

Aus der
Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde mit
Poliklinik Tübingen

**PDE9a-Hemmer beeinflussen periphere und zentrale
Hörfunktionen von Mäusen mit konditionaler genetischer
Deletion von Glucocorticoid-Rezeptoren im Frontalhirn**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Modro, Julian

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Rüttiger
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwarz

Tag der Disputation: 26.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Hörfunktion und neuronale Plastizität	8
1.1.1 Anatomie des auditorischen Systems	8
1.1.2 Anatomie des Hippocampus	11
1.1.3 Zusammenhang von Hören und neuronaler Plastizität	12
1.2 Stressreaktion	13
1.2.1 Glucocorticoide	13
1.2.2 Stressrezeptoren	14
1.2.3 Chronischer und akuter Stress	15
1.2.4 Einfluss von Stress auf Hörfunktion und neuronale Plastizität	16
1.3 Neurovaskuläre Kopplung	18
1.3.1 Wirkung von cGMP auf Hören und neuronale Plastizität	19
1.3.2 Wirkung von PDE9a-Hemmer auf cGMP-Levels	20
1.4 TMX-GRCaMKIIICreERT2-WT und -KO-Mäuse	20
1.5 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Hörmessungen an GR cKO im Vergleich zu Kontrolltieren	23
2.1.1 Zucht, Haltung und Gruppeneinteilung der Mausmutanten	23
2.1.2 Anästhesie der Mausmutanten	26
2.1.3 DPOAE-Messungen an Mausmutanten	27
2.1.4 ABR-Messungen an Mausmutanten	29
2.1.5 ASSR-Messungen an Mausmutanten	35
2.2 Pharmakologische Behandlung mit PDE9a-Hemmer	36
2.3 LTP-Messungen an hippocampalen Hirnschnitten	36
2.3.1 Herstellung der hippocampalen Hirnschnitte	36
2.3.2 Erzeugung der LTP in hippocampalen Hirnschnitten bei Mausmutanten	37
2.4 Statistische Auswertung	39

3	Ergebnisse	41
3.1	GR cKO weisen im Vergleich zu WT keine veränderten Hörschwellen, jedoch gesteigerte und beschleunigte ABR-Antworten auf	41
3.1.1	GR cKO weisen keine Unterschiede in den DPOAE-Messungen im Vergleich zu WT auf	41
3.1.2	GR cKO weisen keine Unterschiede in den ABR-Schwellen im Vergleich zu WT auf	43
3.1.3	GR cKO zeigen sowohl peripher als auch zentral erhöhte ABR-Wellen-Amplituden im Vergleich zu WT	44
3.1.4	GR cKO zeigen peripher verkürzte ABR-Wellen-Latenzen im Vergleich zu WT	46
3.1.5	GR cKO weisen bei hohen Intensitäten in der Wachstumsfunktion der ASSR-Messung erhöhte Signale im Vergleich zu WT auf	47
3.2	PDE9a-Hemmer verhindern negative zentrale und periphere Effekte bei WT und GR cKO verglichen mit Vehikel	49
3.2.1	PDE9a-Hemmer verhindern eine Senkung der DPOAE-Amplituden in der Wachstumsfunktion bei GR cKO verglichen mit Vehikel	49
3.2.2	PDE9a-Hemmer verhindern eine Verschlechterung der Noise-ABR-Schwellen verglichen mit Vehikel	51
3.2.3	PDE9a-Hemmer verhindern negative Effekte auf die ABR-Amplituden von WT und GR cKO verglichen mit Vehikel	53
3.2.4	PDE9a-Hemmer verhindern eine Verlängerung der ABR-Welle IV-Latenz bei WT verglichen mit Vehikel	56
3.2.5	PDE9a-Hemmer reduzieren die ASSR-Signale in der Wachstumsfunktion und bei starker Modulationstiefe bei GR cKO	58
3.3	Konditionale zentrale GR-Deletion und Vehikel-Behandlung können zu Veränderungen in der hippocampalen LTP führen	60
3.3.1	GR cKO zeigen Trends zu reduzierter LTP im Vergleich zu WT	60
3.3.2	PDE9a-Hemmer zeigen keine Effekte auf die LTP von WT und GR cKO, während Vehikel-Behandlung die LTP bei WT reduziert	61
4	Diskussion	64
4.1	Konditionale zentrale GR-Deletion steigert die ABR-Signale und zeigt einen Trend zu reduzierter LTP	64
4.1.1	Effekte auf die Hörfunktion	64
4.1.2	Effekte auf die LTP	68

