA genutzt. Für jede Probe erfolgte je eine PCR des Exon-Allels und eine der Neomycinkassette. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Je 7 µL der PCR-Produkte wurden nachfolgend auf ein 1,7-prozentiges Agarosegel (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen, mit 1M TRIS-Borat-EDTA-Puffer (Rotiphorese NF 10x, Carl Roth) und 0,01 % SYBR®Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Die Auftrennung erfolgte für 25 Minuten bei einer Spannung von 110 V. Als Kontrollen liefen WT-, KO- und H_2O-Proben mit. Visualisiert wurden die Banden der Gelelektrophorese mit Hilfe des Alphalmagers HP (proteinsimple™). Die Exonbande hat eine Länge von ca. 250 Basenpaaren (bp) und die Neomycinbande eine Länge von etwa 270 bp. Wildtyptiere zeigten lediglich die Exonbande, BACE1-KO-Tiere nur die ‚Neo'-Bande. Heterozygote Tiere wiesen beide Banden auf.

Tabelle 4.1: Sequenzen der Exon- und Neoprimer

Mausstamm	Primer	Sequenz (5' → 3')
BACE1^{tm1Psa}	Exon forward	ATGGCCCCAGCGCTGCACTGGCTCC
	Exon reverse	CTGCCTACGGTCATCTCCACATAGTAG
	Neo forward	TTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTG
	Neo reverse	GCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTG

Tabelle 4.2: PCR-Protokoll

Zyklen	Zeit	Temperatur
	5 Min	95° C
29	15 s	96° C
	30 s	60° C
	45 s	72° C
	3 Min	72° C
	Lagerung	4° C

4.2 Hörschwellen-, Latenz- und Amplitudenbestimmung mittels BERA

4.2.1 Wahl und Transport der Versuchstiere

Für die Hörschwellenversuche wurden BACE1$^{-/-}$-Tiere sowie ihre Wildtyp-Geschwistertiere im Alter zwischen 38 (p38) und 44 Tagen (p44) verwendet. Die Versuchstiere wurden am Versuchstag aus ihrem Zuchtkäfig entnommen und nach der Dokumentation von Geschlecht und Gewicht in einer Kunststofftransportbox mit perforiertem Deckel untergebracht. Die Kunststoffbox wurde wiederum in einer geschlossenen Styroporbox zum Versuchsort transportiert, um die Tiere möglichst wenigen Stressoren (z. B. Temperaturgefälle) auszusetzen.

4.2.2 Die BERA-Setups

Das verwendete custom-made-BERA-Setup bestand aus einer isolierten Schallkammer, in der sich eine Wärmplatte (Kation Scientific) befand, mit der die Temperatur der Versuchstiere konstant bei 36,0 °C gehalten wurde. Neben dem Ohr wurde ein Lautsprecher in einem definierten Abstand (setupabhängig) platziert (siehe unten). Zur Detektion der evozierten Hirnstamm-Signale wurde ein Signalverstärker (10.000-fache Verstärkung) vom Typ Neuro-Amp. 401 (J. Helbig Messtechnik) verwendet, der mit einem Bandpass-Filter (400–2000 Hz) und einem 50 Hz notch-Filter ausgestattet war. Zur Übertragung und Übersetzung der Signale wurde eine analogue-digital converter card (National Instruments Corporation) mit einer Abtastrate von 20 kHz verwendet.

Setup I: Für die Messungen wurde der Lautsprecher in Open-Field-Methode in einem Abstand von 3 cm zum Ohr der narkotisierten Maus platziert. Aufnahme- und Signalsendeprogramm (programmiert mit Matlab® durch Dr. Achim Schilling und Dr. Konstantin Tziridis, experimentelle Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Erlangen) wurden daraufhin gestartet. Präsentiert wurden Reintöne bei einer Frequenz von 16 kHz. Es erfolgten 300 Wiederholungen pro Durchlauf, der Schalldruckpegel lag zwischen 20 dB und 100 dB und wurde in 10-dB-Schritten präsentiert. Die Stimulationszyklen wurden wiederholt, bis maximal 1200 Wiederholungen erreicht waren, und dauerten bis zu 2,5 Stunden.

Setup II: Der Versuchsaufbau und die Software (mit Python™ von Thalita Breith programmiert; optimiert durch Andreas Hartmann) wurden wie folgt abgeändert: Der Lautsprecher (Typ MF-1) in Open-Field (Tucker-Davis-technologies) wurde in einem Abstand von 10 cm zum Ohr platziert. Mit diesem Lautsprecher wurden anschließend Reintöne bei 4, 8, 16 und 32 kHz präsentiert. In einem Durchlauf (Dauer ca. eine Stunde) wurden die Frequenzen à 1600 Wiederholungen zwischen 30 dB und 100 dB (in 10-dB-Schritten) präsentiert.

4.2.3 Versuchsvorbereitungen und Narkotisierung – Brainstem evoked response audiometry (BERA)

Am Versuchsort wurden die Tiere für eine Zeitspanne von zehn bis fünfzehn Minuten in einen mit Futter, Wasser und Behausung ausgestatteten Käfig platziert. Zudem wurde die Menge der verwendeten Xylazin(Rompun®, 2 %)-Ketamin(Ketavet®, 100 mg/dl)-Narkose (Mischungsverhältnis 1/1,5/10, mit 0,9-prozentigem NaCl) in Abhängigkeit von Körpergewicht und Geschlecht berechnet und in 1 mL Subcutanspritzen (Injekt®-F, B.Braun) aufgezogen. Nachdem die Vorbereitungen abgeschlossen waren, wurden die Tiere mithilfe eines Nackengriffes fixiert und in 45°-Neigung rücklings gehalten. Die Narkose wurde langsam mit Hilfe einer 21G-Subcutankanüle (Microlance™ 3, Becton Dickinson) intraperitoneal appliziert. Der Stichkanal verlief zwischen Hinterlauf und Medianlinie des Abdomens. Nach der Injektion wurde das Tier in den Käfig zurückgesetzt. Nach etwa zehn Minuten war die Maus anästhesiert und erhielt anschließend einen Subcutanbolus desselben Narkosegemisches (in Abhängigkeit von Gewicht und Geschlecht), der am Rücken appliziert wurde, um das periphere Fettgewebe lokal aufzusättigen. Die Narkosetiefe wurde geprüft, indem ein Schmerzreiz zwischen die Digiti des Hinterlaufes gesetzt wurde. Zeigte die Maus keine Reaktion mehr (motorische Fluchtreaktion des Hinterlaufs, Bewegung der Vibrissen), wurden die Silberelektroden mithilfe einer 18G-Kanüle (B. Braun) subcutan eingebracht. Die Erdungselektrode befand sich auf Höhe der Schwanzwurzel, die Ableitelektrode am Apex des Schädels und die Referenzelektrode wurde hinter dem Mastoid des linken Ohrs angebracht (Vgl. Abb. 4.1). Im Anschluss wurde das Tier auf der Wärmplatte (36 °C) der Schallkammer platziert und der Lautsprecher wurde positioniert. Die Krokodilklemmen wurden hautnah ohne dazwischenliegendes Fell an den Silberelektroden angebracht, die Schallkammer wurde anschließend geschlossen, bevor die BERA-Messungen gestartet wurden. Während der Aufnahmen wurde das Versuchstier mit Hilfe einer Kamera an einem PC-Bildschirm überwacht.

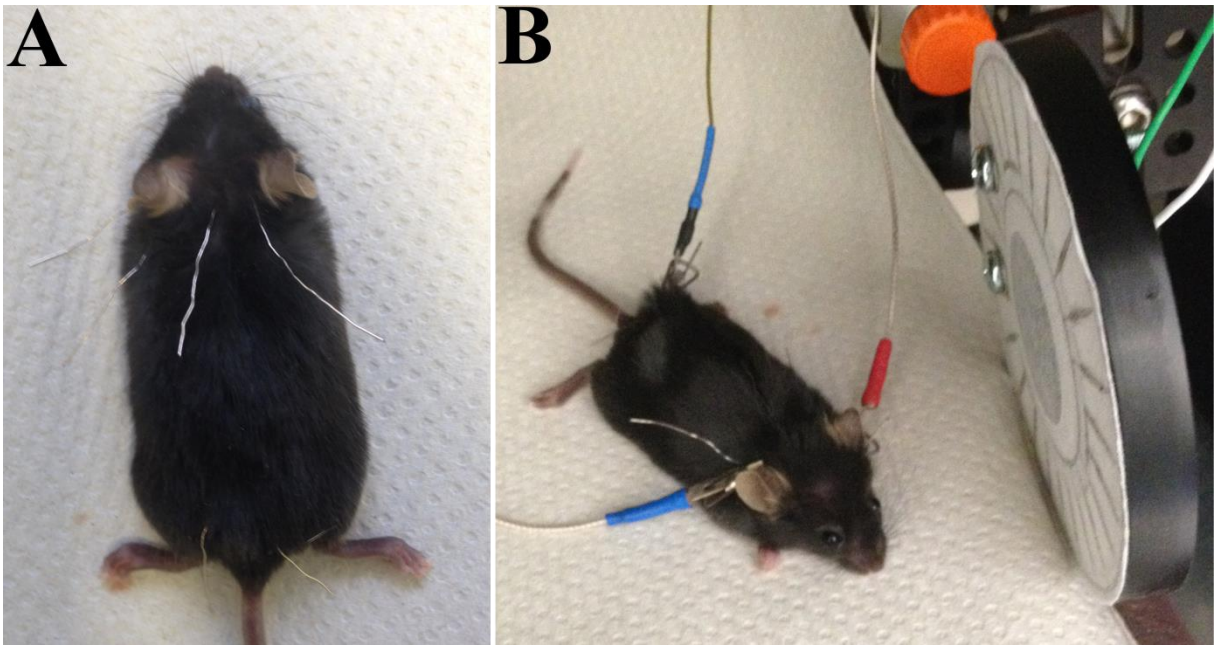

Abb. 4.1: Vorbereitungen für die BERA-Messung

(**A**) Darstellung der Elektrodenlage einer narkotisierten C57BL6/J-Maus. Die Silberelektroden wurden mit Hilfe einer Führungskanüle an Apex hinter dem linken Mastoid und oberhalb der Schwanzwurzel subcutan eingebracht. (**B**) Positionierung der narkotisierten Maus für die BERA-Versuche in der Schallkammer. Das linke Ohr befindet sich in einem definierten Abstand zum Lautsprecher. Die Krokodilklemmen wurden so angebracht, dass sich keine Haare zwischen Elektrode und Klemme befanden.

4.2.4 Tötung der Tiere

Nach Abschluss einer Messreihe wurden alle Tiere vor dem Erwachen aus der Narkose mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurden die Silberelektroden entfernt und es wurde eine Gewebeprobe vom Ohr für eine Nachgenotypisierung (Qualitätskontrolle, Validierung) in einem Eppendorfgefäß (Sarstedt) asserviert und dieses bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.5 Hörschwellen-, Latenz- und Amplitudenbestimmung der BACE1$^{-/-}$- und WT-Maus-BERAs

Die Hörschwellen der Mäuse wurden visuell bestimmt. Dafür wurden die BERA-Spuren mit Hilfe von Python^{TM}-Tools (programmiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Achim Schilling und Dr. Konstantin Tziridis, Institut für experimentelle Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Erlangen) visualisiert und bis zum niedrigsten Schalldruckpegel verfolgt, bei dem die Wellen P1–P5 identifiziert werden konnten. Für die Latenzbestimmung wurden

die BERA-Spuren eines jeden Schalldruckpegels dargestellt und mit Hilfe der ersten Ableitungen wurde die Latenz der Wellenpeaks (P1–P5) digital ausgemessen: In ihr wurden die Nullpunkte auf der X-Achse bestimmt, die den Ort des Peakmaximums im Integral anzeigen. Die Amplituden der Wellen wurden in den einzelnen BERA-Spuren mittels Peak-to-Peak-Verfahren bestimmt.

4.3 Etablierung einer Versuchsreihe mit akustischem Stress

4.3.1 Setzen eines Schalltraumas

Um in den Mäusen ein Schalltrauma hervorzurufen, wurden diese narkotisiert in einem Abstand von 5 cm des linken Ohres zum Lautsprecher platziert. Um das rechte Ohr vor Hörschäden zu bewahren, wurde ein auftreibender Ohrstöpsel verwendet. Die Beschallung des linken Ohres erfolgte für je drei $BACE1^{+/+}$- und drei $BACE1^{-/-}$-Tiere im Alter von 59 bis 67 Tagen (p59–67) für 75 Minuten bei einer Tonhöhe von 8 kHz mit einem Schalldruckpegel von entweder 100 dB oder 110 dB. Nach fünf bis acht Tagen wurden mittels evozierter Hirnstammaudiometrie (BERA) die Hörschwellen beider Ohren separat bestimmt.

4.3.2 Präparation und Fixierung der Cochlea im Whole-mount-Verfahren

Für die Präparation der Cochlea wurde das Tier mit Hilfe von Desfluran in eine Kurznarkose gesetzt und dekapitiert. Anschließend wurde zügig die Haut mithilfe einer Schere vom Schädelknochen gelöst, dieser anschließend halbiert und in eine Petrischale mit physiologischer Lösung (EX-0, 310 mOsm/kg, pH 7,4) gelegt. Diese enthielt 5,8 mmol KCl, 144 mmol NaCl, 0,9 mmol $MgCl_2$, 1,3 mmol $CaCl_2$, 0,7 mmol NaH_2PO_4, 5,6 mmol D-Glucose sowie 10 mmol HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure). Anschließend wurde unter dem binokularen Mikroskop (Stemi SV 6, Zeiss) das Gehirn entfernt und die Cochlea mithilfe von 11251-20/11252-30 Dumont #5 Forceps-Pinzetten (Fine Science Tools) stumpf präpariert (siehe Abb. 4.2 A und B). Die apikale Cochlea wurde im Anschluss mithilfe einer Pinzette perforiert und das Präparat in 2-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) (versetzt mit 125 mM Sucrose in 100 mM PBS) für zwei Stunden bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurde die Cochlea (Vgl. Abb. 4.2 C) in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7,4) weiter präpariert. Mit Hilfe der zuvor genannten Pinzetten wurde die knöcherne Hülle (Modiolus) der Cochlea von apikal nach basal behutsam weggebrochen. Anschließend wurde das Cortiorgan samt ossärer Spirallamina basal abgesetzt und separiert in PBS weiterpräpariert. Die *Stria vaskularis* sowie

die *Reissnermembran* wurden vorsichtig entfernt. Anschließend wurde das Cortiorgan vorsichtig von der ossären Spirallamina abgesetzt. Das präparierte apikale Cortiorgan (Vgl. Abb. 4.2 D) wurde im Anschluss mit Hilfe einer modifizierten Pasteurpipette in eine Wellplatte mit Glasboden (Greiner Bio-One) überführt. Die maximale Ausbeute betrug 1,5 Windungen des apikalen Cortiorgans.

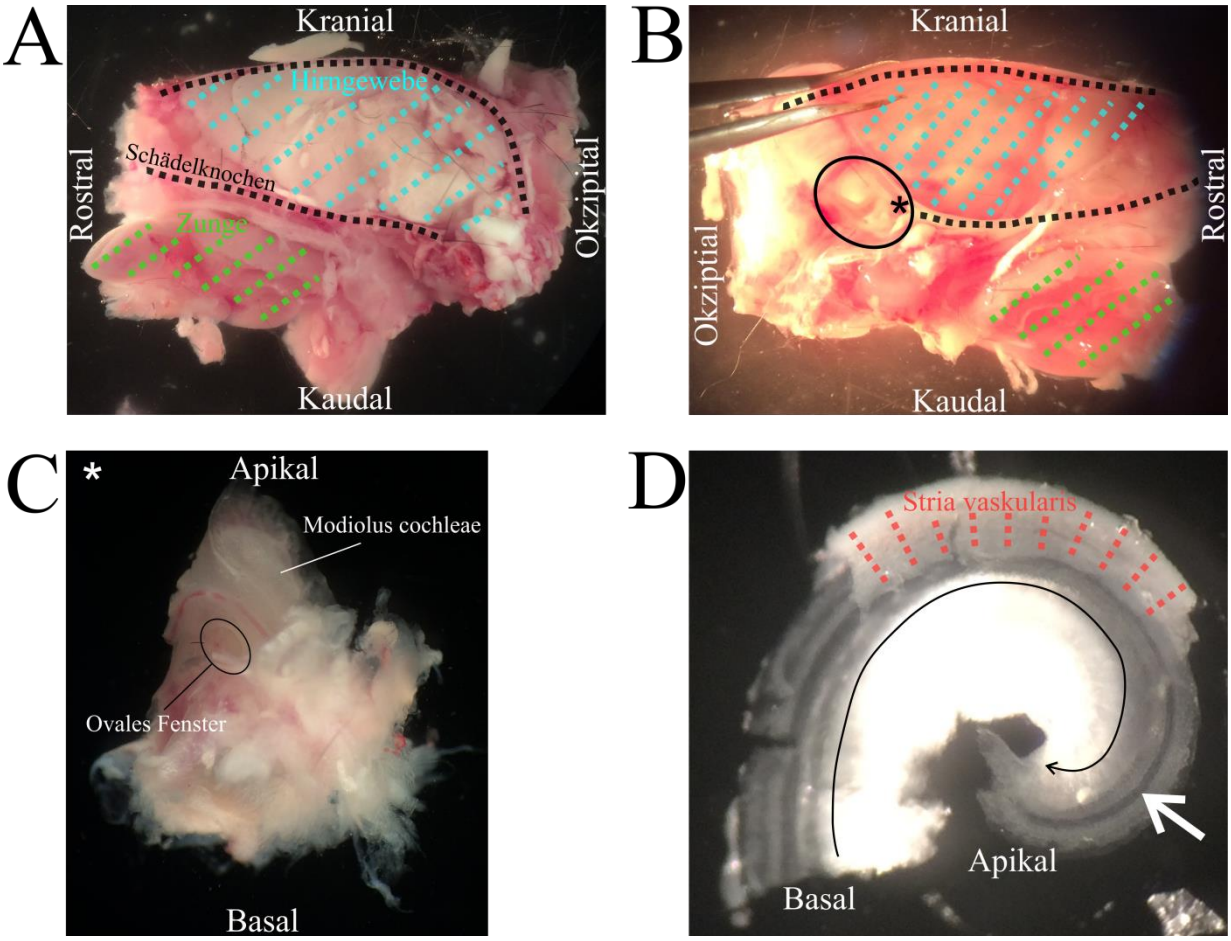

Abb. 4.2: Präparationsschritte der Cochleapräparation einer C57BL6-Maus

Sicht von medial auf die rechte (**A**) und linke Seite (**B**) eines halbierten Schädels einer C57BL6/J-Maus bei achtfacher Vergrößerung. In den Abbildungen sind einige Landmarken (Hirngewebe: blau; Zunge: grün) schraffiert. Die mit einem Stern markierte Struktur stellt das Innenohr der Maus dar (**C**). Bei 25-facher Vergrößerung sind der *Modiolus cochleae*, die Windungen der Cochlea sowie das ovale Fenster erkennbar. Das knöcherne Labyrinth ist von Weichgewebe umgeben. (**D**) Aufsicht auf ein Cortiorgan bei 50-facher Vergrößerung mit Resten der *Stria vaskularis* (rot schraffiert). Der Bereich der Haarzellreihen (weißer Pfeil) sowie die Ausrichtung des Organs von basal nach apikal (schwarzer Pfeil) sind erkennbar.

4.3.3 Lagerung der Cochleae

Nach Fixierung des Präparates in zweiprozentigem PFA war es möglich, das Präparat bis zu eine Woche lang aufzubewahren, um die Präparation zu einem anderen Zeitpunkt fortzusetzen. Hierfür war es nötig, mindestens fünf Waschschritte à zehn Minuten mit PBS unter behutsamem Mediumwechsel durchzuführen. Das gewaschene Präparat konnte anschließend in einer geschlossenen Feuchtkammer bei 4 °C gelagert werden.

4.3.4 Färbung der Cortiorgane und Haltbarkeit der Präparate

Die Färbung der Cortiorgane erfolgte nach abgeschlossener Präparation in einer Glasboden-Wellplatte (Greiner Bio-One). Die verwendeten immunhistochemischen Färbungen umfassten eine BACE1-Antikörper-Färbung (1:50 in normal goat serum buffer [NGSB], rabbit-anti-BACE1, Abcam, ab108394) sowie eine Synapsin1, 2-Färbung (1:200 in NGSB, guinea-pig-anti-Synapsin). Die fixierten Präparate wurden mit 150 µL NGSB für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um das Gewebe zu permeabilisieren und zu blocken. Das genannte NGSB enthielt 10 % normales Ziegenserum (NGS), 0,3 % Triton X-100, 20 mM Phosphatpuffer (PB) sowie 450 mM NaCl. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper hinzugegeben und die Präparate wurden für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in der Well-Platte mittels 310 mM PBS drei Mal für je zehn Minuten gewaschen. Dafür wurde die vorhandene Flüssigkeit vorsichtig mit einer 1-mL-Spritze zusammen mit einer modifizierten Kanüle (B. Braun) abgezogen und verworfen und es wurden je 150 µL PBS (310 mM) in das entsprechende Well gegeben. Nach den Waschschritten wurden 150 µL des Sekundärantikörpers (Alexa-Fluor-488 goat anti-rabbit-AK, 1:200 in NGSB, Thermo Scientific) hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend für 90 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nachfolgend wurden in o. g. Methodik zwei weitere Waschschritte durchgeführt. Um die Cortiorgane für die konfokale Mikroskopie vorzubereiten, wurden diese unter dem binokularen Mikroskop mittels o. g. Präparierbesteck so ausgerichtet, dass der Apex des Präparates in Richtung des Wellbodens zeigte. Anschließend wurde die Probe mit 150 µL Einbettmedium (Roti®-Mount FluorCare DAPI, Carl Roth) versetzt. Das Medium inkludierte eine DAPI-Referenzfärbung zur Darstellung der Zellkerne. Es wurde darauf geachtet, dass die Präparate nicht an den Rand des jeweiligen Wells adhäsierten. Nach dem Färben und Einbetten waren die Präparate, bei 4 °C dunkel gelagert, für wenige Wochen haltbar.