4.2	PDE9a-Hemmer zeigen positive Effekte auf WT und GR cKO in den Hörmessungen, jedoch keine auf die LTP	69
4.2.1	Effekte auf die Hörfunktion	69
4.2.2	Effekte auf die LTP	76
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Erklärung zum Eigenanteil	94
8	Veröffentlichungen	95
	Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

ABR	auditory brainstem response (Hirnstammaudiometrie)
ACSF	artificial cerebrospinal fluid (artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit)
ÄHZ	äußere Haarzelle
AMPAR	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor (α -Amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor)
ASSR	auditory steady-state responses (Dauerantworten auf Hörreize)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (ein den Nervenwachstumsfaktoren ähnliches Neurotrophin)
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
CaMKII α	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cGMP	cyclic guanosine monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat)
CREB	cAMP response element-binding protein (cAMP Antwortsequenz-bindendes Protein)
DPOAE	distortion product otoacoustic emission (Distorsionsprodukt otoakustischer Emissionen)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ER	estrogen receptor (Östrogenrezeptor)
f-ABR	frequenzspezifische ABR

fEPSP	field excitatory postsynaptic potential (exzitatorisches postsynaptisches Feldpotenzial)
GABA	gamma-Aminobutyric acid (γ -Aminobuttersäure)
GC	Glucocorticoide
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
Hsp90	heat shock protein 90 (Hitzeschockprotein 90)
IHZ	innere Haarzelle
i.p.	intraperitoneal (in die Bauchhöhle)
KO	Knockout (Ausschaltung)
LOC	lateral olivocochlear complex (laterale olivocochleäre Fasern)
LTP	longt-term potentiation (Langzeitpotenzierung)
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
nNOS	neuronal nitric-oxide synthase (neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase)
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NO-GC	Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase (Stickstoffmonoxid-aktivierte Guanylylzyklase)
NVK	neurovaskuläre Kopplung
PDE	Phosphodiesterase
s.c.	subcutaneous (subkutan)
sGC	soluble guanylyl cyclase (lösliche Guanylylzyklase)

SPL	sound pressure level (Schalldruckpegel)
SEM	standard error mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TMX	Tamoxifen
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Außen-, Mittel- und Innenohrs	8
Abbildung 2: Die menschliche Hörbahn.....	9
Abbildung 3: Anatomie des Hippocampus.....	11
Abbildung 4: Stresseffekte auf den Körper	15
Abbildung 5: Aktivierung und Wirkung von cGMP auf Blutgefäße	18
Abbildung 6: Arbeitsablauf der Messungen	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung des TMX-induzierbaren Cre-loxP- Systems.....	24
Abbildung 8: Beispiel einer DPOAE-Messung	28
Abbildung 9: Akustisch evozierte Hirnstammsignale (ABR)	31
Abbildung 10: Auswertung der ABR-Wellen-Amplituden mit dem PEAK- Programm.....	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung der LTP-Messung.....	38
Abbildung 12: Maximale DPOAE-Amplituden im DP-gram, DPOAE- Wachstumsfunktion und DPOAE-Hörschwellen in WT und GR cKO	42
Abbildung 13: ABR-Schwellen in WT und GR cKO	43
Abbildung 14: ABR-Wellen-Amplituden in Welle I und IV von WT und GR cKO bei Click- und Noise-Stimuli.....	45
Abbildung 15: ABR-Wellen-Latenzen in Welle I und IV von WT und GR cKO bei Click- und Noise-Stimuli	46
Abbildung 16: ASSR-Messungen in WT und GR cKO.....	48
Abbildung 17: Veränderungen der maximalen DPOAE-Amplituden im DP-gram, der DPOAE-Wachstumsfunktion und der DPOAE-Hörschwellen in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung.....	50
Abbildung 18: Veränderungen der ABR-Schwellen in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung.....	52
Abbildung 19: Veränderungen der Amplituden in den ABR-Wellen I und IV in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung	54
Abbildung 20: Veränderungen der Latenzen in den ABR-Wellen I und IV in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung.....	57

Abbildung 21: Veränderungen der Signalstärken in den ASSR-Messungen in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung	59
Abbildung 22: fEPSP in % des Grundlinien-Signals 10 Minuten vor Beginn des Stimulus bis 60 Minuten nach Stimulus und in den Minuten 50-60 nach Stimulus bei WT und GR cKO mit alleiniger TMX-Behandlung	61
Abbildung 23: fEPSP in % des Grundlinien-Signals 10 Minuten vor Beginn des Stimulus bis 60 Minuten nach Stimulus und in den Minuten 50-60 nach Stimulus bei WT und GR cKO nach Vehikel-, PDE9a-Hemmer- oder keiner Behandlung	62

1 Einleitung

1.1 Hörfunktion und neuronale Plastizität

1.1.1 Anatomie des auditorischen Systems

Das Gehör dient der Wahrnehmung akustischer Reize der Umgebung (Zenner, 2011) und warnt vor herannahenden Gefahren. Über auditorische Stimuli kann das Tier reagieren und sich an verschiedene Situationen anpassen (Willmore et al., 2022). Besonders für Menschen, aber auch für andere Wirbeltiere, ist Kommunikation eine weitere prominente Funktion des Gehörs (Zenner, 2005). Es spielt eine zentrale Rolle beim Erlernen von Sprache, sodass Kinder mit angeborenem Hörverlust kommunikative Defizite entwickeln (Tuohimaa et al., 2022). Menschen können Frequenzen im Bereich von 20 Hz bis 20 kHz und Schallintensitäten von 0 bis 120 dB wahrnehmen, wohingegen Mäuse eine Sensitivität für Frequenzen zwischen 2 und 70 kHz aufweisen (Malmierca & Merchán, 2004). Um diese enorme Hörleistung zu gewährleisten, ist eine spezielle Anatomie der Cochlea gefordert (Abbildung 1). Die Cochlea, das periphere Hörorgan mit Sitz im Innenohr, ist der Anfang der aufsteigenden Hörbahn (Robles & Ruggero, 2001).

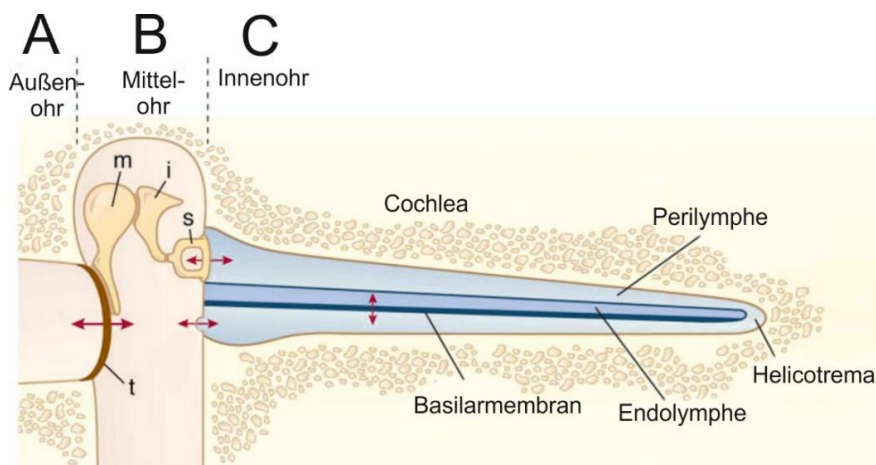


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Außen-, Mittel- und Innenohrs. Der Schall wandert vom Außenohr (A) über das Trommelfell (t) ins Mittelohr (B), wo er die Gehörknöchelchen Malleus (m), Incus (i) und Stapes (s) in Bewegung versetzt. Durch diese gelangt er über das ovale Fenster ins Innenohr (C) zur Cochlea. Von dort gelangt die Schallinformation über den auditorischen Nerven weiter ins zentrale Nervensystem (adaptiert von Fettiplace, 2017).

Bevor jedoch die Cochlea im Hörprozess involviert ist, erreichen akustische Reize der Umgebung als Schallwellen zuerst die Pinna als Teil des Außenohres (Abbildung 1 A) und gelangen in den Gehörgang, wo sie schließlich auf das Trommelfell (Figur 1 B, t: Tympanum) treffen. Dessen resultierende Oszillationen versetzen die Gehörknöchelchenkette, bestehend aus Hammer (m, Malleus), Amboss (i, Incus) und Steigbügel (s, Stapes), in Bewegung, welche schließlich über die Stapes-Fußplatte das ovale Fenster und damit die Cochlea erreicht (Fettiplace, 2017) (Abbildung 1 B). Innerhalb der Cochlea mit ihren flüssigkeitsgefüllten Gängen, der Scala tympani und der Scala vestibuli mit der Perilymphe sowie der Scala media mit der Endolymphe (Abbildung 1C), erfolgt die Umwandlung von mechanischen Schallinformationen in elektrische Informationen (Wangemann, 2006; Hibino et al., 2010).