4.3.5 Imaging mit dem konfokalen Mikroskop

Das Imaging am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM780, Zeiss) erfolgte bei 22–24 °C in einem abgedunkelten Raum. Zur Untersuchung der Präparate wurde das C-Apochromat-40x/1.20-W-Korr-Oil-Objektiv mit Immersionsöl verwendet. Als Anregungswellenlängen dienten 405 nm und 561 nm. Die Emissionen wurden bei 410–585 nm aufgenommen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Z-Stacks in Intensitätsprojektion. Dabei wurden die aufgenommenen Bilder aller Kanäle übereinandergelegt und alle Ebenen in ein Bild projiziert. In der Nachbearbeitung der Aufnahmen wurde die Schwelle zur Darstellung des immunhistochemischen DAPI-Signals variiert, die Schwelle für Synapsin1, 2 wurde uniform gewählt. Weiterhin wurden einzelne hochauflösende Bilder von ausgesuchten Bereichen des Cortiorgans aufgenommen. Wir konzentrierten uns dabei auf den basalen Abschnitt des Cortiorganpräparats. Der Mastergain lag zwischen 669 und 700, die Laserintensitäten wurden bei 405 nm zwischen 0,3 % und 0,8 % und bei 561 nm zwischen 0,2 % und 0,7 % eingestellt. Die Öffnung des Pinholes betrug 34 μm.

4.4 BACE1-Inhibitor NB-360-Behandlung

Die verwendeten Versuchstiere beliefen sich auf 20 extern gezüchtete Wildtyp-Mäuse der Rasse C57BL/6N (Charles River Laboratories, Sulzfeld). Zur Vorbereitung auf die BERA-Messungen der NB-360-gefütterten Mäuse wurde den Tieren im Alter von drei Wochen eine Eingewöhnungszeit von einer Woche mit freiem Zugang zu Wasser und standardisiertem Pelletfutter (Novartis Pharma, Nürnberg) gewährt. Im Anschluss daran wurde eine Versuchsgruppe, bestehend aus zehn Tieren, von der gleichgroßen Kontrollgruppe separiert. Die Versuchsgruppe erhielt ein mit BACE1/2-Inhibitor NB-360 (Neumann et al. 2015) versetztes Futtermittel (Novartis Pharma) mit einer beinhaltenden Konzentration von 0,3 mg/g Futtermittel. Die Kontrollgruppe erhielt dasselbe Pelletfutter ohne NB-360-Zusatz. Der Zeitraum der Fütterung belief sich auf sechs Wochen. Direkt im Anschluss, im Alter von 69 (p69) bis 72 Tagen (p72), wurden die BERA-Messungen an beiden Versuchsgruppen durchgeführt. Der Transport sowie die Versuchsvorbereitung, -durchführung und -auswertung erfolgten in oben beschriebener Methodik (siehe Kap. 4, Abschn. 2.3, 2.5 und 5).

4.5 Auswertung und statistische Analyse der Daten

In den gezeigten Abbildungen werden die Einzelwerte, Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Für die statistische Analyse wurden die erhaltenen Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft, bevor im Anschluss der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet wurde. Sämtliche Daten wurden mit Hilfe von Origin-Pro2015® visualisiert und statistisch ausgewertet.

5. Ergebnisse

5.1 BACE1$^{-/-}$-Mäuse weisen erhöhte Hörschwellen auf.

BACE1 ist ein im Körper ubiquitär vorkommendes Enzym und spielt unter anderem eine essentielle Rolle in der Regulation der Myelinisierung peripherer Nerven (Hu et al. 2006). Besonders in der frühen Postnatalzeit liegen hohe BACE1-Expressionslevel vor (Willem et al. 2006). Die Abwesenheit von BACE1 führt in Mäusen neben Hypomyelinisierungen des *N. opticus* und des *N. ischiadicus* ebenfalls zu neurologischen Auffälligkeiten (Hu et al. 2006). Wir führten evozierte Hirnstammaudiometrien (BERA) an BACE1$^{-/-}$-Mäusen sowie an deren Wildtyp-Geschwistertieren durch, um der Fragestellung eines beeinträchtigten peripheren auditorischen Systems nachzugehen. Den Ausgang beider Versuchsgruppen bildete der BACE1^{tm1Psa}-Stamm, der einen C57BL6-Hintergrund aufweist (Dominguez et al. 2005). Für die Hörversuche wurden adulte Tiere im Alter von ca. sechs Wochen (p38–44) verwendet. An ihnen wurden BERA-Messungen mit bis zu 1200 Wiederholungen bei einer Frequenz von 16 kHz und Schalldruckpegeln von 20 bis 100 dB durchgeführt, um die Hörschwellen der Versuchstiere zu quantifizieren. Die Kohorte umfasste BACE1$^{-/-}$-Tiere (n=8) sowie eine Kontrollgruppe (n=9), je gemischten Geschlechtes. Die Tiere wurden narkotisiert und anschließend in der schallisolierten Kammer platziert (siehe Material und Methoden, Kap. 4, Abschn. 2.3). Abb. 5.1 A zeigt die Rohdaten einer BERA-Messung am alten Setup (siehe Material und Methoden, Kap. 4, Abschn. 2.2). Durch Mittelung der Rohspuren und anschließendes Plotten ergeben sich die in Abb. 5.1 B und C exemplarisch dargestellten BERAs einer C57BL6/J-Maus und einer BACE1$^{-/-}$-Maus für 16 kHz. Der Grafik 5.1 D ist zu entnehmen, dass die Hörschwelle des BACE1$^{-/-}$-Mausstammes bei 16 kHz im Mittel um mehr als 30 dB gegenüber ihren non-transgenen Geschwistern erhöht ist.

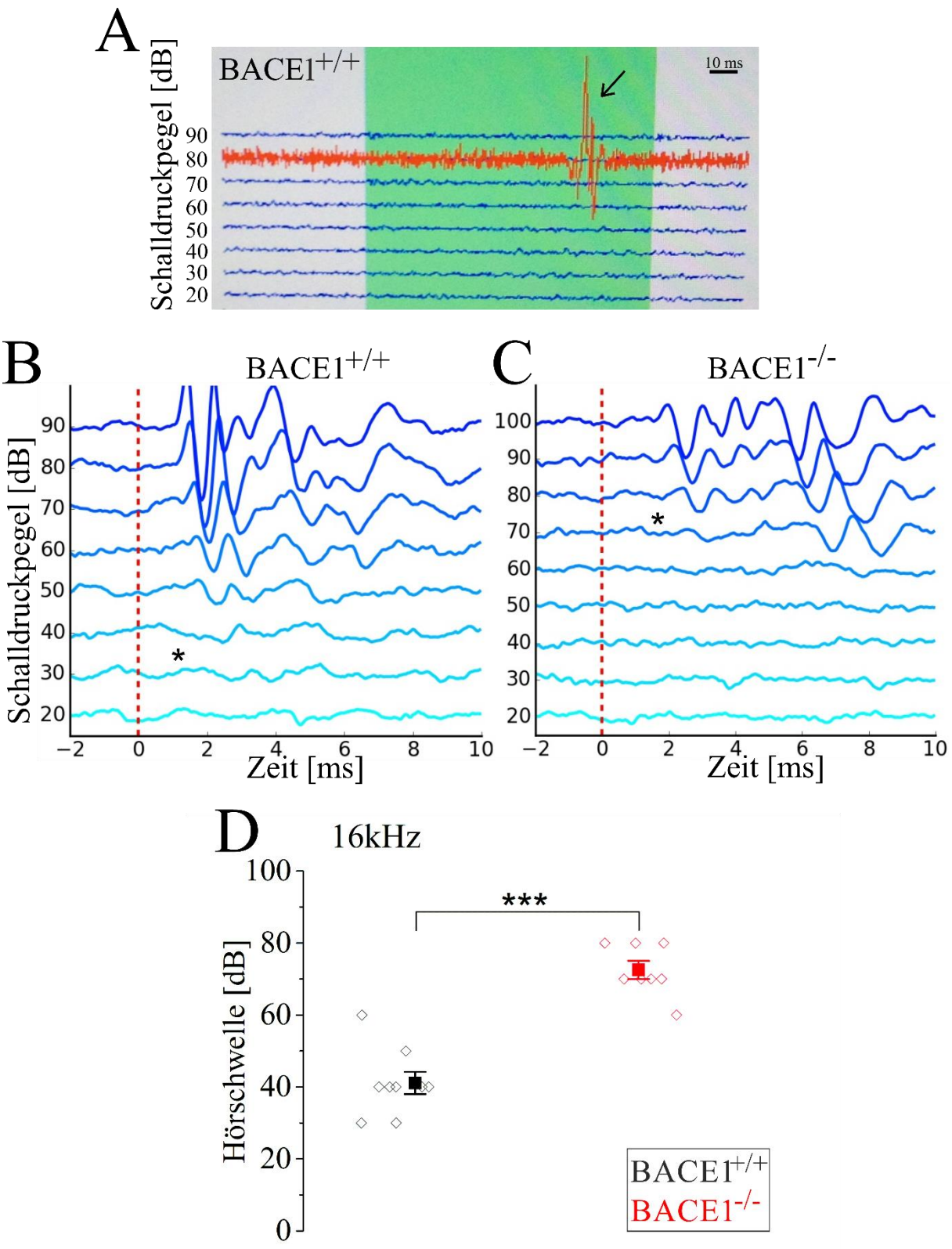

Abb. 5.1: Audiometrien und Hörschwellen der C57BL/6-N und BACE1$^{-/-}$-Population bei 16 kHz

(**A**) Darstellung von BERA-Rohdaten bei 16 kHz mit unterschiedlichen Schalldruckpegeln eines C57BL6/J-Wildtyptieres am alten BERA-Setup (siehe Material und Methoden). Bei dem zu verzeichnenden Artefakt

(schwarzer Pfeil, rote Spur) handelt es sich um ein EKG-Signal des narkotisierten Tieres. Darstellung einer über 1200 Wiederholungen gemittelten BERA eines (**B**) C57BL6/J-Wildtyptieres sowie (**C**) eines BACE1$^{-/-}$-Tieres für 16 kHz. Für die Abbildungserstellung wurden die Peaks bei 90 dB (Abb. B) abgeschnitten. Die Sterne innerhalb der Abbildungen markieren die Hörschwelle des Tieres (siehe Material und Methoden). (**D**) Vergleich der gemittelten Hörschwellen von C57BL6/J-Wildtyp-Mäusen (schwarz, n=9) und BACE1-KO-Mäusen (rot, n=8) bei 16 kHz. Die Mäuse beider Gruppen waren im Alter von p38 bis p44 und gemischten Geschlechtes (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes [SEM], ***p < 0,001, t-Test für unverbundene Stichproben).

5.2 Die Latenz der Welle I (P1) ist in der BERA von BACE1$^{-/-}$-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren verlängert.

Nachdem bezüglich der Hörschwellen in der BACE1$^{-/-}$-Population im Vergleich zur Wildtyp-Population deutliche Unterschiede nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob in der evozierten Hirnstammaudiometrie ebenso Auffälligkeiten im zeitlichen Auftreten der Welle I (P1) existieren. Dabei repräsentiert P1 die bipolaren Zellen des *Ganglion spirale* (*N. cochlearis*) im Innenohr (Henry 1979, Melcher & Kiang 1996). Die Latenz und die Amplitude von Welle I sind unter anderem von der Anzahl der bipolaren Zellen abhängig, aber auch von der Dichte der sie umgebenden Schwann-Zellen (Zhang et al. 2018). In Abb. 5.2 A und B sind exemplarisch dargestellte BERA-Spuren (blaue Verläufe) bei einer Frequenz von 16 kHz und einem Schalldruckpegel von 80 dB (A) und 20 dB über der individuellen Hörschwelle (B) für eine Wildtyp- als auch für eine BACE1$^{-/-}$-Maus zu erkennen. Zudem wurden die Wellenbezeichnungen (I–V) eingefügt. Die roten Spuren stellen die Ableitungen der erhaltenen Messsignale dar, deren Nullpunkte der Latenzbestimmung dienten. Die gemittelten P1-Latenzen aller Versuchstiere sind in Abb. 5.2 C und D für 80 dB (C) und 20 dB über der Hörschwelle (D) grafisch dargestellt. Sowohl bei 80 dB als auch bei 20 dB über der jeweiligen Hörschwelle der Tiere konnte in der BACE1$^{-/-}$-Population eine deutlich verlängerte P1-Latenz nachgewiesen werden.

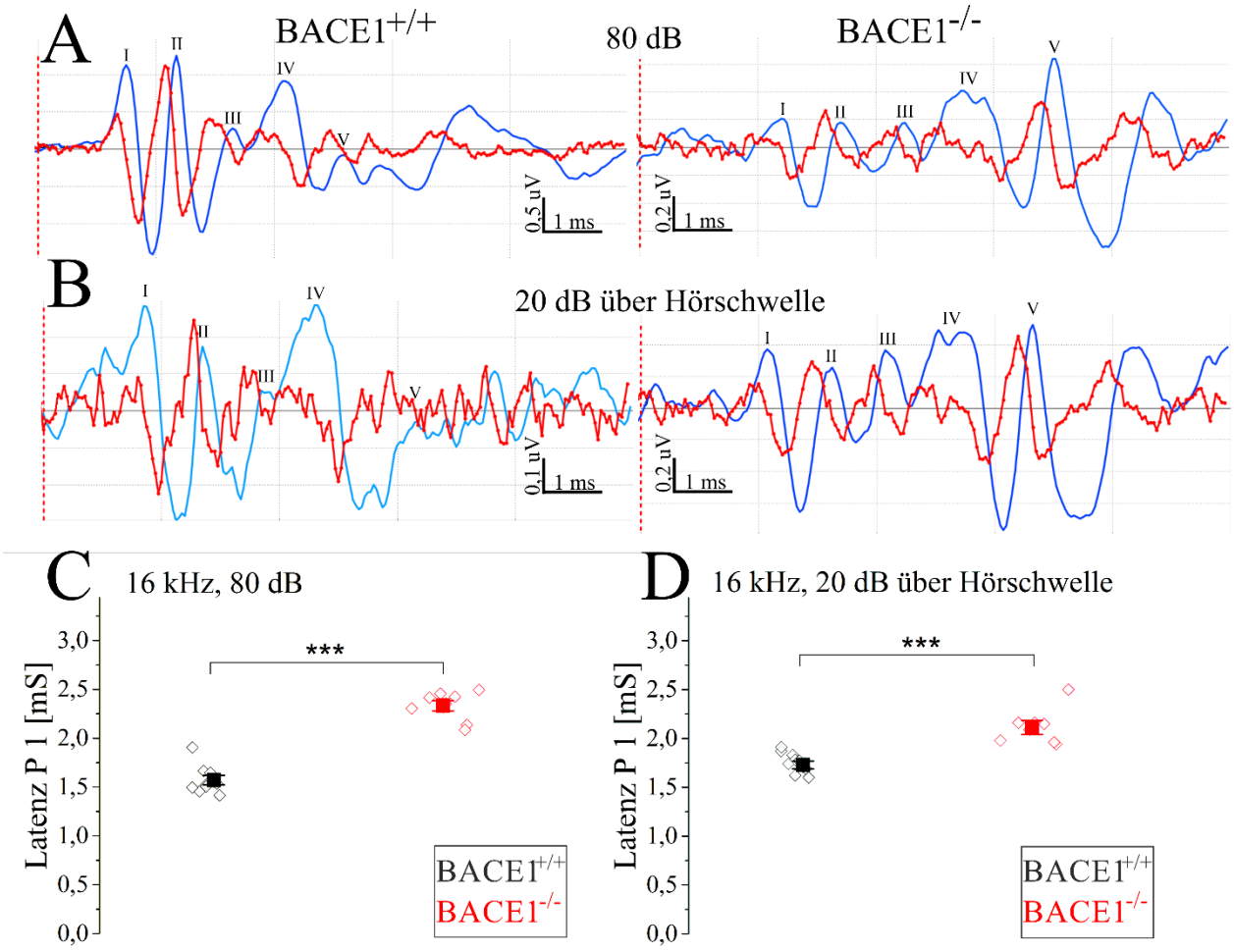

Abb. 5.2: Exemplarische BERA-Rohspuren und P1-Latenzen bei 16 kHz in BACE1$^{-/-}$- und WT-Mäusen

Exemplarische Gegenüberstellung von BERA-Rohspuren (blauer Verlauf) einer BACE1$^{+/+}$- und einer BACE1$^{-/-}$-Maus, bei einem Schalldruckpegel von (**A**) 80 dB und (**B**) 20 dB über der Hörschwelle. Die römischen Zahlen bezeichnen die Wellen innerhalb der BERA-Ableitung. Die vertikalen rot gestrichelten Linien signalisieren den Zeitpunkt der Präsentation des 16-kHz-Reintones. Bei den roten Kurven handelt es sich um die Ableitungen der BERA-Rohspuren. Vergleich der Latenzzeit der Welle P1 (I) in Wildtyp-Tieren (schwarz, n=9) und BACE1-KO-Tieren (rot, n=8) gemischten Geschlechtes bei (**C**) 80 dB sowie (**D**) 20 dB über der Hörschwelle (Mittelwerte und SEM, *** $p < 0{,}001$, t-Test für unverbundene Stichproben).

5.3 Signaltransduktion entlang der Hörbahn von BACE1$^{-/-}$-Mäusen

Im Anschluss an die Betrachtung der P1-Latenz untersuchten wir die Interlatenzen zwischen P1 und P5, die die Zeit der Signalverarbeitung entlang der einzelnen Stationen der Hörbahn repräsentieren. Dem lag die Fragestellung zugrunde, ob die zentrale Signalweiterleitung bei BACE1$^{-/-}$-Mäusen beeinträchtigt ist. Wir betrachteten die Daten, wie im vorangestellten Abschnitt, sowohl überschwellig (80 dB) als auch schwellennah (20 dB über der individuellen

Hörschwelle). In Abb. 5.3 A und B ist erkennbar, dass die Gegenüberstellung der Interlatenzen bei unterschiedlichen Schalldruckpegeln verschiedene Ergebnisse hervorbringt. Mit Blick auf die Ergebnisse der 80-dB-Spuren (A) ergeben sich Unterschiede der Interlatenz (*Ganglion spirale* [P1] bis *Colliculus inferior* [P5]) zwischen WT- und BACE1$^{-/-}$-Mäusen. Demgegenüber lässt sich (B) schwellennah (20 dB über der Hörschwelle) kein Unterschied in der Gesamtleitungszeit von P1 bis P5 zwischen beiden Gruppen feststellen. Um genaueren Aufschluss zu erlangen, wurden die Interlatenzen zwischen den einzelnen Stationen der Hörbahn betrachtet. In Abb. 5.3 C sind die Ergebnisse der 80-dB- Spuren visualisiert. Überschwellig ist bei BACE1$^{-/-}$-Tieren eine tendenzielle Verlängerung sämtlicher Interlatenzen zwischen den Stationen der Hörbahn, mit Ausnahme von P2 zu P3, zu verzeichnen. Lediglich zwischen P1 und P2 (C) lässt sich eine signifikante Verlängerung in der BACE1$^{-/-}$-Population aufzeigen. Die schwellennahe Auswertung ist in Abb. 5.3 D visualisiert. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Populationen, konkret zwischen den *Nuclei cochleares* (P2) und den *Nuclei olivaris superiores* (P3) sowie zwischen den *Nuclei olivaris superiores* (P3) und den *Lemnisci laterales* (P4). Eine abschließende Erklärung für die stark differierenden Ergebnisse fand sich nicht und wird später präziser erörtert (siehe Diskussion, Kap. 6, Abschn. 1).