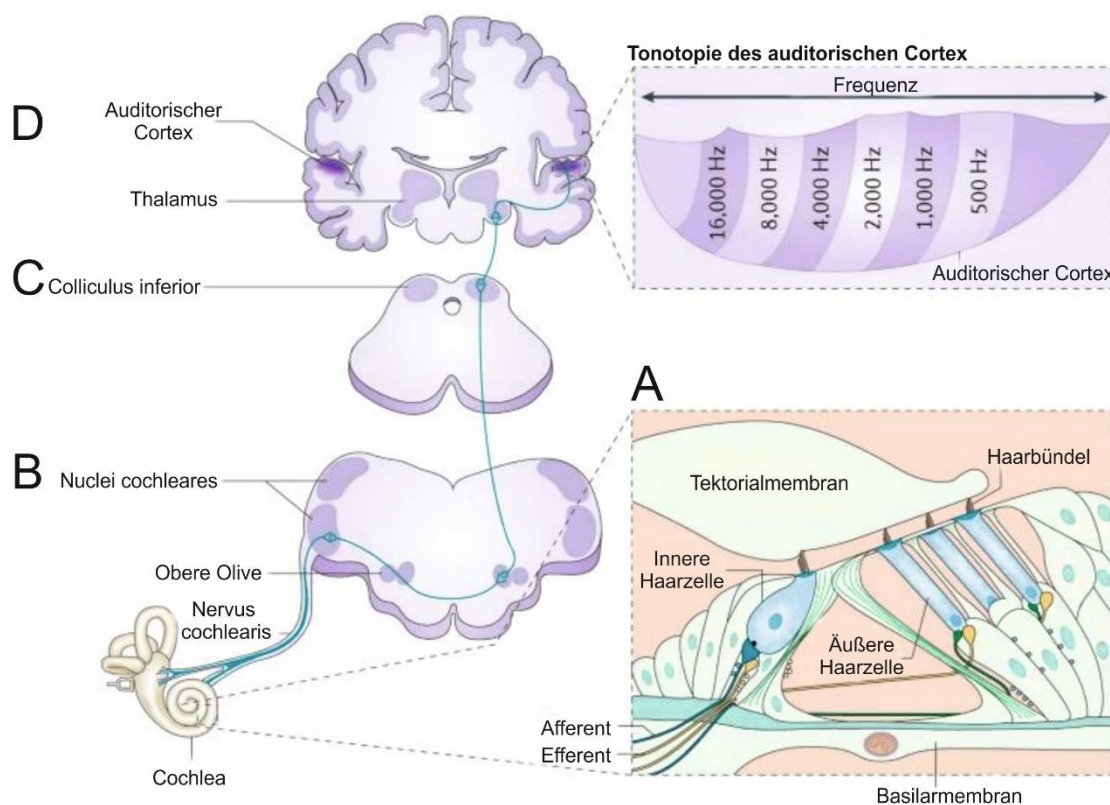


Abbildung 2: Die menschliche Hörbahn. Von der Cochlea mit dem Corti-Organ (A) gelangt das auditive Signal weiter über den Nervus cochlearis zu den Nuclei cochleares (B), über den Colliculus inferior (C) zum Thalamus und schließlich zum auditorischen Cortex (D). Zudem ist oben rechts die frequenzspezifische Gliederung des auditorischen Cortex abgebildet (adaptiert von Elgoyhen et al., 2015).

Das Corti-Organ innerhalb der Cochlea umfasst drei Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ) und eine Reihe innerer Haarzellen (IHZ) (Amarjargal et al., 2009) (Abbildung 2 A). Während die IHZ von 90-95 % aller afferenten Fasern über den Nervus cochlearis innerviert werden, werden die ÄHZ hauptsächlich efferent und mit 5-10 % der afferenten Fasern innerviert. Entsprechend fungieren die IHZ eher als primäre Rezeptorzellen. Die ÄHZ spielen dank nichtlinearer, aktiver Elektromotilität eine wichtige Rolle bei der Detektion des Schalldruckpegels (sound pressure level = SPL) und bei der Amplifikation (Fettiplace, 2017). Diese Elektromotilität bildet auch die Grundlage für klinische und experimentelle Hörmessungen (siehe Kapitel 2.1.3). Über Änderungen des Membranpotenzials der Haarzellen infolge des mechanischen Schallereignisses kommt es zur Ausschüttung von Neurotransmittern, welche ein elektrisches Signal in den afferenten Fasern des Ganglion spirale cochleae auslösen (Fettiplace, 2017). Diese afferenten Fasern leiten Informationen von den Haarzellen über den Nervus cochlearis zu weiter zentral gelegenen Strukturen der Hörbahn, den Nuclei cochleares in der Medulla oblongata (White et al., 2022) (Abbildung 2 B). Da die audiometrische Messung elektrischer Antworten dieser zentral gelegenen Strukturen in Klinik und Forschung Anwendung findet (siehe Kapitel 2.1.4), sind Kenntnisse über deren Anatomie von klinischer und experimenteller Bedeutung.