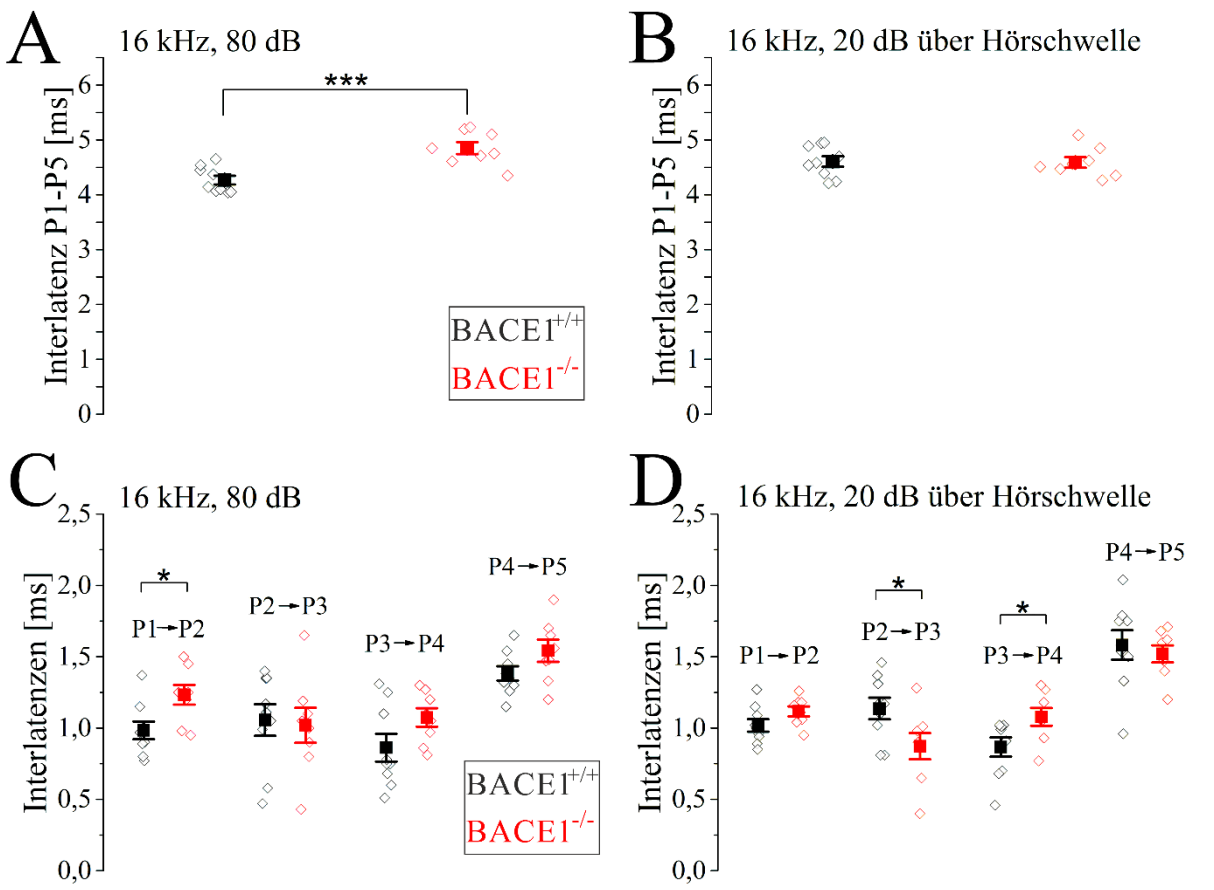

Abb. 5.3: Interlatenzen für 16 kHz in BACE1$^{-/-}$- und WT-Mäusen bei 80 db und 20 dB über der Hörschwelle

Vergleich der gemittelten Interlatenzzeit zwischen (P1) und (P5) von C57BL6/J-Wildtypmäusen (schwarz, n=9) und BACE1-KO-Mäusen (rot, n=8) bei einer Frequenz von 16 kHz bei (**A**) 80 dB SPL sowie (**B**) 20 dB über der Hörschwelle. Vergleich der Interlatenzen zwischen den einzelnen Stationen der Hörbahn derselben Tiere bei (**C**) 80 dB und (**D**) 20 dB über Hörschwelle. Die Daten wurden in gemischtgeschlechtlichen Gruppen im Alter von p38–p44 mittels BERA generiert (Mittelwert und SEM, ***p < 0,001, * p < 0,05, t-Test für unverbundene Stichproben).

5.4 BACE1$^{-/-}$-Mäuse zeigen auffällige Amplituden in der evozierten Hirnstammaudiometrie.

Entscheidend für die Höhe der Amplitude einer BERA-Welle ist das Maß der elektrischen Synchronizität der repräsentierenden Zellpopulation. Je mehr Zellen in den einzelnen Stationen zeitgleich synaptischen Input erhalten, desto höher ist die gemessene Spannung. Um zu prüfen, ob diese in BACE1$^{-/-}$-Tieren reduziert ist, wurden die Amplituden der Welle P1 aus den Rohdaten derselben 17 Tiere bestimmt (siehe Material und Methoden, Kap. 4, Abschn.

2.5). Bei einem Schalldruckpegel von 80 dB (siehe Abb. 5.4 A) waren die Amplituden der Signale des *Ggl. spirale* (P1) bei BACE1$^{+/+}$-Mäusen höher als jene der BACE1-defizienten Mäuse. Dasselbe ließ sich für die Wellen P2–P4 zeigen (siehe Abb. 5.4 B). Zu erwähnen ist jedoch die ausgeprägte Streuung der Absolutwerte der P1-Amplituden der Wildtyp-Tiere bei 80 dB gegenüber den BACE1$^{-/-}$-Tieren. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei 20 dB über der Hörschwelle (Abb. 5.4 C) bei den Wildtyp-Mäusen zum einen nur eine sehr geringe Streubreite, zum anderen lassen sich gering signifikant erniedrigte P1-Amplituden im Vergleich zu den BACE1$^{-/-}$-Mäusen erkennen. In Abb. 5.4 D ist die schwellennahe Auswertung der Amplituden P2–P5 (20 dB über der Hörschwelle) dargestellt. Jene ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Populationen. Auf die Plausibilität der differenten Ergebnisse und der zugrundeliegenden (patho-)physiologischen Hintergründe wird später genauer eingegangen (siehe Diskussion, Kap. 6, Abschn. 1).

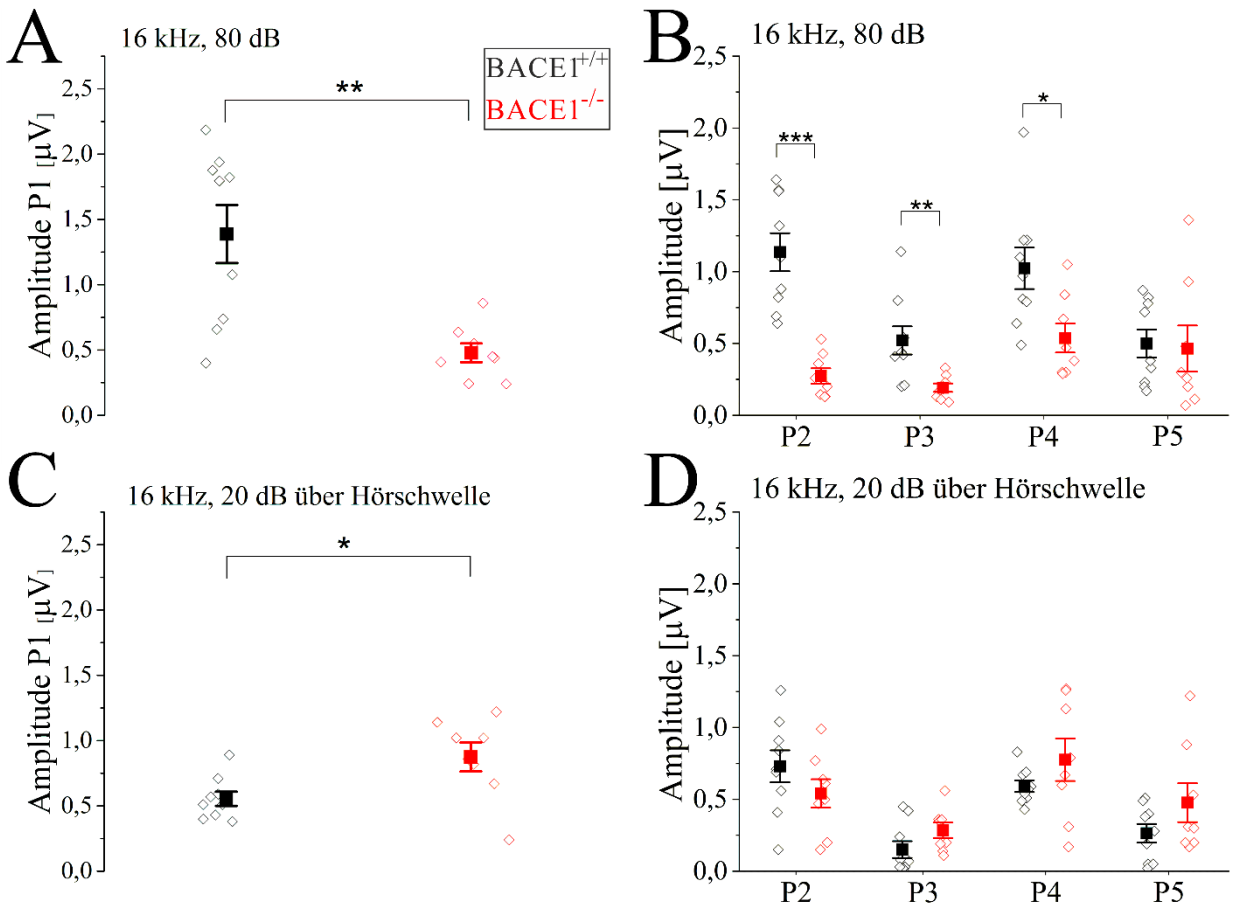

Abb. 5.4: Amplituden der Wellen P1–P5 bei 16 kHz in BACE1$^{-/-}$- und WT-Mäusen bei 80 dB und 20 dB über der Hörschwelle

Vergleich der gemittelten Amplituden von P1 bei 16 kHz zwischen C57BL6/J-Wildtypmäusen (schwarz, n=9) und BACE1-Knockouttieren (rot, n=8) (**A**) bei 80 dB SPL sowie (**B**) 20 dB über der Hörschwelle eines jeden Tieres. Gegenüberstellung der gemittelten Amplituden der Wellen P2 bis P5 beider Genotypen bei (**C**) 80 dB und (**D**) 20 dB über der Hörschwelle. Die Daten wurden mittels BERA generiert. Das Alter der Tiere lag zwischen p38 und p44, die Geschlechter waren in beiden Gruppen gemischt (Mittelwert und SEM ***$p < 0{,}001$; **$p < 0{,}01$; *$p < 0{,}05$, t-test für unverbundene Stichproben).

5.5 Methodische Etablierung der Vertäubung, Präparation und Färbung von BACE1-knockout-Cochleae

In diesem Teil der Arbeit werden die Generierung von Hörschäden im Mausmodell und die anschließende histomorphologische Untersuchung des Cortiorgans thematisiert. In Abhängigkeit von der BACE1-Expression sollen künftig die Auswirkungen des Lärmes auf die Hörschwellen untersucht werden, um anschließend die histomorphologischen Korrelate im Cortiorgan (Haarzellverlust, Synapsenverlust, Proteinexpression) vergleichend zu beurteilen. Konkret erwies sich eine Beschallung mit einer Frequenz von 8 kHz für 75 Minuten bei Lautstärken von 100–110 dB als am besten geeignet. Es wurden erneut BACE1-defiziente und Wildtyp-Mäuse miteinander verglichen. Die Etablierungsversuche erfolgten am BERA-Setup I und wurden mit Einführung des Setup II (siehe Material und Methoden, Kap. 4, Abschn. 2.2) angepasst: Es wurden je sechs Wildtyp- und BACE1-Knockoutmäuse narkotisiert und nach einer initialen BERA mit rechtsseitigem Ohrstöpsel vertäubt. Nach fünf bis acht Tagen wurden erneut BERA-Messungen an beiden Ohren vorgenommen. Die Ergebnisse der Vertäubungsversuche sind in Abb. 5.5 dargestellt. Dort sind die Hörschwellen eines jeden Tieres für 8 (A, C) und 16 kHz (B, D), für beide Vertäubungslautstärken aufgetragen, ersichtlich. Es wurde *post expositionem* je das rechte (unvertäubt) gegen das linke Ohr (vertäubt) eines Tieres verglichen, da bis zum Erreichen einer optimalen Signalqualität von Setup II nur schwer auszuwertende und nicht valide und miteinander vergleichbare Datensätze entstanden sind. Nach einer Lärmbelastung von 100 dB für 75 Minuten (siehe Abb. 5.5 A, B) stiegen die Hörschwellen in der Wildtyp-Population bei 8 kHz im Mittel von 57 auf 70 dB (Δ13 dB). Bei 16 kHz stiegen sie im Mittel von 47 auf 67 dB (Δ20 dB). Bei $BACE1^{-/-}$-Mäusen veränderte sich die Hörschwelle bei 8 kHz nicht (93 vs. 97 dB), wohingegen sie bei 16 kHz im Mittel eine Erhöhung von 73 auf 87 dB (Δ14 dB) aufwies. Für die Vertäubungslautstärke von 110 dB für 75 Minuten (siehe Abb. 5.5 C, D) ließen sich für die Wildtyp-Tiere in den BERA-Messungen sowohl Erhöhungen als auch vermeintliche Senkungen der Hörschwelle beobachten: Die Hörschwelle bei 8 kHz sank im Mittel von 63 auf 50 dB, wohingegen sie für 16 kHz unverändert

blieb (40 vs. 43 dB). Die Hörschwellen der BACE1$^{-/-}$-Mäuse zeigten bei 8 kHz keine Änderungen (90 vs. 93 dB), bei 16 kHz ließ sich im Durchschnitt ein Anstieg der Hörschwellen von 70 auf 83 dB (Δ13 dB) beobachten. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen (n=3/Gruppe) wurde auf eine statistische Testung verzichtet.

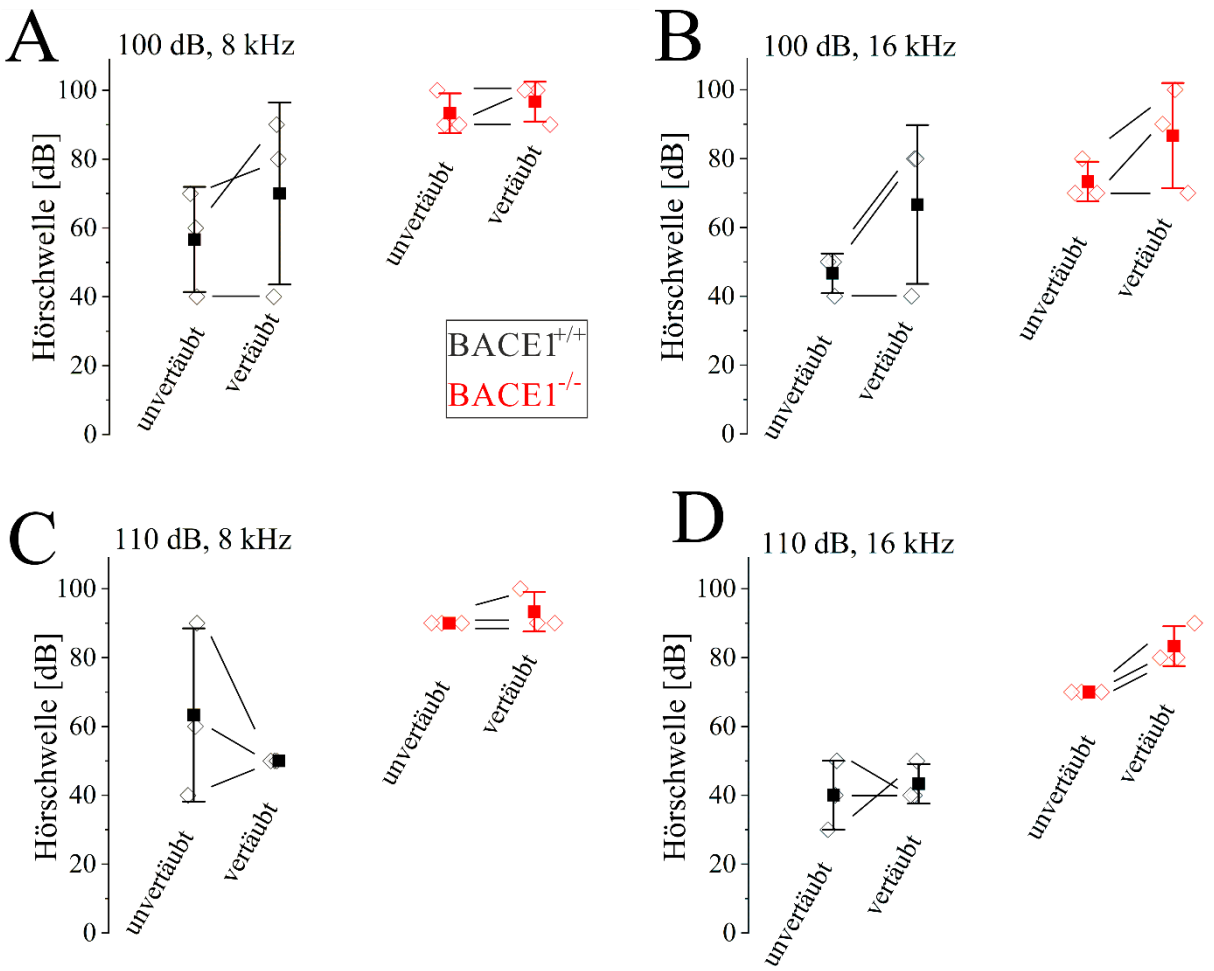

Abb. 5.5: Hörschwellen von Wildtyp- und BACE1$^{-/-}$-Mäusen vor und nach Lärmbelastung

(**A, B**) BERAs von Wildtyp- und Knockout-Mäusen (p66–73) für 8/16 kHz nach 75-minütiger 100-dB- sowie (**C, D**) für 8/16 kHz nach 75-minütiger 110-dB-Beschallung. Die Gruppengröße umfasst je drei Tiere pro Schalldruckpegel. Die Vertäubung erfolgte am linken Ohr, bei geschütztem rechtem Ohr (Ohrstöpsel). Verglichen werden *post expositionem* die rechten (unvertäubt) gegen die linken Ohren (vertäubt). Zwischen Vertäubung und den BERA-Messungen lagen zwischen fünf und acht Tagen. Die Verbindungslinien zeigen den intraindividuellen Unterschied der Hörschwellen eines jeden Tieres nach Vertäubung. Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardfehler.

Der ausbleibende Effekt der 110-dB-Beschallung wird von uns auf technische Limitationen des verwendeten Lautsprechers zurückgeführt. Ein insuffizienter Hörschutz des rechten Ohres muss zusätzlich in Betracht gezogen werden. Stichprobenartige Schalldruckpegelmessungen zeigten während der 8-kHz-Reintonbeschallung regelmäßig Leistungsreduktionen auf bis zu 95 dB. Folglich ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der vermeintlichen 110-dB-Beschallung als solche nicht aussagekräftig und die Ergebnisse der vermeintlichen 100 dB Beschallung demnach kritisch zu betrachten sind. Für zukünftige Versuche sollte ein Lautsprecher mit konstanter Leistung eingesetzt werden.

Nach Abschluss der BERA-Messungen wurden die Tiere dekapitiert und zügig präpariert. Der apikale Anteil (1–1,5 Windungen) der Cortiorgane wurde entnommen und gegen BACE1 oder Synapsin 1, 2 gefärbt (siehe Material und Methoden, Kap. 4, Abschn. 3.2 und 3.4). Alle Präparate wurden mit DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindol) zur Darstellung der Zellkerne gegengefärbt. In Abb. 5.6 A ist der basale Abschnitt eines linken Cortiorganpräparats einer Wildtypmaus abgebildet. Zur Orientierung im Präparat wurde das Nativbild über die DAPI-Färbung gelegt. Eine äußere Haarzelle (OHC) sowie die Stereozilien äußerer Haarzellen wurden in der Abbildung markiert. In Abb. 5.6 B ist eine anti-BACE1-Färbung (rot) eines vertäubten Cortiorgans einer Wildtypmaus dargestellt. Angefärbt wurden die präsynaptischen Anteile der olivocochleären Efferenzen an den äußeren und inneren Haarzellen (Vogl et al. 2015, Dierich et al. 2019). Als Signaläquivalent sind eine Efferenz pro OHC sowie mehrere pro IHC zu erkennen. In den Knockout-Kontrollen (Abb. 5.6 C) zeigten sich die Intensität und die Dichte der Signale gemindert. Die Verteilung der Immunfluoreszensantworten im Bereich der basalen Pole der OHC wirkt im Vergleich zu den Wildtyppräparaten unspezifisch. An den Polen der inneren Haarzellen zeigte sich allenfalls eine marginale Minderung der Signaldichte, deren Verteilung jener in den Wildtyppräparaten gleicht. Mithilfe von Kolokalisationsfärbungen konnten in nicht akustischen Stress ausgesetzten Populationen identische Synapsenzahlen an den basalen Polen der IHC und OHC nachgewiesen werden (Dierich et al. 2019). Interessant ist jedoch, dass sich die präsynaptischen Endigungen an den inneren Haarzellen balloniert darstellten (Dierich et al. 2019). Zusammengefasst gehen wir davon aus, dass der für diese Arbeit verwendete anti-BACE1-Antikörper an die BACE1-haltigen, präsynaptischen, olivocochleären Efferenzen, aber auch an andere unspezifische Kompartimente im Cortiorgan bindet.