In den Nuclei cochleares erfolgt die Umschaltung auf das zweite Neuron (Cant & Benson, 2003). Der Großteil auditorischer Fasern verbindet im weiteren Verlauf den Hirnstamm mit dem oberen Olivenkomplex der kontralateralen Seite, von dem die Masse der Fasern nun weiter als Lemniscus lateralis zum Colliculus inferior zieht (Biacabe et al., 2001) (Abbildung 2 C). Der Corpus geniculatum mediale als Teil des Thalamus erhält die projizierenden Fasern des Colliculus inferior (Møller, 2006; Fujimoto et al., 2021). Von dort erreicht das akustische Signal den auditorischen Cortex im Temporallappen als höchstes Zentrum der aufsteigenden Hörbahn (Race et al., 2017) (Abbildung 2 D). Er integriert neben auditorischen Informationen auch Informationen sensorischer Systeme und prozessiert komplexe akustische Stimuli (Møller, 2006). Zudem zeigten Vorarbeiten bereits, dass es zahlreiche Verbindungen zwischen auditorischem

Cortex und Hippocampus gibt, sodass für das Verständnis der Hörfunktion auch Wissen über den Hippocampus relevant ist (Billig et al., 2022).

1.1.2 Anatomie des Hippocampus

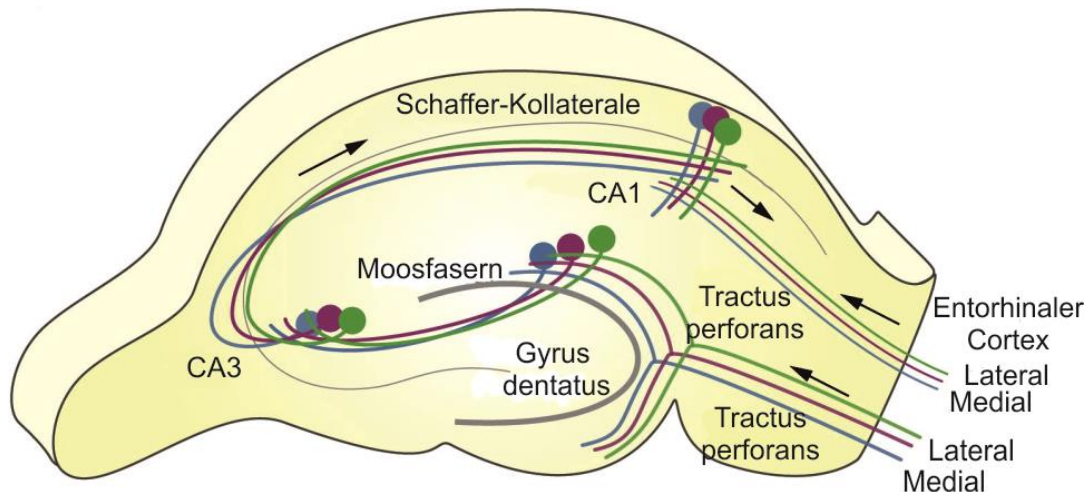


Abbildung 3: Anatomie des Hippocampus. Zu erkennen sind der Gyrus dentatus als Eingangsstation und die Moosfasern im Stratum corneum sowie die CA1- und CA3-Region. Insbesondere die Schaffer-Kollaterale zur Weiterleitung der Informationen von der CA3- zur CA1-Region wird experimentell stimuliert, um auf synaptische Plastizität zu untersuchen (adaptiert von Bartsch et al., 2015). CA-1 = Cornu Ammonis-1; CA-3 = Cornu Ammonis-3.

Der Hippocampus gilt als zentraler Knotenpunkt der Gedächtnis-Konsolidierung (Bartsch et al., 2015). Dabei erhält er sensorische Informationen von verschiedenen neocorticalen Strukturen (van Strien et al., 2009), unter anderem dem entorhinalen Cortex (Abbildung 3). Er befindet sich im medial gelegenen Teil des Endhirns und zu seinen Strukturen zählen Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn) und Subiculum (Bartsch et al., 2015). Man spricht hierbei von der *Formatio hippocampi*. Dabei ist der Gyrus dentatus die Eingangsstation des Hippocampus. Die Moosfasern sind Nervenfasern, welche Informationen vom Gyrus dentatus zur sogenannten CA3-Region (= Cornu ammonis-3-Region) weiterleiten (Bartsch et al., 2015). Das Cornu ammonis kann in die CA1- bis CA4-Regionen unterteilt werden. Von der CA3-Region gelangen die Informationen über Schaffer-Kollateralen weiter zur CA1-Region (Abbildung 3). Durch geeignete elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen im sogenannten Stratum radiatum kann experimentell auch die Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung (long-term potentiation = LTP) untersucht werden