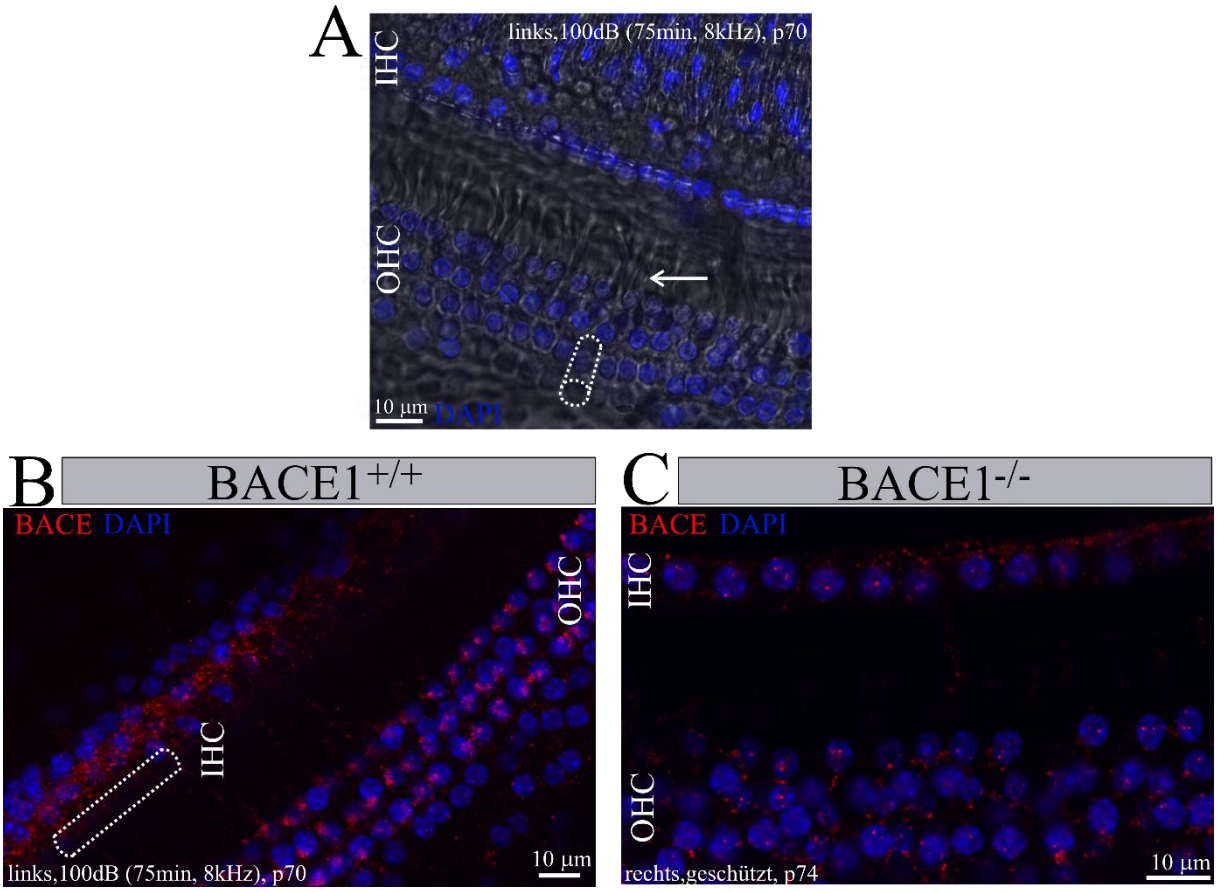

Abb. 5.6: BACE1-Expression in Cortiorganen von BACE1$^{-/-}$- und Wildtyp-Mäusen

Nach den Vertäubungsversuchen wurden die Cortiorgane der Tiere (BACE1$^{+/+}$ n=3, mit Verlust eines Organpräparatpaares; BACE1$^{-/-}$ n=1) entnommen und mit Hilfe von anti-BACE1 (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Mit dem konfokalen Mikroskop wurden die Präparate mit Anregungswellenlängen von 405 nm und 561 nm aufgenommen. (**A**) Übersichtsaufnahme eines basalen Abschnittes einer Wildtypmaus mit Projektion des lichtmikroskopischen Nativbildes des Präparats. Sichtbar sind äußere Haarzellen (OHC, gestrichelte Umrandung) und ihre Stereozilien (weißer Pfeil). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. (**B**) Aufnahme eines basalen Abschnittes eines vertäubten Cortiorgans einer BACE1$^{+/+}$-Maus sowie (**C**) eines apikalen Abschnittes eines unvertäubten Cortiorgans einer BACE1$^{-/-}$-Maus. Die gestrichelte Markierung innerhalb der Abbildung markiert den Bereich der inneren Haarzellen (IHC).

Weiterhin wurden anti-Synapsin-Färbungen an den Cortiorganen vertäubter wie unvertäubter Ohren vorgenommen. Durch genannte Antikörper werden ebenfalls olivocochleäre Efferenzen erkennbar (Dierich et al. 2019). In Abbildung 5.7 A, B sind die jeweils unvertäubten, rechten Cortiorgane einer Wildtypaus sowie einer BACE1$^{-/-}$-Maus immunhistochemisch dargestellt. Die Zellkerne der inneren- wie äußeren Haarzellen (blau) sind in den unvertäubten Cortiorganen beider Tiere intakt. Am basalen Pol der äußeren Haarzellen (OHC) lässt sich in den Cortiorganen beider Genotypen ein anti-Synapsin-positives, punktförmiges Signal (rot)

pro Haarzelle erkennen. An den inneren Haarzellen (IHC) liegen pro Zelle mehrere solcher Signale vor. In Abb. 5.7 C und D sind die Cortiorgane der vertäubten, linken Ohren derselben Tiere dargestellt. Auch hier sind intakte Zellkerne der IHC und OHC feststellbar. Die anti-Synapsin-positiven Signale an den OHC scheinen nach Vertäubung in beiden Genotypen unverändert. Die anti-Synapsin-positiven Strukturen an den IHC des vertäubten Wildtyp-Cortiorgans scheinen hingegen deutlich reduziert. An den basalen Polen der IHC der BACE1$^{-/-}$-Mäuse sind nach Lärmbelastung weiterhin mehrere anti-Synapsin-positive Signale pro Haarzelle identifizierbar. Anzumerken ist, dass eine vergleichende Quantifizierung im Rahmen der methodischen Etablierung nicht erfolgte. Die in Abb. 5.7 B und D dargestellten Aufnahmen für basale Abschnitte der Cortiorganpräparate von BACE1$^{-/-}$-Mäusen ließen sich mehrfach reproduzieren (n=4). Für Wildtyptiere wie in Abb. 5.7 A und C gezeigt lässt sich aufgrund eines einzelnen Präparatpaares keine vergleichende Aussage treffen.

Die tonotopische Gliederung des Cortiorgans (M. Müller et al. 2005) ermöglichte es, die von uns gewünschten Bereiche (8–16 kHz) auf dem Cortiorganpräparat zu identifizieren. Bei der Etablierung der Versuchsreihe ergaben sich mehrere noch zu überwindende Hindernisse: Präparationsbedingt waren die Bereiche um 16 und 32 kHz nur schwer zu erlangen. Da vor allem basale Abschnitte innerhalb des erhaltenen Cortiorganpräparats von Lärmschäden betroffen sind, ist eine auf Dekalzifikation beruhende Präparation der Cochlea zu diskutieren. Die verwendeten Glasbodenträger beschränkten häufig die Einsicht in das Präparat oder verhinderten aufgrund eines sich im Einbettungsprozess gedrehten Präparats gänzlich dessen Verwendung. Aufgrund notwendiger Manipulationsschritte während des Einbettungsvorganges kam es häufig zu einer sukzessiven Zerstörung des Cortiorgans (z. B. Zerreißungen). Die Möglichkeit eines schonenderen Einbettens wie auch einer beidseitigen Betrachtung wäre von Vorteil.

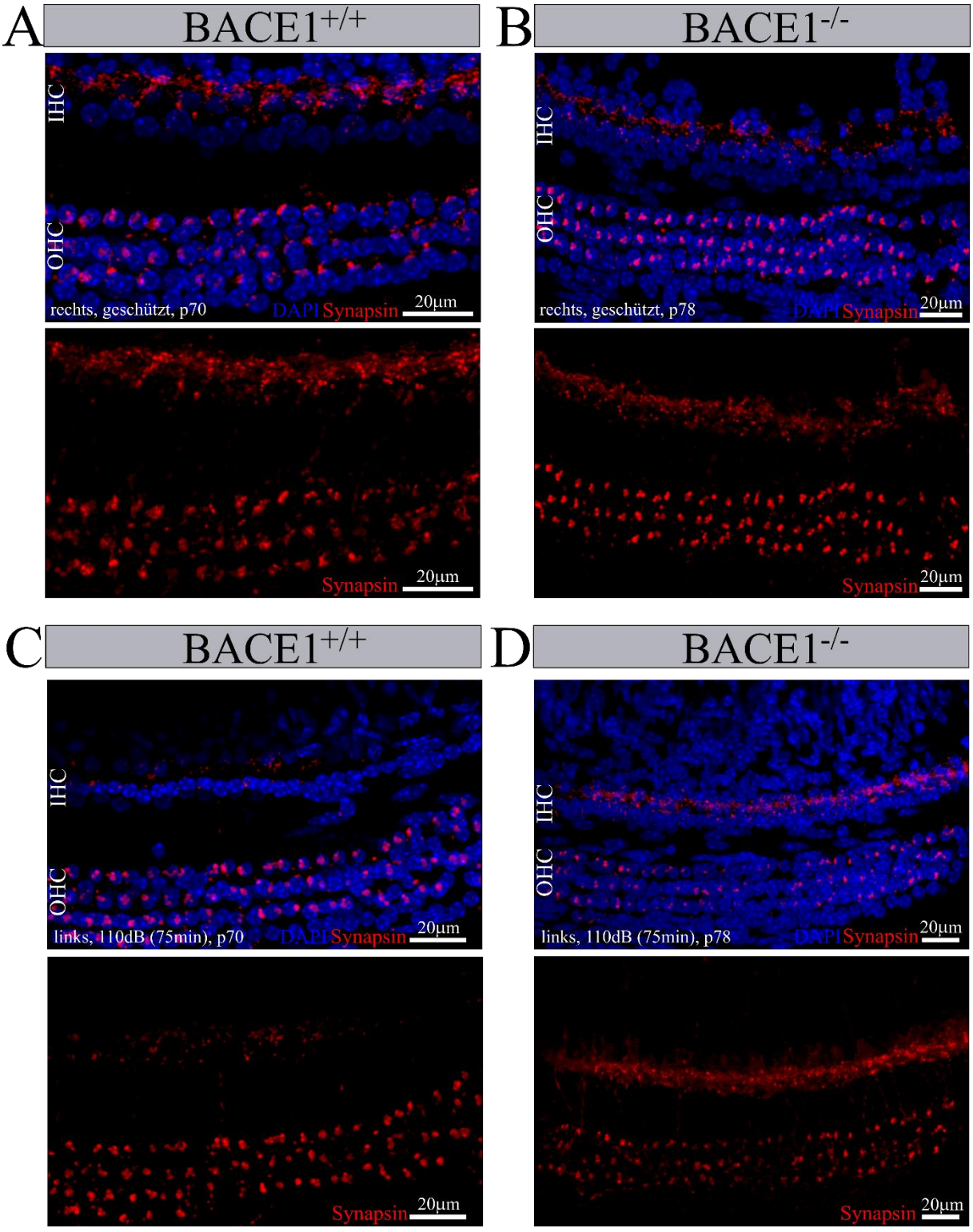

Abb. 5.7: Immunhistochemische Darstellung präsynaptischer Strukturen Synapsin-gefärbter, unvertäubter und vertäubter Cortiorgane von BACE1$^{-/-}$- und Wildtyp-Mäusen

Nach den Vertäubungsversuchen wurden die Cortiorgane der Tiere (BACE1$^{+/+}$ n=3, wovon die Präparate lediglich eines Tieres verwendbar waren; BACE1$^{-/-}$ n=4) entnommen und mit Hilfe von anti-Synapsin (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Mit dem konfokalen Mikroskop wurden die Präparate mit Anregungswellenlängen von 405 nm und 561 nm aufgenommen. Die Darstellungen (A–D) wurden mithilfe von Z-Stacks in Intensitätsprojektion

erstellt (siehe Material und Methoden). Für die Gegenüberstellung wurden Z-Stacks verwendet, die (annähernd) gleiche Laserkonfigurationen nutzten (8A, 8B Mastergain 669 Laserintensität 0,3 %; 8C Mastergain 700, Laserintensität 0,4 %; 8D Mastergain 669, Laserintensität 0,5 %). Die Abbildungen sind so ausgerichtet, dass sich die inneren Haarzellen (IHC) oben und die äußeren Haarzellen (OHC) unten im Bild befinden. Immunhistochemische Aufnahmen basaler Abschnitte eines rechten, unvertäubten Cortiorganpräparats (**A**) einer Wildtypmaus sowie (**B**) einer BACE1-Knockoutmaus. Es zeigen sich in beiden Stämmen anti-Synapsin-positive Signale an den basalen Polen von IHC und OHC. Aufnahmen der basalen Abschnitte des Präparats der vertäubten, linken Cortiorgane (**C**) derselben Wildtyp- sowie (**D**) derselben BACE1$^{-/-}$-Maus.

5.6 Effekt einer sechswöchigen BACE1-/BACE2-Inhibitor-Behandlung mit NB-360 auf C57BL/6N-Mäuse

Im folgenden Experiment wurden die Auswirkungen einer sechswöchigen oralen Behandlung mit dem potenten und nachweislich Blut-Hirn-Schranken-gängigen BACE1/BACE2-Inhibitor NB-360 (Neumann et al. 2015) (Novartis Pharma, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) auf das Hörvermögen von C57BL/6N-Mäusen untersucht. Das *ad libitum* zur Verfügung gestellte Futtermittel enthielt NB-360 in einer Konzentration von 0,3 mg/g.

Der C57BL/6N-Stamm zeigt identische Profile eines altersbedingten Hörverlustes, wie es für C57BL/6J-Mäuse beschrieben ist (Kane et al. 2012). Der C57BL/6-Stamm stellt die genetische Grundlage des in vorherigen Versuchsteilen verwendeten BACE1^{tm1Psa}-Stammes dar (Dominguez et al. 2005). Bei BACE1-defizienten Mäusen stellten wir im Vergleich zu gesunden Geschwistertieren (C57BL/6J) zusätzliche auditorische Defizite fest. Die Fragestellung der nachfolgend näher erörterten Versuchsreihe war, ob durch eine sechswöchige Behandlung adulter C57BL/6N-Mäuse mit dem BACE1/2-Inhibitor NB-360 ähnliche Defizite im auditorischen System hervorgerufen werden, wie sie für den BACE1-defizienten Mausstamm beschrieben wurden (Dierich et al. 2019).

5.6.1 Eine sechswöchige NB-360-Verabreichung verursacht eine Störung der Melaninsynthese.

Wenige Tage nach Beginn der Fütterung, deutlich jedoch nach ca. zwei Wochen, beobachteten wir eine Ergrauung im Fell der Behandlungsgruppe (n=10). Diese reichte von einzelnen ergrauten Haaren bis hin zu einer nahezu generalisierten Graufärbung des Integuments der Maus (siehe Abb. 5.8). Diese Beobachtung wird als dosisabhängiger Effekt von NB-360 beschrieben (Neumann et al. 2015, Shimshek et al. 2016) und diente uns als Indikator für eine

erfolgreich durchgeführte NB-360-Behandlung. Zurückzuführen ist der zuvor genannte Effekt auf eine durch NB-360 verursachte irreversible dosisabhängige Verminderung von Melaninpigmenten aufgrund einer Störung der Prozessierung von PMEL27 durch BACE2 in den Melanozyten der betroffenen Haarwurzeln (Shimshek et al. 2016).

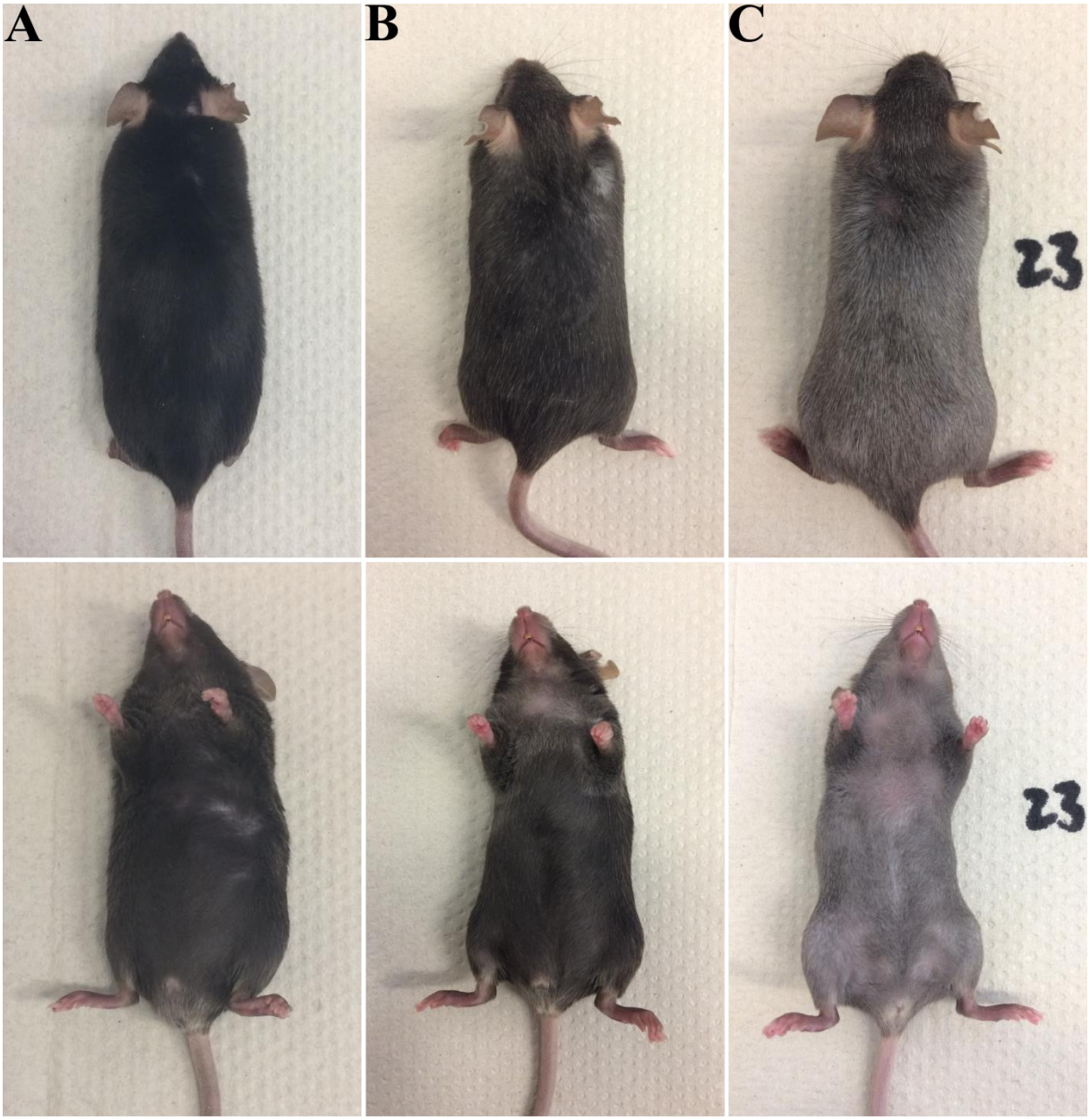

Abb. 5.8: Fellphänotypen nach einer sechswöchigen Behandlung mit NB-360

(A) Erscheinungsbild von unbehandelten C57BL6/N-Mäusen gegenüber **(B, C)** BACE1-/BACE2-Inhibitor-NB-360-behandelten Tieren. Die Versuchsgruppe bestand aus 20 Mäusen gemischten Geschlechtes im Alter von vier Wochen, von denen zehn Tiere für sechs Wochen mit NB-360-versetztem Pelletfutter (0,3 mg/g) gefüttert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt ein pharmakonfreies Futtermittel identischer Zusammensetzung. Beide Ver-

suchsgruppen hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und entsprechendem Futter. Zur Verdeutlichung des potenziellen Ausmaßes der Nebenwirkung wird hier eine milde Ausprägung wie auch die Maximalvariante der beobachteten Ergrauung des Fells gezeigt. Nebenstehende Ziffern innerhalb der Abbildung bezeichnen die Nummerierung des Tieres innerhalb der Versuchsreihe.

5.6.2 Die sechswöchige BACE1/2-Inhibition mit NB-360 beeinträchtigt die Hörschwellen nicht.

Im Rahmen der Versuchsreihe wurden BERA-Messungen am neuen Setup (siehe Material und Methoden, Kap. 4, Abschn. 2.2) im direkten Anschluss an die abgeschlossene orale Behandlung mit dem BACE-Inhibitor (NB-360) durchgeführt. Durch diese Messungen sollten akute, gegebenenfalls passagere Folgen der Medikation detektiert werden. In den erhobenen Daten wurden die Hörschwellen der Versuchsgruppen, die Latenzen sowie die Interlatenzen und Amplituden der Wellen P1 bis P5 untersucht. In Abb. 5.9 A und B sind repräsentative evozierte Hirnstammaudiometrien eines unbehandelten und eines NB-360-behandelten Tieres für 8 und 16 kHz dargestellt. Im direkten Vergleich sind keine Auffälligkeiten zu erkennen. Mit Blick auf das für vier Frequenzen (4, 8, 16, 32 kHz) erstellte Audiogramm der Versuchsgruppen (Abb. 5.9 C) zeigen sich im Bereich des optimalen Hörens der Tiere (12–24 kHz) (Zheng et al. 1999) keine Unterschiede in der Hörschwelle zwischen den Versuchsgruppen. Die Frequenzen außerhalb des optimalen Hörbereiches betrachtend, hier repräsentiert durch die BERAs bei 4 und 32 kHz, lassen sich im Tieftonbereich (4 kHz) indes Unterschiede feststellen. Im Hochtonbereich waren hingegen keine Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Tieren zu beobachten. Es scheint sich im Tieftonbereich, entgegen jeglichen Erwartungen, um eine vermeintliche Verbesserung des Hörvermögens der NB-360-behandelten Mäuse zu handeln. Für diese scheinbare Verbesserung der Hörfähigkeiten durch eine BACE-Inhibitorbehandlung findet sich jedoch keine sinnvolle wissenschaftliche Erklärung, sodass jene als sehr unwahrscheinlich zu bewerten ist. Zudem zeigten immunhistochemische Untersuchungen an denselben NB-360-behandelten Tieren sowohl eine unauffällige Anzahl afferenter Synapsen an den inneren Haarzellen als auch eine normale Konfiguration der Postsynapsen (Dierich et al. 2019). Darüber hinaus wurde eine Demyelinisierung präganglionärer Typ-I-Afferenzen des Innenohres, wie sie bei BACE1$^{-/-}$-Mäusen nachgewiesen wurde, immunhistochemisch ausgeschlossen (Dierich et al. 2019). Die dargelegte Datenlage lässt die Behauptung zu, dass eine sechswöchige Behandlung mit dem hier verwendeten BACE1-/BACE2-Inhibitor (NB-360) aller Wahrscheinlichkeit nach keine schädlichen Folgen auf das Innenohr von C57BL6/N-Mäusen im Sinne einer iatrogenen Hypakusis, Demyeleni-

sierungen von Typ-I-Afferenzen, Desorganisation oder Verminderung von Synapsen der IHC nach sich zieht.

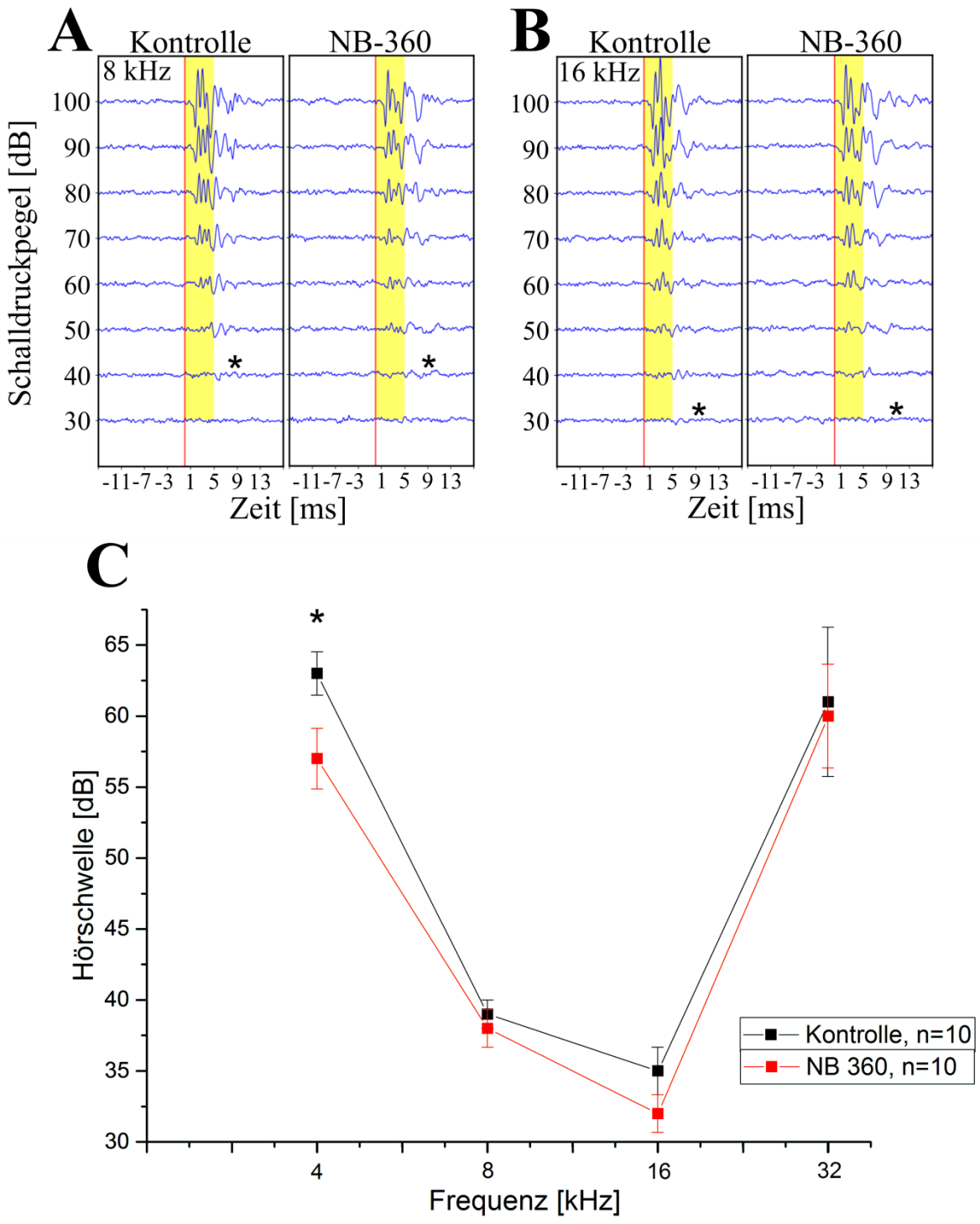

Abb. 5.9: Hörschwellen von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen

(A, B) Gegenüberstellung über 1600 Wiederholungen gemittelter repräsentativer BERA-Daten für die 8- und 16-kHz-Spuren eines Kontroll- und NB-360-Versuchstieres. Der Stern kennzeichnet den Schalldruckpegel, bei dem die Hörschwelle bestimmt wurde (siehe Material und Methoden). **(C)** Gemitteltes Audiogramm von sechs Wo-

chen per os mit NB360-behandelten Mäuse (0,3 mg/g Futtermittel) der C57BL6/N-Reihe (rot). Verglichen wird mit unbehandelten Kontrolltieren (schwarz) desselben Alters (zehn Wochen). Aufgetragen sind die mittleren Hörschwellen bei einer Frequenz von 4, 8, 16 und 32 kHz. Die Beschallung erfolgte mit Reintönen bei einer Gruppengröße von jeweils zehn Tieren gemischten Geschlechtes (Mittelwert und SEM, *p < 0,05, t-Test für unverbundene Stichproben).

5.6.3 Sechs Wochen der NB-360-Verabreichung haben keinen Einfluss auf die Latenzen und Interlatenzen im auditorischen System.

In unseren bisherigen Versuchen konnte für BACE1$^{-/-}$-Mäuse nachgewiesen werden, dass sowohl die Hörschwellen als auch die Latenzen, Interlatenzen und Amplituden im Vergleich zu Wildtypmäusen negativ affektiert sind. Um zu evaluieren, ob eine sechswöchige medikamentöse Blockade der β-Sekretase 1 (BACE1) im adulten Wildtyp-Tier denselben zuvor für BACE1$^{-/-}$-Mäuse beschriebenen Phänotyp hervorruft, wurden die audiometrischen Daten der mit NB-360 behandelten C57BL/6N-Mäuse analysiert. In Abb. 5.10 A und B sind sowohl BERA-Rohdaten des neuen Setups (A) als auch durch Mittelung erhaltene BERA-Spuren für verschiedene Frequenzen (B) dargestellt. Für die Latenzen der Welle I (P1) (siehe Abb. 5.10 C) ergaben sich zwischen den NB-360-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede für keine der untersuchten Frequenzen (4, 8, 16, 32 kHz). Dasselbe Ergebnis erbrachte der Vergleich der Interlatenzen der Welle I (P1) bis V (P5) beider Gruppen (siehe Abb. 5.11). Zusätzlich wurden die Interlatenzen zwischen den einzelnen Stationen der Hörbahn zwischen NB-360-behandelten Tieren und Wildtypmäusen verglichen (siehe Tab. 5.1). Insgesamt konnten wir keine Interlatenzunterschiede zwischen NB-360-behandelten und unbehandelten Tieren feststellen.

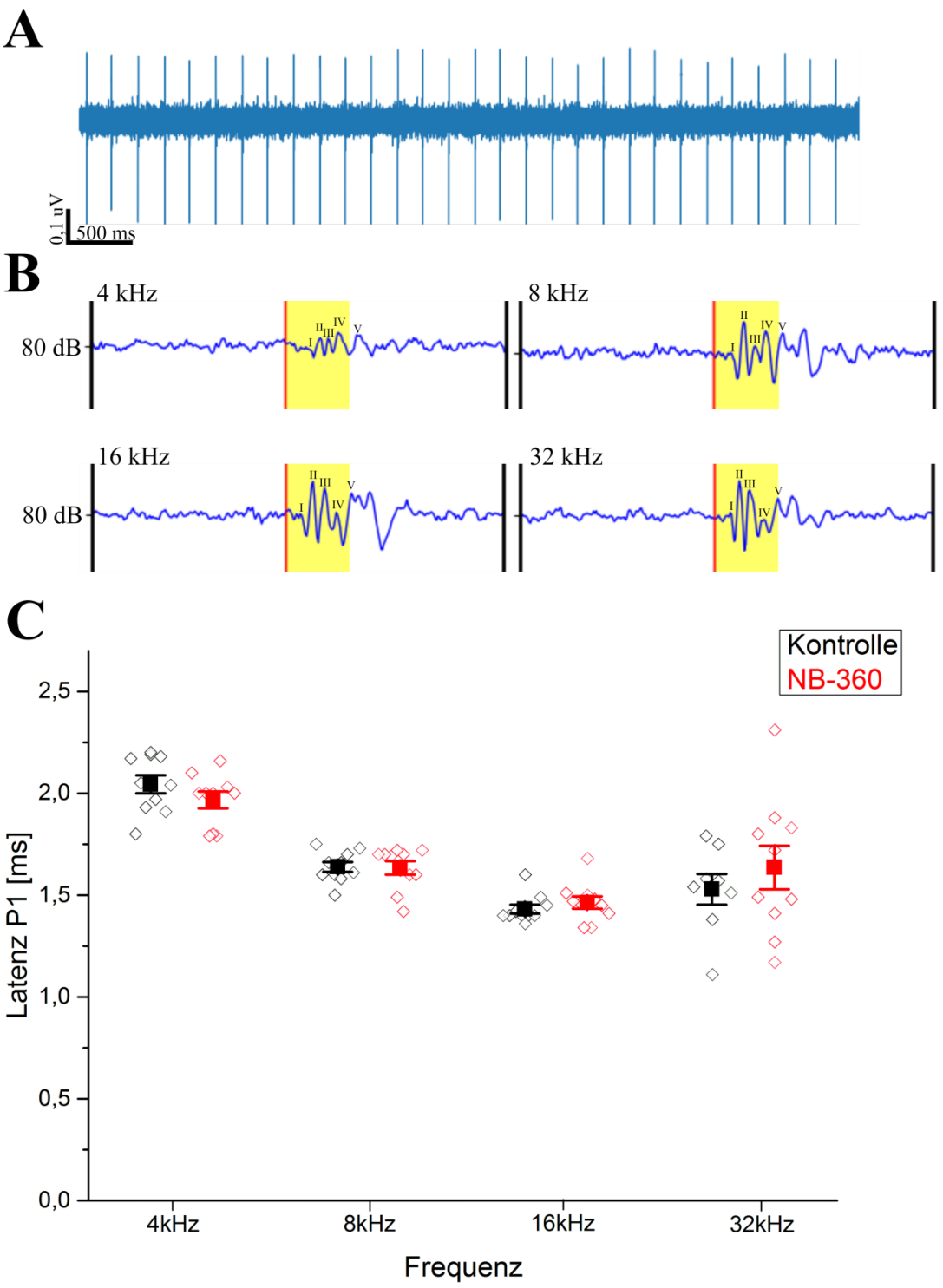

Abb. 5.10: Frequenzspezifische P1-Latenz von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen

(**A**) Darstellung eines Ausschnittes der BERA-Signale über sechs Sekunden. Es sind EKG-Signale als regelmäßig auftretende Peaks sowie das BERA-Signal, das die audiometrischen Hirnstammsignale enthält, zu erkennen. Durch Mittelung von 1600 Samples ergeben sich die in (**B**) für 80 dB exemplarisch dargestellten BERA-Spuren. Innerhalb dieser Spuren wurden die Wellen P1 (I) bis P5 (V) gekennzeichnet. (**C**) Vergleich der gemittelten Latenzen von Welle P1 als Ausdruck der peripheren Verarbeitung akustischer Signale, von sechs Wochen mit BACE-Inhibitor-NB-360-gefütterten (0,3 mg/g Futtermittel) C57BL/6N-Mäusen (rot) gegenüber einer unbehan-

delten Kontrollgruppe (schwarz) bei unterschiedlichen Frequenzen. Beschallt wurde in Reintönen bei 4, 8, 16 und 32 kHz mit variierenden Schalldruckpegeln und Mittelung von je 1600 Wiederholungen pro SPL. Generiert wurden die Daten mittels BERA, für die Abbildung wurden die 80-dB-Spuren ausgewertet. Die Versuchsgruppen (je n=10) wiesen das gleiche Alter der Tiere auf (zehn Wochen), bei gemischten Geschlechterverhältnissen. Eine Ausnahme bildete die Kontrollgruppe bei 32 kHz (n=8). Es entfielen zwei Tiere, da ihre Hörschwelle bei genannter Frequenz oberhalb des untersuchten Schalldruckpegels (80 dB) lag. Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwerte und der SEM.

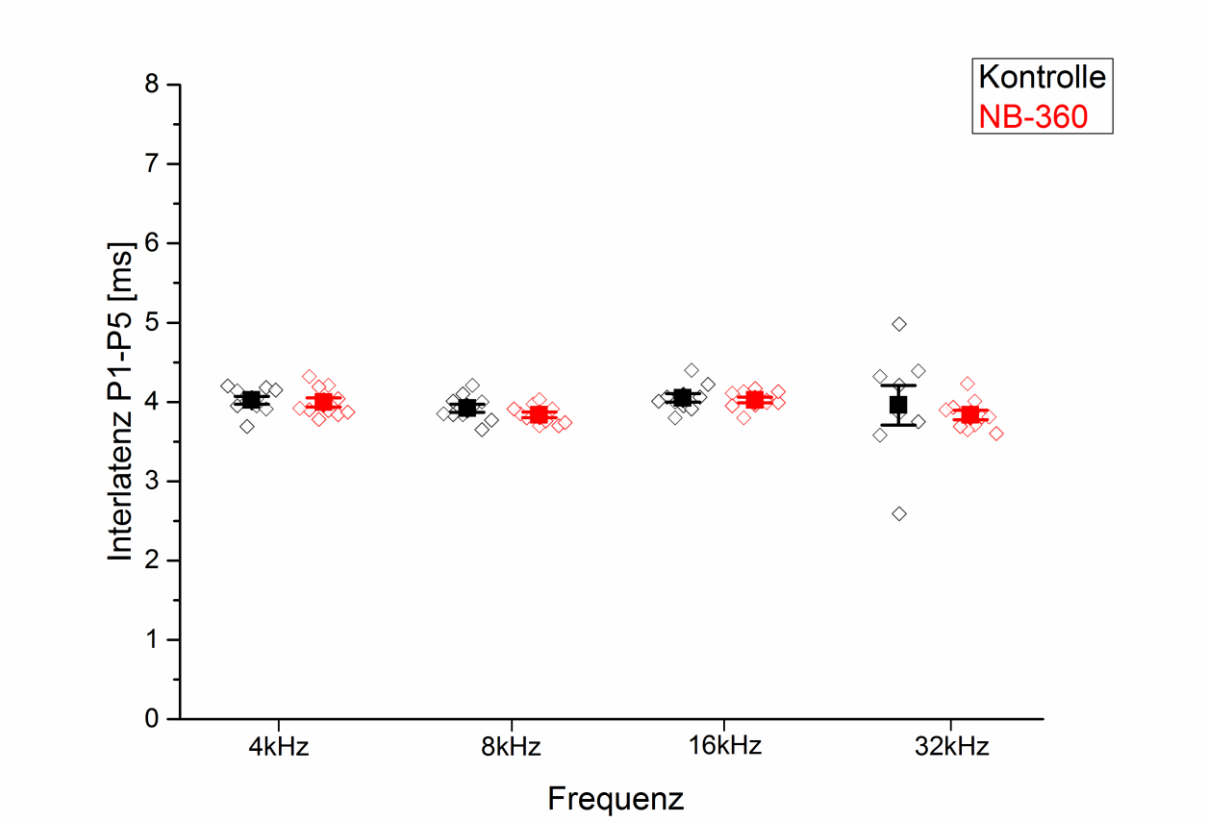

Abb. 5.11: Frequenzspezifische Interlatenzen von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen

Vergleich der Interlatenzen von P1 bis P5 als Maß für die weitere audiometrische Verarbeitung von sechs Wochen mit BACE-Inhibitor NB-360 per os behandelten (0,3 mg/g Futtermittel) C57BL/6N-Mäusen (rot) gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe (schwarz) bei verschiedenen Frequenzen. Beschallt wurde in Reintönen bei 4, 8, 16 und 32 kHz mit variierenden Schalldruckpegeln und Mittelung von 1600 Wiederholungen pro SPL. Gemessen wurden die Daten mittels BERA, für die Abbildung wurden die Rohdaten der 80-dB-Spuren, wie sie exemplarisch in Abb. 5.10 dargestellt sind, ausgewertet. Die Geschlechter waren gemischt, Alter und Gruppengröße identisch (zehn Wochen, n=10). Eine Ausnahme bildete die Kontrollgruppe bei 32 kHz (n=8). Es entfielen zwei Tiere, da ihre Hörschwelle bei genannter Frequenz oberhalb des untersuchten Schalldruckpegels (80 dB) lag. Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwerte und der SEM.

Tabelle 5.1: Frequenzspezifische Interlatenzen von unbehandelten C57BL6/N-Mäusen gegenüber NB-360-behandelten Tieren

Vergleich der einzelnen Interlatenzen zwischen P1 und P5 als Maß für die Signalverarbeitung entlang der Stationen der Hörbahn von sechs Wochen mit BACE-Inhibitor NB-360 per os behandelten (0,3 mg/g Futtermittel) C57BL/6N-Mäusen gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe bei verschiedenen Frequenzen. Beschallt wurde in Reintönen bei 4, 8, 16 und 32 kHz mit variierenden Schalldruckpegeln und Mittelung von 1600 Wiederholungen pro SPL. Gemessen wurden die Daten mittels BERA, für die Tabelle wurden die Rohdaten der 80-dB-Spuren ausgewertet. Die Geschlechter waren gemischt, Alter und Gruppengröße identisch (zehn Wochen, n=10). Eine Ausnahme bildete die Kontrollgruppe bei 32 kHz (n=8). Es entfielen zwei Tiere, da ihre Hörschwelle bei genannter Frequenz oberhalb des untersuchten Schalldruckpegels (80 dB) lag. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SEM. Es ergab sich für keine der aufgeführten Interlatenzen ein signifikanter Unterschied.

Interlatenz	Frequenz	Mittelwert ± SEM Kontrolle	Mittelwert ± SEM NB-360
P1–P2	4 kHz	0,85 ms ± 0,05 ms	0,87 ms ± 0,04 ms
	8 kHz	0,89 ms ± 0,04 ms	0,88 ms ± 0,03 ms
	16 kHz	0,90 ms ± 0,02 ms	0,86 ms ± 0,02 ms
	32 kHz	0,75 ms ± 0,04 ms	0,77 ms ± 0,05 ms
P2–P3	4 kHz	0,70 ms ± 0,04 ms	0,80 ms ± 0,07 ms
	8 kHz	0,86 ms ± 0,03 ms	0,84 ms ± 0,03 ms
	16 kHz	0,92 ms ± 0,02 ms	0,88 ms ± 0,02 ms
	32 kHz	0,84 ms ± 0,04 ms	0,87 ms ± 0,02 ms
P3–P4	4 kHz	0,85 ms ± 0,04 ms	0,80 ms ± 0,05 ms
	8 kHz	0,73 ms ± 0,02 ms	0,73 ms ± 0,03 ms
	16 kHz	0,90 ms ± 0,06 ms	0,96 ms ± 0,04 ms
	32 kHz	1,4 ms ± 0,2 ms	1,1 ms ± 0,0 ms
P4–P5	4 kHz	1,6 ms ± 0,0 ms	1,5 ms ± 0,0 ms
	8 kHz	1,4 ms ± 0,0 ms	1,4 ms ± 0,0 ms
	16 kHz	1,3 ms ± 0,1 ms	1,3 ms ± 0,0 ms
	32 kHz	1,0 ms ± 0,1 ms	1,1 ms ± 0,1 ms

5.6.4 Die sechswöchige NB-360-Gabe bewirkt keine Veränderung der Amplituden.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden aus den audiometrischen Daten beider Versuchsgruppen (NB-360, Kontrolle) die Amplituden der Wellen P1–P5 bei 80 dB Peak-to-Peak aus den Hirnstammaudiometrien bestimmt und miteinander verglichen (siehe Abb. 5.12). Erneut wurden

die Daten jeder in Reinton präsentierten Frequenz (4, 8, 16 und 32 kHz) betrachtet und aufgetragen. Im Frequenzbereich von 8 (B) und 16 kHz (C) identifizierten wir die höchsten Absolutwerte sämtlicher Amplituden in beiden Versuchspopulationen. Vergleichend dazu beobachteten wir außerhalb des Bereiches des optimalen Hörens der Tiere, repräsentiert durch 4 (A) und 32 kHz (D), niedrigere Amplituden. Aus den unten gezeigten Grafiken ist zu entnehmen, dass der über sechs Wochen verabreichte BACE1-/BACE2-Inhibitor (NB-360) keine Auswirkungen auf die Amplituden (P1–P5) der untersuchten Frequenzen hat.