(Marchetta et al., 2020). Bei der LTP führt die Glutamat-Ausschüttung als Folge von Aktionspotenzialen zur Aktivierung von zwei verschiedenen Glutamat-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. α -Amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor = AMPAR) und N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR). Die Aktivierung des postsynaptischen AMPAR führt zu einem Einstrom von Na^+ -Ionen und damit zu einem exzitatorischen postsynaptischen Feldpotenzial (field excitatory postsynaptic potential = fEPSP). Eine schnelle Serie von Aktionspotenzialen aktiviert die zunächst durch Mg^{2+} -Ionen blockierten N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR), woraus ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen resultiert, welcher die Verstärkung der synaptischen Übertragung zur Folge hat (Baltaci et al., 2019).

LTP stellt die am besten untersuchte Form der synaptischen Plastizität dar, bei der es zur langanhaltenden Stärkung von Synapsen als Antwort auf spezifische Stimulationen kommt (Bliss & Lomo, 1973; Nicoll, 2017). Synaptische Plastizität gilt als eine Form neuronaler Plastizität zur Reorganisation neurologischer Strukturen in Abhängigkeit von ihrer Verwendung. LTP wird auch als Korrelat für Lernen und Gedächtnis betrachtet (Pré et al., 2022).

1.1.3 Zusammenhang von Hören und neuronaler Plastizität

Hören benötigt kognitive Prozesse, wobei Sinneswahrnehmung und kognitive Funktion voneinander abhängig sind und sich bei Defiziten gegenseitig beeinflussen (Wayne & Johnsrude, 2015) können. So wirkt sich Hörverlust negativ auf Kommunikation, soziale Interaktion und die generelle Lebensqualität aus (Graydon et al., 2018). Die Einschränkungen im Lebensalltag begünstigen kognitiven Abbau, sodass Hörverlust bereits als Risikofaktor für Alzheimer identifiziert werden konnte (Pérez-González et al., 2022). Ebenso bestehen Hinweise darauf, dass aus altersbedingter cochleärer Synaptopathie, also der Schädigung der Synapse der inneren Haarzelle, auch kognitive Veränderungen resultieren, unter anderem bezüglich der Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung im Hippocampus und Gedächtnisbildung (Marchetta et al., 2020).

Desweiteren ist aus lange zurückliegenden Studien bekannt, dass neurodegenerative Erkrankungen auditorische Hirnareale betreffen können und zu zentralen Hördefiziten führen (Kurylo et al., 1993; Strouse et al., 1995). Somit liegt ein bidirektionaler Zusammenhang zwischen Hören und kognitivem Abbau vor, wobei der genaue Zusammenhang und die Kausalität unklar sind.

Da sich pathogene Proteine im Rahmen von neurodegenerativen Demenzen auch in Strukturen des auditorischen Systems finden lassen, wird vermutet, dass zentrale Hörstörungen frühe Anzeichen von neurodegenerativen Demenzen darstellen könnten (Johnson et al., 2021). So zeigte sich im transgenen Mausmodell ein gesteigertes Auftreten von Hördefekten bei einer gesteigerten Expression des mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebrachten Tau-Proteins in den cochleären Haarzellen (Omata et al., 2016).

1.2 Stressreaktion

1.2.1 Glucocorticoide

Neben mit dem Gehör assoziierten Prozessen kann sich auch Stress auf neuronale Plastizität auswirken (Sapolsky, 2003). Im Rahmen der Stressreaktion spielen Glucocorticoide (GC) eine zentrale Rolle (Jiang et al., 2022; Leung et al., 2022).

Glucocorticoide werden in der Nebennierenrinde aus Cholesterin gebildet und weisen neben ihrer Hauptfunktion bei der Stressantwort diverse weitere Funktionen im Körper auf, zum Beispiel bei der Entwicklung von Organen und Gewebe (Davies et al., 2022) oder bei der Kontrolle von Verhalten (Kim et al., 2022). Im Rahmen der Stressreaktion aktivieren GC die Stressachse und beeinflussen physiologische Aspekte wie die Stoffwechselregulation. Die Stressachse ist der endokrine Kern des Stress-Systems und umfasst das hypothalamische Corticoliberin, das hypophysäre Corticotropin und das adrenale Cortisol (Chai et al., 2022). Um den Organismus auf künftige Stressereignisse vorzubereiten, fördern GC zudem Prozesse der Gedächtnisbildung (De Kloet et al., 2005). Die Ausschüttung von GC folgt einer zirkadianen Rhythmik und beeinflusst den Schlaf- und Essensrhythmus (De Kloet et al., 1998). GC binden

an Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR) und Glucocorticoid-Rezeptoren (GR), wobei MR ebenfalls die ähnlich aufgebauten Mineralocorticoide binden wie etwa Aldosteron, welches jedoch nicht in der Stressantwort, sondern im Natrium-Haushalt der Niere involviert ist (Joëls & De Kloet, 1994).