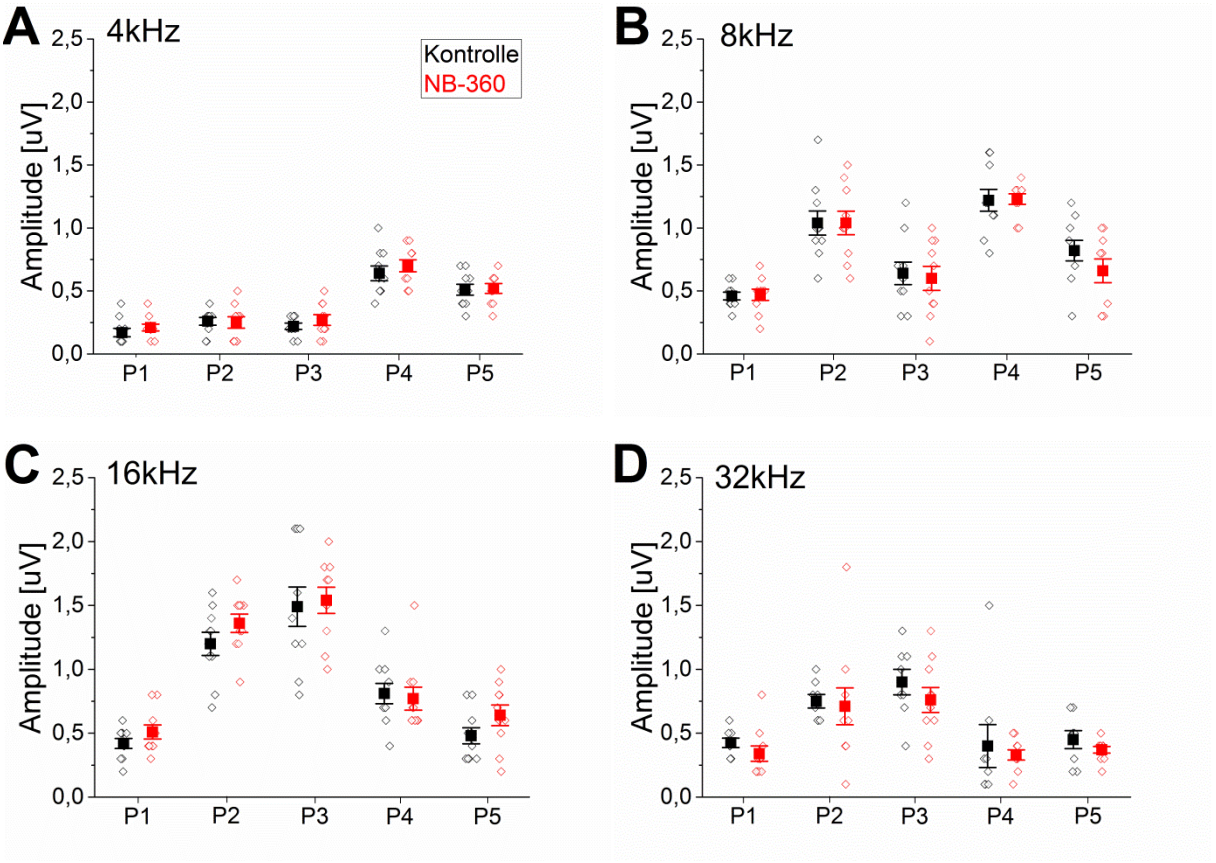

Abb. 5.12: Frequenzspezifische Wellenamplituden von NB-360-behandelten C57BL6/N-Mäusen

Darstellung der Amplituden der Wellen P1 bis P5 von sechs Wochen mit BACE-Inhibitor NB-360 per os behandelten (0,3 mg/g Futtermittel) C57BL/6N-Mäusen (rot) gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe (schwarz) identischen Alters (zehn Wochen) und gemischten Geschlechtes. Die herangezogenen Datensätze wurden mittels BERA generiert und beliefen sich auf die 80-dB-Spuren bei Beschallungsfrequenzen von (**A**) 4, (**B**) 8, (**C**) 16 und (**D**) 32 kHz. Zugehörige Rohdaten sind exemplarisch in Abb. 5.10 dargestellt. Die Anzahl der Gruppengröße belief sich auf n=10 mit Ausnahme der Kontrollgruppe bei 32 kHz (n=8). Bei genannter Frequenz entfielen zwei Versuchstiere aufgrund einer über 80 dB SPL liegenden Hörschwelle. Dargestellt sind Einzelwerte, Mittelwerte und der SEM.

6. Diskussion

Die mittels BERA nachgewiesene und in dieser Arbeit präsentierte ausgeprägte Hörminderung von BACE1-knockout-Mäusen wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür liefert die Tatsache, dass der genetisch vorbelastete Ausgangsstamm (C57BL/6) bereits ab einem Alter von sechs Monaten progrediente Hörminderungen entwickelt (Hunter & Willott 1987). Dies bedeutet, dass das Zeitfenster für die Diagnose weiterer entwicklungsbedingter Ursachen in unserem gewählten Mausmodell sehr klein ist. Darüber hinaus ist in diesem Zeitfenster eine aufwendige audiometrische Analyse notwendig. Um diesen Einflussfaktor so gut wie möglich zu umgehen, untersuchten wir adulte Mäuse im Alter von 38 bis 44 Tagen.

Erwähnenswert ist, dass bereits auf akustischen Stimuli basierende Verhaltensversuche (Präpulsinhibitionsversuche) mit vier bis acht Monate alten BACE1$^{-/-}$-Mäusen existieren. Die Tiere wiesen verlängerte Startle-Latenzen (bei gleicher Amplitude) gegenüber ihren Wildtypgeschwistern auf (Savonenko et al. 2008). Aufgrund der Tatsache, dass Präpulsinhibitionsversuche ein sensibles Gehör voraussetzen, sollten die Ergebnisse der Autoren reevaluiert werden, da wir Höreinschränkungen bei BACE1$^{-/-}$-Mäusen nachweisen konnten. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Ergebnisse der Präpulsinhibitionsversuche durch die bestehenden Höreinschränkungen beeinflusst wurden.

6.1 BACE1 ist bedeutsam in der Entwicklung des peripher-nervalen auditorischen Systems.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, prozessiert BACE1 im peripheren Nervensystem Neuregulin 1 (NRG1) (Cheret et al. 2013), das anschließend über ErbB-Rezeptoren seine Funktion in der Myelinisierung peripherer Nerven wahrnimmt (Hu et al. 2016). Ein Mangel an BACE1 führt konsekutiv zu einer Verminderung von prozessiertem NRG1 (Garratt et al. 2000, Lemke 2006), somit zu Hypomyelinisierungen und schließlich zu einer beeinträchtigten Nervenleitgeschwindigkeit (Taveggia et al. 2005) (siehe Einleitung, Kap. 3, Abschn. 2). Folglich könnte der *N. cochlearis* als Teil des peripheren Nervensystems in den in dieser Arbeit untersuchten BACE1$^{-/-}$-Mäusen ebenfalls betroffen sein und so negative Auswirkungen auf die Hörfähigkeiten der Tiere haben. Weiterhin interagiert BACE1 direkt mit der Familie der KCNQ-Kanäle (Agsten et al. 2015, Hessler et al. 2015), wovon im Innenohr KCNQ1 (*stria vaskularis*) und KCNQ4 (äußere Haarzellen, OHC) exprimiert werden. Diese Kanäle halten den hohen Kaliumgehalt der Endolymphe aufrecht (KCNQ1) (Offner et

al. 1987, Maljevic et al. 2010) und wahren die Leitfähigkeit an den OHC (KCNQ4) (Kubisch et al. 1999, Kharkovets et al. 2000, 2006) (siehe Einleitung, Kap. 3, Abschn. 2). Folglich erscheint es denkbar, dass der komplexe periphere Hörvorgang durch die Abwesenheit der BACE1 maßgeblich beeinträchtigt wird.

Um der Fragestellung eines reduzierten Hörvermögens nachzugehen, wurden BERA-Messungen an BACE1$^{-/-}$-Mäusen durchgeführt und mit Wildtypen verglichen. Mäuse des genetisch vorbelasteten Ausgangsstammes C57BL6/J entwickeln ab einem Alter von sechs bis sieben Monaten eine progrediente Hypakusis, die innerhalb weiterer sechs bis sieben Monate in einer Einbuße von 45–60 dB des Hörvermögens in einem Frequenzbereich von 6–10 kHz bzw. 20–32 kHz resultiert (Hunter & Willott 1987). Daher wurden für diesen Versuchsteil BACE1$^{-/-}$-Mäuse und deren BACE1$^{+/+}$-Geschwistertiere im Alter von sechs bis sieben Wochen (p38–44) untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Hörschwellen von BACE1$^{-/-}$-Tieren bei 16 kHz um ca. 30 dB erhöht sind (Abb. 5.1 D). Zusätzlich identifizierten wir in den Hirnstammaudiometrien signifikante Latenzverlängerungen von P1 um 0,4–0,7 ms (Abb. 5.2 C, D), Interlatenzverlängerungen zwischen P1 und P5 (Abb. 5.3 A) und signifikante Amplitudenminderungen der Welle P1 bei überschwelliger akustischer Reizung (Abb. 5.4 A). Diese Ergebnisse gehen mit denen von Studien an Nagern mit peripheren Myelinisierungsstörungen konform: Long und Mitarbeiter/-innen zeigten auf, dass die Beeinträchtigung des Myelins durch Pmp22(peripheral myelin protein 22)-Mutationen oder den Verlust von PLP (proteolipid protein) zu erhöhten Hörschwellen, reduzierten Amplituden und verlängerten Latenzen in der BERA führte (Long et al. 2018). Somit ist es plausibel, dass es durch den Mangel des durch BACE1 prozessierten NRG1 zu Hypomyelinisierungen der auditorischen Nervenfasern kommt (Dierich et al. 2019), folglich die nervale Signalweiterleitung beeinträchtigt wird und so die zuvor genannten Ergebnisse unserer Messungen mitbedingt werden.

Basierend auf unseren Ergebnissen sollten im Rahmen des Projektes die distorsiv produzierten otoakustischen Emissionen (DPOAE) im Labor unserer Göttinger Kooperationspartner (Nadine Dietrich & Tobias Moser, Institut für Auditorische Neurowissenschaften & InnenohrLabor, Universitätsmedizin Göttingen) gemessen werden. Dabei wurden routinemäßig die Hörschwellen in den BERAs mitbestimmt. Die in dieser Arbeit bestimmten Latenzverlängerungen und Amplitudenminderungen von P1 wie auch die erhöhte Hörschwelle von BACE1$^{-/-}$-Mäusen bei 16 kHz wurden bestätigt und es wurde aufgezeigt, dass die Hörschwellen in einem Frequenzbereich von 4 bis 32 kHz durchgehend um etwa 15–35 dB signifikant erhöht sind (Dierich et al. 2019). Die DPOAE zeigten sich in BACE1$^{-/-}$-Mäusen bei 13,3 und 16 kHz

deutlich reduziert, was wiederum auf eine Dysfunktion der äußeren Haarzellen hindeutet und ebenfalls einen möglichen Erklärungsansatz für die erhöhten Hörschwellen darstellt. Untersuchungen der aktinhaltigen Stereozilien der IHC und OHC mittels Phalloidin-Färbung ergaben keine Hinweise auf bestehende Haarzelldegenerationen oder eine veränderte Haarbündelmorphologie in BACE1$^{-/-}$-Mäusen (Dierich et al. 2019). Auch das für die Elektromotilität der OHC essenzielle Protein Prestin erschien in den Kryoschnitten der BACE1$^{-/-}$-Cortiorgane unauffällig (Dierich et al. 2019). Die Anzahl und das Expressionsmuster der KCNQ4-Kanäle, die für die Leitfähigkeit an der basolateralen Membran der OHC relevant sind (Kubisch et al. 1999, Kharkovets et al. 2000, 2006), unterschieden sich in den immunhistochemischen Färbungen der OHC der BACE1$^{-/-}$-Cortiorgane nicht von denen der Wildtyptiere (Dierich et al. 2019). Die an den OHC von BACE1-Knockouttieren gemessenen KCNQ4-vermittelten (Kalium-)Ströme wiesen keine Auffälligkeiten auf. Die Ursache der auffälligen DPOAEs konnte mit diesen Untersuchungen nicht identifiziert werden (Dierich et al. 2019). Nach dem Ausschluss einer auffälligen OHC-Morphologie ist eine verstärkte efferente Hemmung der OHC zu diskutieren (Dierich et al. 2019), die über olivocochleäre Efferenzen stattfindet (Tziridis et al. 2017).

Die hochsignifikant verlängerte P1-Latenz, wie sie in dieser Arbeit bei BACE1$^{-/-}$-Mäusen beobachtet wurde (Abb. 5.2 C und D), deutet auf eine gestörte Signalverarbeitung zwischen inneren Haarzellen (IHC) und den Afferenzen des *Ggl. spirale* hin. Strukturelle Pathologien der IHC oder OHC sowie durch KCNQ4 vermittelte, veränderte Kaliumströme in den Haarzellen konnten als Ursache ausgeschlossen werden (Dierich et al. 2019). Die KCNQ4-Expression wie auch die -Distribution waren in den äußeren Haarzellen unauffällig und die Synapsenzahl der Afferenzen an den inneren Haarzellen zeigte sich im Vergleich zu den Wildtypen nicht unterschiedlich. Hingegen präsentierten sich in den BACE1-knockouts immunhistochemisch prolongierte postsynaptische a- und hypomyelinisierte Kompartimente der SGNs im Bereich der ossären Spirallamina, bei gleichzeitig bestehender Desorganisation und aufgetriebenen Nervenendigungen (Dierich et al. 2019). Bei nachgewiesener NRG1-Expression in den spiralganglionären Neuronen (SGN) (Morley 1998, Hansen et al. 2001, Stankovic et al. 2004) wiesen NRG1-β-heterozygote Tiere immunhistochemisch die gleichen Phänomene auf (Dierich et al. 2019). Im Vergleich zu BACE1$^{-/-}$-Mäusen zeigte sich jedoch optisch eine geringe Ausprägung der Hypomyelinisierung und der Länge der davon betroffenen Abschnitte. Mutmaßlich zurückzuführen ist diese in NRG1-heterozygoten Tieren gemachte Beobachtung auf höhere durch BACE1 aktivierte NRG1-Konzentrationen (Dierich et al. 2019). Aufgrund pränataler Letalität sind Untersuchungen an NRG1-homozygoten Mäusen

nicht beschrieben (Li 2003). NRG1-überexprimierende Tiere weisen eine verminderte Expression des postsynaptischen Markerproteins PSD95 (postynaptic densitiy protein 95) auf (Jin et al. 2011), wohingegen in BACE1$^{-/-}$-Mäusen eine ausgeprägte Überexpression von PSD95 an den afferenten Synapsen der IHC nachgewiesen werden konnte (Dierich et al. 2019). Aufgrund von immunhistochemischen Ähnlichkeiten der postsynaptischen SGN-Kompartimente des Innenohrs zwischen BACE1$^{-/-}$- und NRG1$^{+/-}$-Mäusen ist ebenfalls eine PSD95-Überexpression in NRG1$^{+/-}$-Tieren zu vermuten (Dierich et al. 2019). In Untersuchungen am Mausmodell konnte ein NRG1-vermittelter schwannzellabhängiger Abbau neuromuskulärer Synapsen beobachtet werden, wobei ein Überschuss von prozessiertem NRG1 zu einer Hyperfragmentierung postsynaptischer Endigungen der neuromuskulären Endplatten führt (Lee et al. 2016). Es ist anzunehmen, dass ein vergleichbarer Abbau von Synapsen im Innenohr der BACE1$^{-/-}$-Mäuse ausbleibt und so zu verbreiterten postsynaptischen Endigungen an den IHC führt (Dierich et al. 2019).

Die verlängerte P1-Latenz in der BACE1$^{-/-}$-Population scheint somit die gestörte Architektur der afferenten Synapsen der SGN und eine anzunehmende reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) des *N. cochlearis* widerzuspiegeln. Grundlage der Annahme von reduzierten NLGs ist der Nachweis einer BACE1-abhängigen Myelinisierung peripherer Nerven (Taveggia et al. 2005, Hu et al. 2006) und einer essenziellen Rolle der β-Sekretase 1 auf die frühzeitige Myelinisierung der Typ-I-Afferenzen im Innenohr (Dierich et al. 2019). Diese findet auf Höhe der ossären Spirallaminafasern in Wildtypmäusen innerhalb der ersten vierzehn Tage postpartum statt (Dierich et al. 2019). In BACE1$^{-/-}$-Mäusen beginnt sie hingegen circa zehn Tage verzögert, führt innerhalb weniger Tage zu dauerhaften Desorganisationen der afferenten Verbindungen und ist in adulten Tieren noch immer unvollständig (Dierich et al. 2019).

Über zentrale Myelinisierungsprozesse in BACE1-defizienten Mäusen herrscht aktuell Uneinigkeit: Oligodendrozyten scheinen die Myelinscheiden nicht über den peripher vorhandenen NRG1- und ErbB-Pathway zu generieren (Brinkmann et al. 2008). Zudem konnten keine Unterschiede der axonalen Ultrastrukturen wie auch Myelinisierungen in den *Corpora callosa* von BACE1$^{-/-}$-defizienten und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Treiber et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe konnte hingegen eine verminderte Expression von myelin basic protein (MBP) und proteolipoprotein (PLP) in Hippocampus- und Cortexhomogenaten sowie reduzierte Level von myelin/oligodendrozytenspezifischem Glykoprotein nachweisen (Hu et al. 2006), was wiederrum einen Hinweis auf zentralnervöse Myelinisierungsstörungen darstellen würde. Anhand der audiometrischen Daten der BACE1-defizienten Mäuse wird ersichtlich,

dass sich bei Betrachtung überschwelliger Spuren (80 dB) im Vergleich zu Wildtyptieren deutliche Unterschiede der Interlatenz zwischen P1 und P5 ergaben (Abb. 5.3 A), was folglich auf eine beeinträchtigte Signalverarbeitung entlang der zentralnervösen Abschnitte der Hörbahn hindeutet. Dahingegen existieren schwellennah (Abb. 5.3 B) keine signifikanten Unterschiede der Interlatenzen, was gegen eine beeinträchtigte Signalweiterleitung proximal des *Ggl. spirale* spricht. An dieser Stelle kritisch zu betrachten sind die in dieser Arbeit zueinander relativierten Schalldruckpegel bei jeweils individuellen Hörschwellen. In Anbetracht der Interlatenzen unserer elektrophysiologischen Messungen ist eine reduzierte zentrale Nervenleitgeschwindigkeit denkbar.

Zusammengefasst ist für die in dieser Arbeit beschriebene Hörminderung und die elektrophysiologischen Auffälligkeiten der BERA-Messungen an BACE1$^{-/-}$-Mäusen eine periphere, entwicklungsbedingte Schallempfindungsstörung ursächlich. Aufgrund des Mangels an BACE1 kommt es insbesondere in den SGN zu einer reduzierten Verfügbarkeit des prozessierten NRG1, die mit Hypomyelinisierungen der SGN (Dierich et al. 2019) (vermutlich des gesamten *N. cochlearis*) und infolgedessen mit konsekutiven Signalweiterleitungsstörungen einhergeht. Darüber hinaus ist die BACE1 über die NRG1-ErbB-vermittelten Signalwege für die Formierung intakter Myelinscheiden nach Schädigung peripherer Nerven relevant (Fricker et al. 2011, Stassart et al. 2013, Yan 2017), sodass gleichwohl eine homöostatische Funktion der Protease im Innenohr denkbar ist.

6.2 Die sechswöchige BACE1/BACE2-Inhibition hat keinen Effekt auf die Elektrophysiologie des auditorischen Systems von C57BL/6-Mäusen.

Die Entwicklung nervaler Strukturen des auditorischen Systems von Mäusen ist maßgeblich auf die Anwesenheit der β-Sekretase1 (BACE1) während der frühen Postnatalphase angewiesen. Ist während dieser Zeit kein funktionsfähiges Enzym vorhanden, führt dies zu einer Hypomyelinisierung der afferenten Typ-I-Fasern des *N. cochlearis* im Innenohr und zu verlängerten, desorganisierten und verdickten Nervenfasern (Dierich et al. 2019). Vor diesem Hintergrund eröffnete sich die Frage nach negativen Auswirkungen einer BACE1/BACE2-Inhibition im adulten Organismus.

Wir behandelten vier Wochen alte C57BL/6N-Mäuse für sechs Wochen mit dem Blut-Hirn-Schranken-gängigen BACE1/BACE2-Inhibitor NB-360, der im Mausmodell die Amyloid(A)β1-40- sowie die Aβ1-42-Level deutlich reduzierte (Neumann et al. 2015, Keskin et al.