1.2.2 Stressrezeptoren

Die beiden Stressrezeptor-Typen MR und GR binden GC mit unterschiedlicher Affinität. Im zentralen Nervensystem (ZNS) binden MR GC mit hoher Affinität aber geringer Kapazität, während GR im Vergleich nur über ein Zehntel der Affinität für GC aber eine deutlich höhere Kapazität verfügen (De Kloet et al., 1999). Beide sind nukleäre Steroidhormon-Rezeptoren (Canlon et al., 2007), die als Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren. Durch Liganden-Bindung kommt es zu allosterischen Veränderungen und damit zur Bindung des Rezeptor-Hormon-Komplexes an das DNA-responsive Element in der Promotor-Region des Zielgens, was wiederum eine Modulation der Genexpression bewirkt (Evans, 1988). In ihrer inaktiven Form sind MR und GR im Zytoplasma an Chaperone geheftet (Vandevyver et al., 2012). Bei Transport von GC in die Zelle kommt es zur Liganden-Bindung an die Rezeptoren, woraufhin MR und GR sich vom Chaperon lösen und Dimere bilden. Diese wiederum gelangen in den Zellkern und binden an das GC-responsive Element, das die Genexpression reguliert (Canlon et al., 2007). In den limbischen Neuronen sind große Mengen an MR und GR coexprimiert, wobei unter anderem der Hippocampus MR und GR aufweist. Die meisten anderen Hirnregionen weisen hingegen nur GR auf (De Kloet et al., 1999). Die höchste GR-Dichte im Gehirn findet sich im lateralen Septum im Telencephalon, im Gyrus dentatus des Hippocampus (Dragatsis & Zeitlin, 2000; Wang et al., 2013), im Nucleus tractus solitarii des Hirnstamms und in der zentralen Amygdala. Peripher ist die GR-Dichte in der Cochlea höher als in vestibulären Regionen. In der Cochlea sind GR in den Neuronen der Spiralganglien und mit geringerer Dichte in der Stria vascularis und dem Corti-Organ in den IHZ und ÄHZ lokalisiert (Curtis & Rarey, 1995). GR kommen sowohl in prä- als auch postsynaptischen Membranen vor sowie in

Mitochondrien, Zellkern und Zytoplasma. GR wird eine bedeutende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung und damit langfristigen Anpassung an Stress-Situationen zugeschrieben (De Kloet et al. 1999).