2017), die neuronale Hyperaktivität senkte und in Verhaltensversuchen (Wasserlabyrinth) die Gedächtnisleistung steigerte (Keskin et al. 2017). Die Auswertungen der BERA-Messungen zeigten, dass eine Behandlung mit NB-360 im genannten Zeitraum keine Auswirkungen auf das Hörvermögen der Tiere oder die Leitungsfähigkeiten der nervalen Strukturen der Hörbahn hatte (Abb. 5.9–5.12, Tab. 5.1). Die morphologischen Untersuchungen der IHC-Synapsen ergaben nach sekundär-medikamentöser BACE1/BACE2-Ausschaltung mit NB-360 im Gegensatz zu den BACE1-knockout-Mäusen keine Architekturstörungen der terminalen SGN (Dierich et al. 2019). Die Myelinisierung der ossären Spirallaminafasern wies nach stattgehabter BACE1/2-Inhibitorbehandlung immunhistochemisch ebenfalls keine Auffälligkeiten auf.

Somit ist in diesem Zeitraum von keinen (relevanten) demyelinisierenden oder synapsenbeeinflussenden Prozessen über die Hemmung der BACE1-abhängigen NRG1-Prozessierung auszugehen. Jedoch können langfristige Auswirkungen, insbesondere auf das Hörvermögen, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

Achor, L. Joseph; Starr, Arnold (1980): Auditory brain stem responses in the cat. II. Effects of lesions. In: *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology 48* (2), S.174–190. DOI: 10.1016/0013-4694(80)90302-8.

Agsten, Marianne; Hessler, Sabine; Lehnert, Sandra; Volk, Tilmann; Rittger, Andrea; Hartmann, Stephanie; Raab, Christian; Kim, Doo Yeon; Groemer, Teja W.; Schwake, Michael; Alzheimer, Christian; Huth, Tobias (2015): BACE1 modulates gating of KCNQ1 (Kv7.1) and cardiac delayed rectifier KCNQ1/KCNE1 (IKs). In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology 89* (Pt B), S.335–348. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.006.

Alzheimer, Alois (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. In: *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* (64), S. 146–148.

Arispe, N.; Pollard, H. B.; Rojas, E. (1993): Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β- protein [AβP-(1-40)] in bilayer membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90* (22), S.10573–10577. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10573.

Bamberger, Maria E.; Harris, Meera E.; McDonald, Douglas R.; Husemann, Jens; Landreth, Gary E. (2003): A cell surface receptor complex for fibrillar β-amyloid mediates microglial activation. In: *Journal of Neuroscience 23* (7), S.2665–2674. DOI: 10.1523/jneurosci.23-07-02665.2003.

Behl, Tapan; Kaur, Ishnoor; Fratila, Ovidiu; Brata, Roxana; Bungau, Simona (2020): Exploring the potential of therapeutic agents targeted towards mitigating the events associated with amyloid-β cascade in Alzheimer's disease. In: *International Journal of Molecular Sciences 21* (20), S.1–24. DOI: 10.3390/ijms21207443.

Benilova, Iryna; Karran, Eric; De Strooper, Bart (2012): The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. In: *Nature Neuroscience 15* (3), S.349–357. DOI: 10.1038/nn.3028.

Bharadwaj, Hari M.; Masud, Salwa; Mehraei, Golbarg; Verhulst, Sarah; Shinn-Cunningham, Barbara G. (2015): Individual differences reveal correlates of hidden hearing deficits. In: *Journal of Neuroscience 35* (5), S.2161–2172. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3915-14.2015.

Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung (2011): Demenz- Report. Available at https://www.berlin-institut.org/fileadmin/Redaktion/Publikationen/aeltere_Studien/Demenz-Report/Demenz_online.pdf (Accessed 29 January 2021).

Bickel, H. (2005) Epidemiologie und Gesundheitsökonomie. In: Demenzen. *Referenzreihe Neurologie.* Wallesch CW, Förstl H (Hrg.) Thieme Verlag, Stuttgart, S. 1–15.

Braak, Heiko; Thal, Dietmar R.; Ghebremedhin, Estifanos; Del Tredici, Kelly (2011): Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. In: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 70* (11), S.960–969. DOI: 10.1097/NEN.0b013e318232a379.

Breydo, Leonid; Kurouski, Dmitry; Rasool, Suhail; Milton, Saskia; Wu, Jessica W.; Uversky, Vladimir N.; Lednev, Igor K.; Glabe, Charles G. (2016): Structural differences between amyloid beta oligomers. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications 477* (4), S.700–705. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.122.

Brinkmann, Bastian G.; Agarwal, Amit; Sereda, Michael W.; Garratt, Alistair N.; Müller, Thomas; Wende, Hagen; Stassart, Ruth M.; Nawaz, Schanila; Humml, Christian; Velanac, Viktorija; Radyushkin, Konstantin; Goebbels, Sandra; Fischer, Tobias M.; Franklin, Robin J.; Lai, Cary; Ehrenreich, Hannelore; Birchmeier, Carmen; Schwab, Markus H.; Nave, Klaus Armin (2008): Neuregulin-1/ErbB Signaling Serves Distinct Functions in Myelination of the Peripheral and Central Nervous System. In: *Neuron 59* (4), S.581–595. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.06.028.

Cecchi, Cristina; Stefani, Massimo (2013): The amyloid-cell membrane system. The interplay between the biophysical features of oligomers/fibrils and cell membrane defines amyloid toxicity. In: *Biophysical Chemistry 182* S.30–43. DOI: 10.1016/j.bpc.2013.06.003.

Cheret, Cyril; Willem, Michael; Fricker, Florence R.; Wende, Hagen; Wulf-Goldenberg, Annika; Tahirovic, Sabina; Nave, Klaus-Armin; Saftig, Paul; Haass, Christian; Garratt, Alistair N.; Bennett, David L.; Birchmeier, Carmen (2013): Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. In: *The EMBO Journal 32* (14), S.2015–2028. DOI: 10.1038/emboj.2013.146.

Cole, Sarah L.; Vassar, Robert (2008): The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. In: *The Journal of Biological Chemistry 283* (44), S.29621–29625. DOI: 10.1074/jbc.R800015200.

Demuro, Angelo; Smith, Martin; Parker, Ian (2011): Single-channel Ca2+ imaging implicates Aβ 1-42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. In: *Journal of Cell Biology 195* (3), S.515–524. DOI: 10.1083/jcb.201104133.

Dierich, Marlen; Hartmann, Stephanie; Dietrich, Nadine; Moeser, Philip; Brede, Franziska; Johnson Chacko, Lejo; Tziridis, Konstantin; Schilling, Achim; Krauss, Patrick; Hessler, Sabine; Karch, Sandra; Schrott-Fischer, Anneliese; Blumer, Michael; Birchmeier, Carmen; Oliver, Dominik; Moser, Tobias; Schulze, Holger; Alzheimer, Christian; Leitner, Michael G.; Huth, Tobias (2019): β-Secretase BACE1 Is Required for Normal Cochlear Function. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 39* (45), S.9013–9027. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0028-19.2019.

Dilling, H., Mombour, W., Schmidt, M. H., (Hrg.) (2015) Internationale Klassifikation psychischer Störungen, 10. Aufl., ICD-10 Kapitel V (F) Klinisch-diagnostische Leitlinien. Hogrefe, Bern.

Dominguez, Diana; Tournoy, Jos; Hartmann, Dieter; Huth, Tobias; Cryns, Kim; Deforce, Siska; Serneels, Lutgarde; Camacho, Ira Espuny; Marjaux, Els; Craessaerts, Katleen; Roebroek, Anton J. M.; Schwake, Michael; D'Hooge, Rudi; Bach, Patricia; Kalinke, Ulrich; Moechars, Dieder; Alzheimer, Christian; Reiss, Karina; Saftig, Paul; De Strooper, Bart (2005): Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. In: *Journal of Biological Chemistry 280* (35), S.30797–30806. DOI: 10.1074/jbc.M505249200.

Drolle, Elizabeth; Gaikwad, Ravi M.; Leonenko, Zoya (2012): Nanoscale electrostatic domains in cholesterol-laden lipid membranes create a target for amyloid binding. In: *Biophysical Journal 103* (4), S.27–29. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.06.053.

Fricker, Florence R.; Antunes-Martins, Ana; Galino, Jorge; Paramsothy, Remi; La Russa, Federica; Perkins, James; Goldberg, Rebecca; Brelstaff, Jack; Zhu, Ning; McMahon, Stephen B.; Orengo, Christine; Garratt, Alistair N.; Birchmeier, Carmen; Bennett, David L. H. (2013): Axonal neuregulin 1 is a rate limiting but not essential factor for nerve remyelination. In: *Brain: A Journal*

of Neurology 136 (Pt 7), S.2279–2297. DOI: 10.1093/brain/awt148.

Fricker, Florence R.; Lago, Natalia; Balarajah, Sharmili; Tsantoulas, Christoforos; Tanna, Shamil; Zhu, Ning; Fageiry, Samaher K.; Jenkins, Mark; Garratt, Alistair N.; Birchmeier, Carmen; Bennett, David L. H. (2011): Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood. In: *Journal of Neuroscience 31* (9), S.3225–3233. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2568-10.2011.

Fritze, Thomas; Teipel, Stefan; Óvári, Attila; Kilimann, Ingo; Witt, Gabriele; Doblhammer, Gabriele (2016): Hearing Impairment Affects Dementia Incidence. An Analysis Based on Longitudinal Health Claims Data in Germany. In: *PloS One 11* (7), S.e0156876. DOI: 10.1371/journal.pone.0156876.

Furman, Adam C.; Kujawa, Sharon G.; Charles Liberman, M. (2013): Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. In: *Journal of Neurophysiology 110* (3), S.577–586. DOI: 10.1152/jn.00164.2013.

Gao, Hui-Ming; Hong, Jau-Shyong (2008): Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. In: *Trends in Immunology 29* (8), S.357–365. DOI: 10.1016/j.it.2008.05.002.

Garratt, Alistair N.; Britsch, Stefan; Birchmeier, Carmen (2000): Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. In: *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology 22* (11), S.987–996. DOI: 10.1002/1521-1878(200011)22:11<987::AID-BIES5>3.0.CO;2-5.

Godyń, Justyna; Jończyk, Jakub; Panek, Dawid; Malawska, Barbara (2016): Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. In: *Pharmacological Reports: PR 68* (1), S.127–138. DOI: 10.1016/j.pharep.2015.07.006.

Goedert, Michel; Klug, Aaron; Crowther, R. Anthony (2006): Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's Disease 9* (SUPPL. 3), S.195–207. DOI: 10.3233/jad-2006-9s323.

Gordon-Salant, Sandra (2005): Hearing loss and aging: New research findings and clinical implications. In: *Journal of Rehabilitation Research and Development 42* (4 SUPPL. 2), S.9–24. DOI: 10.1682/JRRD.2005.01.0006.

Gray, E. G.; Paula-Barbosa, M.; Roher, A. (1987): Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology 13* (2), S.91–110. DOI: 10.1111/j.1365-2990.1987.tb00174.x.

Guerit, J. M. (1985): Applications of surface-recorded auditory evoked potentials for the early diagnosis of hearing loss in neonates and premature infants. In: *Acta Oto-Laryngologica 99* (S421), S.68–76. DOI: 10.3109/00016488509121759.

Haass, Christian; Selkoe, Dennis J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology 8* (2), S.101–112. DOI: 10.1038/nrm2101.

Hampel, Harald; Vassar, Robert; De Strooper, Bart; Hardy, John; Willem, Michael; Singh, Neeraj; Zhou, John; Yan, Riqiang; Vanmechelen, Eugeen; De Vos, Ann; Nisticò, Robert; Corbo, Massimo; Imbimbo, Bruno Pietro; Streffer, Johannes; Voytyuk, Iryna; Timmers, Maarten; Tahami

Monfared, Amir Abbas; Irizarry, Michael; Albala, Bruce; Vergallo, Andrea (2020): The β-Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. In: *Biological Psychiatry 11* S.1–12. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.02.001.

Hansen, Marlan R.; Vijapurkar, Ulka; Koland, John G.; Green, Steven H. (2001): Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. In: *Hearing Research 161* (1–2), S.87–98. DOI: 10.1016/s0378-5955(01)00360-4.

Hardy, John; Selkoe, Dennis J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. In: *Science (New York, N.Y.) 297* (5580), S.353–356. DOI: 10.1126/science.1072994.

Henry K.R. (1979): Auditory brainstem volume-conducted responses: origins in the laboratory mouse. In: *Journal of the American Auditory Society* 4 (5), S.173-8. PMID: 511644.

Hessler, Sabine; Zheng, Fang; Hartmann, Stephanie; Rittger, Andrea; Lehnert, Sandra; Völkel, Meike; Nissen, Matthias; Edelmann, Elke; Saftig, Paul; Schwake, Michael; Huth, Tobias; Alzheimer, Christian (2015): β-Secretase BACE1 regulates hippocampal and reconstituted M-currents in a β-subunit-like fashion. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 35* (8), S.3298–3311. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3127-14.2015.

Holt, Jeffrey R.; Stauffer, Eric A.; Abraham, David; Géléoc, Gwenaëlle S. G. (2007): Dominant-negative inhibition of M-like potassium conductances in hair cells of the mouse inner ear. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 27* (33), S.8940–8951. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2085-07.2007.

Howard, Robert; Liu, Kathy Y. (2020): Questions EMERGE as Biogen claims aducanumab turnaround. In: *Nature Reviews Neurology 16* (2), S.63–64. DOI: 10.1038/s41582-019-0295-9.

Hu, Xiangyou; Fan, Qingyuan; Hou, Hailong; Yan, Riqiang (2016): Neurological dysfunctions associated with altered BACE1-dependent Neuregulin-1 signaling. In: *Journal of Neurochemistry 136* (2), S.234–249. DOI: 10.1111/jnc.13395.

Hu, Xiangyou; Hicks, Caitlin W.; He, Wanxia; Wong, Philip; Macklin, Wendy B.; Trapp, Bruce D.; Yan, Riqiang (2006): Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. In: *Nature Neuroscience 9* (12), S.1520–1525. DOI: 10.1038/nn1797.

Hunter, Kelly Paris; Willott, James F. (1987): Aging and the auditory brainstem response in mice with severe or minimal presbycusis. In: *Hearing Research 30* (2–3), S.207–218. DOI: 10.1016/0378-5955(87)90137-7.

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen IQWiG (2007). Cholinesterasehemmer bei Alzheimer Demenz, Abschlussbericht A05-19A, Version 1.0. Available at https://www.iqwig.de/download/a05-19a_abschlussbericht_cholinesterasehemmer_bei_alzheimer_demenz.pdf (Accessed 29 January 2021). Köln (Hrg.).

Jensen, Jane Bjerg; Lysaght, Andrew C.; Liberman, M. Charles; Qvortrup, Klaus; Stankovic, Konstantina M. (2015): Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure in pubescent mice. In: *PloS One 10* (5), S.e0125160. DOI: 10.1371/journal.pone.0125160.

Jin, David; Ohlemiller, Kevin K.; Lei, Debin; Dong, Elizabeth; Role, Lorna; Ryugo, David K.; Bao, Jianxin (2011): Age-related neuronal loss in the cochlea is not delayed by synaptic modulation. In: *Neurobiology of Aging 32* (12), S.2321.e13-23. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.011.

Jonsson, Thorlakur; Atwal, Jasvinder K.; Steinberg, Stacy; Snaedal, Jon; Jonsson, Palmi V.; Bjornsson, Sigurbjorn; Stefansson, Hreinn; Sulem, Patrick; Gudbjartsson, Daniel; Maloney, Janice; Hoyte, Kwame; Gustafson, Amy; Liu, Yichin; Lu, Yanmei; Bhangale, Tushar; Graham, Robert R.; Huttenlocher, Johanna; Bjornsdottir, Gyda; Andreassen, Ole A.; Stefansson, Kari (2012): A mutation in APP protects against Alzheimer‘s disease and age-related cognitive decline. In: *Nature 488* (7409), S.96. DOI: 10.1038/nature11283.

Kane, Kelly L.; Longo-Guess, Chantal M.; Gagnon, Leona H.; Ding, Dalian; Salvi, Richard J.; Johnson, Kenneth R. (2012): Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice. In: *Hearing Research 283* (1–2), S.80–88. DOI: 10.1016/j.heares.2011.11.007.

Keskin, Aylin D.; Kekuš, Maja; Adelsberger, Helmuth; Neumann, Ulf; Shimshek, Derya R.; Song, Beomjong; Zott, Benedikt; Peng, Tingying; Förstl, Hans; Staufenbiel, Matthias; Nelken, Israel; Sakmann, Bert; Konnerth, Arthur; Busche, Marc Aurel (2017): BACE inhibition-dependent repair of Alzheimer’s pathophysiology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114* (32), S.8631–8636. DOI: 10.1073/pnas.1708106114.

Kharkovets, Tatjana; Dedek, Karin; Maier, Hannes; Schweizer, Michaela; Khimich, Darina; Nouvian, Régis; Vardanyan, Vitya; Leuwer, Rudolf; Moser, Tobias; Jentsch, Thomas J. (2006): Mice with altered KCNQ4 K+ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. In: *The EMBO Journal 25* (3), S.642–652. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600951.

Kharkovets, Tatjana; Hardelin, Jean Pierre; Safieddine, Saaid; Schweizer, Michaela; El-Amraoui, Aziz; Petit, Christine; Jentsch, Thomas J. (2000): KCNQ4, a K+ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97* (8), S.4333–4338. DOI: 10.1073/pnas.97.8.4333.

Kobel, Megan; Le Prell, Colleen G.; Liu, Jennifer; Hawks, John W.; Bao, Jianxin (2017): Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. In: *Hearing Research 349* S.148–154. DOI: 10.1016/j.heares.2016.12.008.

Kubisch, Christian; Schroeder, Björn C.; Friedrich, Thomas; Lütjohann, Björn; El-Amraoui, Aziz; Marlin, Sandrine; Petit, Christine; Jentsch, Thomas J. (1999): KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. In: *Cell 96* (3), S.437–446. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80556-5.

Kujawa, Sharon G.; Liberman, M. Charles (2006): Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: Evidence of a misspent youth. In: *Journal of Neuroscience 26* (7), S.2115–2123. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4985-05.2006.

Kujawa, Sharon G.; Liberman, M. Charles (2009): Adding insult to injury: Cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. In: *Journal of Neuroscience 29* (45), S.14077–14085. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.

Land, Rüdiger; Burghard, Alice; Kral, Andrej (2016): The contribution of inferior colliculus activity to the auditory brainstem response (ABR) in mice. In: *Hearing Research 341* S.109–118. DOI: 10.1016/j.heares.2016.08.008.

Lee, Young Il; Li, Yue; Mikesh, Michelle; Smith, Ian; Nave, Klaus-Armin; Schwab, Markus H.; Thompson, Wesley J. (2016): Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann

cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113* (4), S.E479-87. DOI: 10.1073/pnas.1519156113.

Lemke, Greg (2006): Neuregulin-1 and myelination. In: *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment 2006* (325), S.pe11. DOI: 10.1126/stke.3252006pe11.

Li, Li (2003) *Isoform-specific knockout of the Neuregulin-1 gene*. Inaugural- Dissertation. Universität zu Köln. Available at https://kups.ub.uni-koeln.de/720/1/11w1447.pdf (Accessed 29 January 2021).

Liberman, Leslie D.; Suzuki, Jun; Liberman, M. Charles (2015): Dynamics of cochlear synaptopathy after acoustic overexposure. In: *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO 16* (2), S.205–219. DOI: 10.1007/s10162-015-0510-3.

Liberman, M. Charles (2017): Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. In: *F1000Research 6* (0), S.927. DOI: 10.12688/f1000research.11310.1.

Liberman, M. Charles; Dodds, Leslie W.; Pierce S. (1990): Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. In: *The Journal of comparative neurology* 301 (3), S.443-60. Erratum In: *The Journal of comparative neurology* (1991) 304 (2), S.341.DOI: 10.1002/cne.903010309.

Liberman, M. Charles; Kujawa, Sharon G. (2017): Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. In: *Hearing Research 349* S.138–147. DOI: 10.1016/j.heares.2017.01.003.

Liberman, M C (1980): Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. In: *Hearing Research 3* (1), S.45–63. DOI: 10.1016/0378-5955(80)90007-6.

Lin, Frank R.; Yaffe, Kristine; Xia, Jin; Xue, Qian-li; Harris, Tamara B.; Purchase-Helzner, Elizabeth; Satterfield, Suzanne; Ayonayon, Hilsa N.; Ferrucci, Luigi; Simonsick, Eleanor M.; Health ABC Study Group (2013): Hearing loss and cognitive decline in older adults. In: *JAMA Internal Medicine 173* (4), S.293–299. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.1868.

Liu, Lijie; Wang, Hui; Shi, Lijuan; Almuklass, Awad; He, Tingting; Aiken, Steve; Bance, Manohar; Yin, Shankai; Wang, Jian (2012): Silent Damage of Noise on Cochlear Afferent Innervation in Guinea Pigs and the Impact on Temporal Processing. In: *PLoS ONE 7* (11), S.1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0049550.

Liu, Zewen; Zhou, Tingyang; Ziegler, Alexander C.; Dimitrion, Peter; Zuo, Li (2017): Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017* (Figure 1). DOI: 10.1155/2017/2525967.

Lobarinas, Edward; Spankovich, Christopher; Le Prell, Colleen G. (2017): Evidence of "hidden hearing loss" following noise exposures that produce robust TTS and ABR wave-I amplitude reductions. In: *Hearing Research 349* S.155–163. DOI: 10.1016/j.heares.2016.12.009.

Lombardo, Sylvia; Maskos, Uwe (2015): Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. In: *Neuropharmacology 96* (Pt B), S.255–262. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.018.

Long, Patrick; Wan, Guoqiang; Roberts, Michael T.; Corfas, Gabriel (2018): Myelin development,

plasticity, and pathology in the auditory system. In: *Developmental Neurobiology 78* (2), S.80–92. DOI: 10.1002/dneu.22538.

Maljevic, Snezana; Wuttke, Thomas V.; Seebohm, Guiscard; Lerche, Holger (2010): KV7 channelopathies. In: *Pflugers Archiv European Journal of Physiology 460* (2), S.277–288. DOI: 10.1007/s00424-010-0831-3.

Mammano, F.; Ashmore, J. F. (1996): Differential expression of outer hair cell potassium currents in the isolated cochlea of the guinea-pig. In: *The Journal of Physiology 496 (Pt 3* (3), S.639–646. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021715.

Marcotti, Walter; Kros, Corné J. (1999): Developmental expression of the potassium current I(K,n) contributes to maturation of mouse outer hair cells. In: *Journal of Physiology 520* (3), S.653–660. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.00653.x.

Matsuzaki, Katsumi (2014): How do membranes initiate alzheimers disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β-protein on ganglioside clusters. In: *Accounts of Chemical Research 47* (8), S.2397–2404. DOI: 10.1021/ar500127z.

Mattson, Mark P.; Chan, Sic L. (2003): Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. In: *Cell Calcium 34* (4–5), S.385–397. DOI: 10.1016/s0143-4160(03)00128-3.

Melcher, Jennifer R.; Guinan, John J.; Knudson, Inge M.; Kiang, Nelson Y. S. (1996): Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. II. Correlating lesion sites with waveform changes. In: *Hearing Research 93* (1–2), S.28–51. DOI: 10.1016/0378-5955(95)00179-4.

Melcher, Jennifer R.; Kiang, Nelson Y. S. (1996): Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. III: Identified cell populations. In: *Hearing Research 93* (1–2), S.52–71. DOI: 10.1016/0378-5955(95)00200-6.

Meyer, Alexander C.; Frank, Thomas; Khimich, Darina; Hoch, Gerhard; Riedel, Dietmar; Chapochnikov, Nikolai M.; Yarin, Yury M.; Harke, Benjamin; Hell, Stefan W.; Egner, Alexander; Moser, Tobias (2009): Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. In: *Nature Neuroscience 12* (4), S.444–453. DOI: 10.1038/nn.2293.

Michailov, Galin V.; Sereda, Michael W.; Brinkmann, Bastian G.; Fischer, Tobias H.; Haug, Bernhard; Birchmeier, Carmen; Role, Lorna; Lai, Cary; Schwab, Markus H.; Nave, Klaus Armin (2004): Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness. In: *Science 304* (5671), S.700–703. DOI: 10.1126/science.1095862.

Morley, Barbara J. (1998): ARIA is heavily expressed in rat peripheral auditory and vestibular ganglia. In: *Molecular Brain Research 54* (1), S.170–174. DOI: 10.1016/S0169-328X(97)00355-0.

Moser, Tobias; Starr, Arnold (2016): Auditory neuropathy-neural and synaptic mechanisms. In: *Nature Reviews Neurology 12* (3), S.135–149. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.10.

Müller, Marcus; Von Hünerbein, Karen; Hoidis, Silvi; Smolders, Jean W. T. (2005): A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. In: *Hearing Research 202* (1–2), S.63–73. DOI: 10.1016/j.heares.2004.08.011.

Müller, Ulrike C.; Zheng, Hui (2012): Physiological functions of APP family proteins. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2* (2), S.a006288. DOI: 10.1101/cshperspect.a006288.

Nave, Klaus Armin; Salzer, James L. (2006): Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. In:

Current Opinion in Neurobiology 16 (5), S.492–500. DOI: 10.1016/j.conb.2006.08.008.

Neumann, Ulf; Rueeger, Heinrich; MacHauer, Rainer; Veenstra, Siem Jacob; Lueoend, Rainer M.; Tintelnot-Blomley, Marina; Laue, Grit; Beltz, Karen; Vogg, Barbara; Schmid, Peter; Frieauff, Wilfried; Shimshek, Derya R.; Staufenbiel, Matthias; Jacobson, Laura H. (2015): A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid-β and neuroinflammation in APP transgenic mice. In: *Molecular Neurodegeneration 10* (1), S.1–15. DOI: 10.1186/s13024-015-0033-8.

Offner, Franklin F.; Dallos, Peter; Cheatham, Mary Ann (1987): Positive endocochlear potential: Mechanism of production by marginal cells of stria vascularis. In: *Hearing Research 29* (2–3), S.117–124. DOI: 10.1016/0378-5955(87)90160-2.

Oliver, Dominik; Knipper, Marlies; Derst, Christian; Fakler, Bernd (2003): Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. In: *Journal of Neuroscience 23* (6), S.2141–2149. DOI: 10.1523/jneurosci.23-06-02141.2003.

Olsson, Tomas T.; Klementieva, Oxana; Gouras, Gunnar K. (2018): Prion-like seeding and nucleation of intracellular amyloid-β. In: *Neurobiology of Disease 113* (December 2017), S.1–10. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.01.015.

Panza, Francesco; Lozupone, Madia; Dibello, Vittorio; Greco, Antonio; Daniele, Antonio; Seripa, Davide; Logroscino, Giancarlo; Imbimbo, Bruno P. (2019): Are antibodies directed against amyloid-β (Aβ) oligomers the last call for the Aβ hypothesis of Alzheimer's disease? In: *Immunotherapy 11* (1), S.3–6. DOI: 10.2217/imt-2018-0119.

Plack, Christopher J.; Léger, Agnès; Prendergast, Garreth; Kluk, Karolina; Guest, Hannah; Munro, Kevin J. (2016): Toward a Diagnostic Test for Hidden Hearing Loss. In: *Trends in Hearing 20* S.1–9. DOI: 10.1177/2331216516657466.

Ponton, Curtis W.; Moore, J. K.; Eggermont, Jos J. (1996): Auditory brain stem response generation by parallel pathways: differential maturation of axonal conduction time and synaptic transmission. In: *Ear and Hearing 17* (5), S.402–410. DOI: 10.1097/00003446-199610000-00006.

Querfurth, Henry W.; LaFerla, Frank M. (2010): Alzheimer's disease. In: *The New England Journal of Medicine 362* (4), S.329–344. DOI: 10.1056/NEJMra0909142.

Reisberg, Barry; Doody, Rachelle; Stöffler, Albrecht; Schmitt, Frederick; Ferris, Steven; Möbius, Hans Jörg (2003): Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. In: New England Journal of Medicine 348 (14), S.1333–1341. DOI: 10.1056/NEJMoa013128.

Robertson, Donald (1983): Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. In: *Hearing Research 9* (3), S.263–278. DOI: 10.1016/0378-5955(83)90031-X.

Roeters, Steven J.; Iyer, Aditya; Pletikapić, Galja; Kogan, Vladimir; Subramaniam, Vinod; Woutersen, Sander (2017): Evidence for Intramolecular Antiparallel Beta-Sheet Structure in Alpha-Synuclein Fibrils from a Combination of Two-Dimensional Infrared Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. In: *Scientific Reports 7* (October 2016), S.41051. DOI: 10.1038/srep41051.

Rombouts, Frederik; Kusakabe, Ken-ichi; Hsiao, Chien-Chi; Gijsen, Harrie J. M. (2021): Small-molecule BACE1 inhibitors: a patent literature review (2011 to 2020). In: *Expert Opinion on Therapeutic Patents 31* (1), S.25–52. DOI: 10.1080/13543776.2021.1832463.

Rulifson, Ingrid C.; Cao, Ping; Miao, Li; Kopecky, David; Huang, Linda; White, Ryan D.; Samayoa, Kim; Gardner, Jonitha; Wu, Xiaosu; Chen, Kui; Tsuruda, Trace; Homann, Oliver; Baribault, Helene; Yamane, Harvey; Carlson, Tim; Wiltzius, Jed; Li, Yang (2016): Identification of Human Islet Amyloid Polypeptide as a BACE2 Substrate. In: *PLoS ONE 11* (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0147254.

Ryugo, D. K.; Willard, F. H.; Fekete, D. M. (1981): Differential afferent projections to the inferior colliculus from the cochlear nucleus in the albino mouse. In: *Brain Research 210* (1–2), S.342–349. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90907-0.

Savonenko, A. V.; Melnikova, T.; Laird, F. M.; Stewart, K. A.; Price, D. L.; Wong, P. C. (2008): Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105* (14), S.5585–5590. DOI: 10.1073/pnas.0710373105.

Sergeyenko, Yevgeniya; Lall, Kumud; Charles Liberman, M.; Kujawa, Sharon G. (2013): Age-related cochlear synaptopathy: An early-onset contributor to auditory functional decline. In: *Journal of Neuroscience 33* (34), S.13686–13694. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1783-13.2013.

Shi, Lijuan; Chang, Yin; Li, Xiaowei; Aiken, Steven J.; Liu, Lijie; Wang, Jian (2016a): Coding Deficits in Noise-Induced Hidden Hearing Loss May Stem from Incomplete Repair of Ribbon Synapses in the Cochlea. In: *Frontiers in Neuroscience 10* (MAY), S.231. DOI: 10.3389/fnins.2016.00231.

Shi, Lijuan; Chang, Ying; Li, Xiaowei; Aiken, Steve; Liu, Lijie; Wang, Jian (2016b): Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. In: *Neural Plasticity 2016* S.6143164. DOI: 10.1155/2016/6143164.

Shi, Lijuan; Liu, Lijie; He, Tingting; Guo, Xiaojing; Yu, Zhiping; Yin, Shankai; Wang, Jian (2013): Ribbon synapse plasticity in the cochleae of guinea pigs after noise-induced silent damage. In: *PLoS ONE 8* (12). DOI: 10.1371/journal.pone.0081566.

Shi, Lin; Liu, Ke; Wang, Haolin; Zhang, Yue; Hong, Zhijun; Wang, Mingyu; Wang, Xiaoyu; Jiang, Xuejun; Yang, Shiming (2015): Noise induced reversible changes of cochlear ribbon synapses contribute to temporary hearing loss in mice. In: *Acta Oto-Laryngologica 135* (11), S.1093–1102. DOI: 10.3109/00016489.2015.1061699.

Shimshek, Derya R.; Jacobson, Laura H.; Kolly, Carine; Zamurovic, Natasa; Balavenkatraman, Kamal Kumar; Morawiec, Laurent; Kreutzer, Robert; Schelle, Juliane; Jucker, Mathias; Bertschi, Barbara; Theil, Diethilde; Heier, Annabelle; Bigot, Karine; Beltz, Karen; Machauer, Rainer; Brzak, Irena; Perrot, Ludovic; Neumann, Ulf (2016): Pharmacological BACE1 and BACE2 inhibition induces hair depigmentation by inhibiting PMEL17 processing in mice. In: *Scientific Reports 6* (October 2015), S.21917. DOI: 10.1038/srep21917.

Solleiro-Villavicencio, Helena; Rivas-Arancibia, Selva (2018): Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience 12* (April), S.114. DOI: 10.3389/fncel.2018.00114.

Song, Qiang; Shen, Pei; Li, Xiaowei; Shi, Lijuan; Liu, Lijie; Wang, Jiping; Yu, Zhiping; Stephen, Kegan; Aiken, Steve; Yin, Shankai; Wang, Jian (2016): Coding deficits in hidden hearing loss induced by noise: The nature and impacts. In: *Scientific Reports 6* (April), S.1–13. DOI: 10.1038/srep25200.

Spoendlin, H. (1971): Primary structural changes in the organ of corti after acoustic overstimulation. In: *Acta Oto-Laryngologica 71* (1–6), S.166–176. DOI: 10.3109/00016487109125346.

Stankovic, Konstantina; Rio, Carlos; Xia, Anping; Sugawara, Mitsuru; Adams, Joe C.; Liberman, M. Charles; Corfas, Gabriel (2004): Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. In: *Journal of Neuroscience 24* (40), S.8651–8661. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0733-04.2004.

Starr, A.; Amlie, R.N.; Martin, W.H.; Sanders, S. (1977): Development of auditory function in newborn infants revealed by auditory brainstem potentials. In: *Pediatrics.* 60 (6), S.831-9. PMID: 600595.

Stassart, Ruth M.; Fledrich, Robert; Velanac, Viktorija; Brinkmann, Bastian G.; Schwab, Markus H.; Meijer, Dies; Sereda, Michael W.; Nave, Klaus-Armin (2013): A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. In: *Nature Neuroscience 16* (1), S.48–54. DOI: 10.1038/nn.3281.

Stützer, Ina; Selevsek, Nathalie; Esterházy, Daria; Schmidt, Alexander; Aebersold, Ruedi; Stoffel, Markus (2013): Systematic proteomic analysis identifies β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic β-cells. In: *Journal of Biological Chemistry 288* (15), S.10536–10547. DOI: 10.1074/jbc.M112.444703.

Suescun, J.; Chandra, S.; Schiess, M.C. (2019): The Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. In: *Translational Inflammation*. Editors: Actor, J.K.; Smith, K.C.; Academic Press: Houston, TX, USA, 2019, S. 241–267. ISBN 9780128138328. DOI:10.1016/B978-0-12-813832-8.00013-3.

Sun, Jichao; Roy, Subhojit (2018): The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in alzheimer's disease pathogenesis. In: *Developmental Neurobiology 78* (3), S.340–347. DOI: 10.1002/dneu.22556.

Suthakar, Kirupa; Liberman, M. Charles (2019): A simple algorithm for objective threshold determination of auditory brainstem responses. In: *Hearing Research 381* (10), S.107782. DOI: 10.1016/j.heares.2019.107782.

Taveggia, Carla; Zanazzi, George; Petrylak, Ashley; Yano, Hiroko; Rosenbluth, Jack; Einheber, Steven; Xu, Xiaorong; Esper, Raymond M.; Loeb, Jeffrey A.; Shrager, Peter; Chao, Moses V; Falls, Douglas L.; Role, Lorna; Salzer, James L. (2005): Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. In: *Neuron 47* (5), S.681–694. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.08.017.

Thinakaran, Gopal; Koo, Edward H. (2008): Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. In: *The Journal of Biological Chemistry 283* (44), S.29615–29619. DOI: 10.1074/jbc.R800019200.

Tramutola, A.; Lanzillotta, C.; Perluigi, M.; Butterfield, D. Allan (2017): Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. In: *Brain Research Bulletin 133* S.88–96. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.06.005.

Treiber, H.; Hagemeyer, N.; Ehrenreich, H.; Simons, M. (2012): BACE1 in central nervous system myelination revisited. In: *Molecular Psychiatry 17* (3), S.237–239. DOI: 10.1038/mp.2011.140.

Tziridis, Konstantin; Buerbank, Stefanie; Eulenburg, Volker; Dlugaiczyk, Julia; Schulze, Holger (2017): Deficit in acoustic signal-in-noise detection in glycine receptor α3 subunit knockout mice. In: *The European Journal of Neuroscience 45* (4), S.581–586. DOI: 10.1111/ejn.13489.

Uhlmann, R.F.; Larson, E.B.; Rees, T.S.; Koepsell, T.D.; Duckert, L.G. (1989): Relationship of hearing impairment to dementia and cognitive dysfunction in older adults. In: *JAMA* 1989 261 (13), S.1916-9. PMID: 2926927.

Vogl, Christian; Cooper, Benjamin H.; Neef, Jakob; Wojcik, Sonja M.; Reim, Kerstin; Reisinger, Ellen; Brose, Nils; Rhee, Jeong-Seop; Moser, Tobias; Wichmann, Carolin (2015): Unconventional molecular regulation of synaptic vesicle replenishment in cochlear inner hair cells. In: *Journal of Cell Science 128* (4), S.638–644. DOI: 10.1242/jcs.162099.

Voytyuk, Iryna; Mueller, Stephan A.; Herber, Julia; Snellinx, An; Moechars, Dieder; van Loo, Geert; Lichtenthaler, Stefan F.; De Strooper, Bart (2018): BACE2 distribution in major brain cell types and identification of novel substrates. In: *Life Science Alliance 1* (1), S.1–14. DOI: 10.26508/lsa.201800026.

Wang, Yong; Hirose, Keiko; Liberman, M. Charles (2002): Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. In: *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology 3* (3), S.248–268. DOI: 10.1007/s101620020028.

Wei, Wei; Shi, Xi; Xiong, Wei; He, Lu; Du, Zheng De; Qu, Tengfei; Qi, Yue; Gong, Shu Sheng; Liu, Ke; Ma, Xiulan (2020): RNA-seq Profiling and Co-expression Network Analysis of Long Noncoding RNAs and mRNAs Reveal Novel Pathogenesis of Noise-induced Hidden Hearing Loss. In: *Neuroscience 434* S.120–135. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.023.

Weyerer, Siegfried (2005): Altersdemenz. In: *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, Heft 28. Robert Koch- Institut (Hrg.) Berlin. Available at https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3179/22wKC7IPbmP4M_43.pdf?sequence=1&isAllowed=y. DOI: 10.25646/3104 (Accessed 29 January 2020).

Wilkins, Heather M.; Swerdlow, Russell H. (2017): Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. In: *Brain Research Bulletin 133* S.71–79. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.009.

Willem, Michael; Garratt, Alistair N.; Novak, Bozidar; Citron, Martin; Kaufmann, Steve; Rittger, Andrea; DeStrooper, Bart; Saftig, Paul; Birchmeier, Carmen; Haass, Christian (2006): Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. In: *Science (New York, N.Y.) 314* (5799), S.664–666. DOI: 10.1126/science.1132341.

Winblad, Bengt; Cummings, Jeffrey; Andreasen, Niels; Grossberg, George; Onofrj, Marco; Sadowsky, Carl; Zechner, Stefanie; Nagel, Jennifer; Lane, Roger (2007): A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease— rivastigmine patchversus capsule. In: *International Journal of Geriatric Psychiatry 22* (5), S.456–467. DOI: 10.1002/gps.1788.

Yan, Riqiang (2017): Physiological Functions of the β-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience 10* (April), S.97. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00097.

Zhang, Zhi Jian; Guan, Hong Xia; Yang, Kun; Xiao, Bo Kui; Liao, Hua; Jiang, Yang; Zhou, Tao; Hua, Qing Quan (2018): Estimation of the status of spiral ganglion neurons and Schwann cells in the auditory neural degeneration mouse using the auditory brainstem response. In: *Acta Oto-Laryngologica 138* (7), S.603–609. DOI: 10.1080/00016489.2018.1436766.

Zheng, Qing Yin; Johnson, Kenneth R.; Erway, Lawrence C. (1999): Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. In: *Hearing Research 130* (1-2): S.94-107.

DOI: 10.1016/s0378-5955(99)00003-9.

Zhu, Kaichuan; Xiang, Xianyuan; Filser, Severin; Marinković, Petar; Dorostkar, Mario M.; Crux, Sophie; Neumann, Ulf; Shimshek, Derya R.; Rammes, Gerhard; Haass, Christian; Lichtenthaler, Stefan F.; Gunnersen, Jenny M.; Herms, Jochen (2018): Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Inhibition Impairs Synaptic Plasticity via Seizure Protein 6. In: *Biological Psychiatry 83* (5), S.428–437. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.12.023.

Zylka-Menhorn V., Grunter D. (2019) Alzheimer-Wirkstoff Aducanumab: Erstaunliche Kehrtwende. *Deutsches Ärzteblatt* (12): S.832-833.

8. Anhang

8.1 Publikationsverzeichnis

Dierich, Marlen; Hartmann, Stephanie; Dietrich, Nadine; Moeser, Philip; Brede, Franziska; Johnson Chacko, Lejo; Tziridis, Konstantin; Schilling, Achim; Krauss, Patrick; Hessler, Sabine; Karch, Sandra; Schrott-Fischer, Anneliese; Blumer, Michael; Birchmeier, Carmen; Oliver, Dominik; Moser, Tobias; Schulze, Holger; Alzheimer, Christian; Leitner, Michael G.; Huth, Tobias (2019): β-Secretase BACE1 Is Required for Normal Cochlear Function. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 39* (45), S.9013–9027. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0028-19.2019.

8.2 Danksagung

Danken möchte ich meinem Mentor Priv.- Doz. Dr. Dr. Tobias Huth (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) für seine unvergleichliche Geduld, seinen intellektuellen Input und seine Präsenz für jegliche Art von Anliegen. Auch seine naturwissenschaftlichen Mitarbeiterinnen Dr. Sandra Lehnert und Dr. Stefanie Hartmann standen mir und der gesamten AG stets mit Rat und Tat bei.

Erlernt wurde die Whole-Mount-Präparation der Cochlea und deren Färbung von Dr. Marlen Dierich (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Philipps-Universität, Marburg). An dieser Stelle möchte ich ihr wie auch ihrem damaligen Mentor Dr. Michael Leitner für ihre Zeit, ihre Mühen und einen wundervollen Abend in Marburg danken.

Ein weiterer Dank gebührt der AG Schulze der experimentellen Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und insbesondere Dr. Konstantin Tziridis wie auch Dr. Achim Schilling, für die Bereitstellung und Unterhaltung des BERA-Setups sowie für die Programmierung der für die Auswertung notwendigen Tools.

An dieser Stelle sei ebenfalls meiner Familie gedankt. Durch sie ist mir der akademische Werdegang erst ermöglicht worden.

Zu guter Letzt danke ich meinem gesamten Freundeskreis (insb. Dr. Stefanie Balk, Julius Bockamp, Matthias Borutta und PD Dr. Julia Köhn) für die anhaltende Motivierung, die mich stets angetrieben hat, diese Arbeit zu vollenden.

Still möchte ich den Tieren gedenken, deren Leben für die Wissenschaft geopfert wurden.