1.2.3 Chronischer und akuter Stress

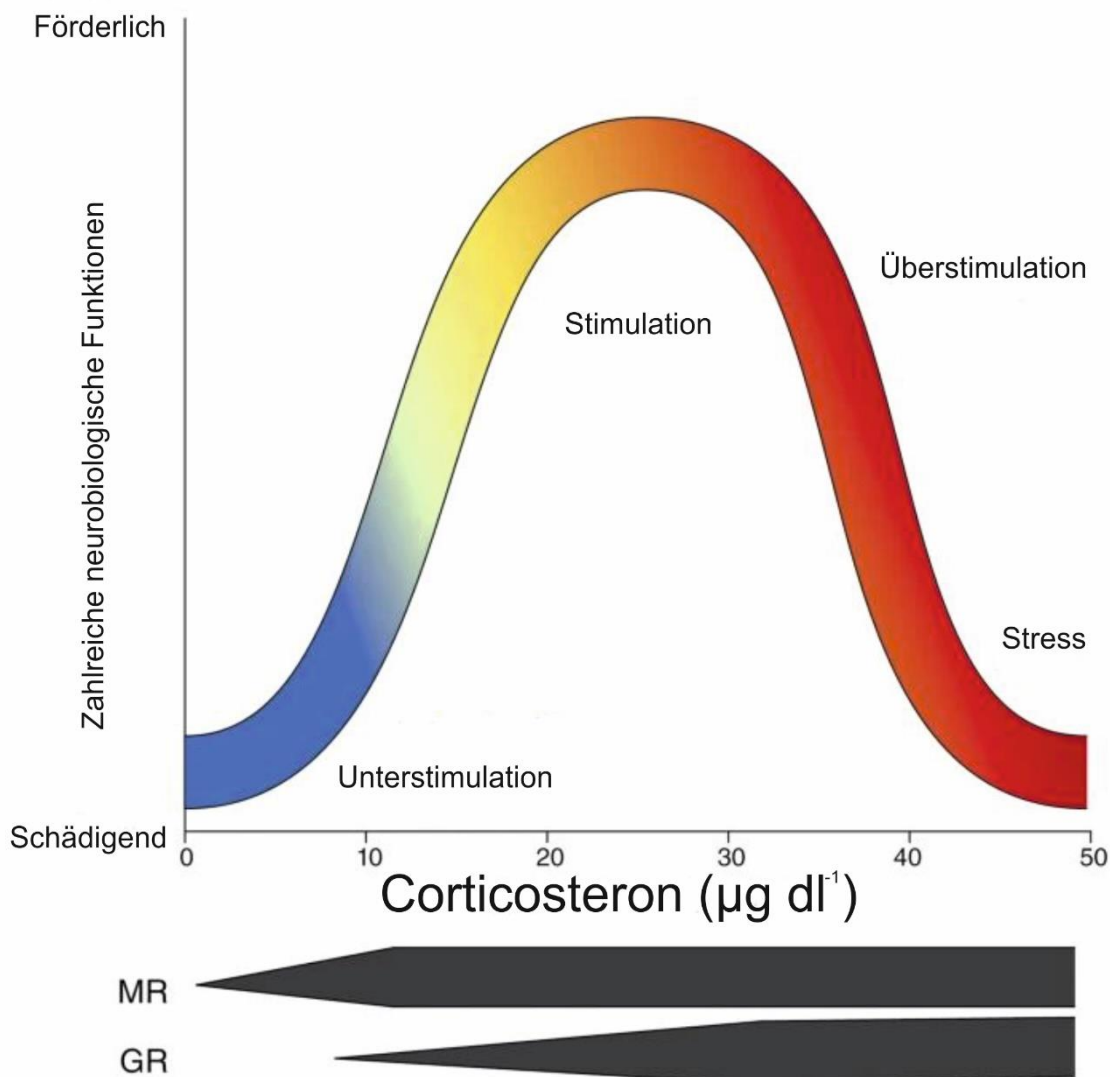


Abbildung 4: Stresseffekte auf den Körper. Ein moderater Stresspegel ist vorteilhaft, während Über- und Unterstimulation schädigend wirken. Der Stresspegel wird anhand des Corticosteron-Spiegels im Blut untersucht. MR zeigen eine höhere Affinität für Stresshormone als GR, sodass die Stresshormone bei niedrigen Konzentrationen an die MR binden. Bei höheren Konzentrationen und einer zunehmenden Sättigung der MR binden die Stresshormone vermehrt an die weniger affinen GR (adaptiert von Sapolsky, 2015). GR = Glucocorticoid-Rezeptor; MR = Mineralocorticoid-Rezeptor.

Die Menge an ausgeschütteten GC ist entscheidend dafür, wie der Organismus auf Stress reagiert. Milder bis moderater Stress hat positive, stimulierende

Effekte auf den Körper (Oshri et al., 2022) (Abbildung 4, grüner Bereich), wohingegen hohe langanhaltende GC-Spiegel als Folge von chronischem Stress einen negativen, schädigenden Effekt zeigen (Abbildung 4, roter Bereich) wie beispielsweise ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose (Yao et al., 2019). Andererseits ist auch die völlige Abwesenheit von Stress in Form von Unterstimulation nicht von Vorteil (De Kloet et al., 2005). Dieser Zusammenhang kann mit einer Optimumskurve beschrieben werden (Abbildung 4). Milder Stress führt zu niedrigeren GC-Spiegeln und damit zu einer Bindung an die affineren MR-Rezeptoren, die folglich bei akutem Stress aktiviert werden. Bei chronischem Stress hingegen binden die GC nach Sättigung der MR eher an die GR und sind folglich mit chronischem Stress assoziiert (De Kloet et al., 2005).

1.2.4 Einfluss von Stress auf Hörfunktion und neuronale Plastizität

Durch Aktivierung der Stressachse bewirkt Stress eine Veränderung der Hörfunktion (Canlon et al., 2007), wobei im Tiermodell verschiedene Auslöser der Stressantwort, wie beispielsweise ein Hitzeschock (Paz et al., 2004; Yoshida et al., 1999), Stress durch Immobilisation (Curtis & Rarey, 1995; Wang & Liberman, 2002) oder akustischer Stress (Muchnik et al., 1992; Tahera et al., 2006), zu physiologischen und neuroendokrinen Veränderungen im Körper führen. Diese neuroendokrinen Veränderungen können anhand eines Anstiegs des Corticosteron-Spiegels gemessen werden, und da es sich um einen endokrinen Mechanismus handelt, kann Stress den gesamten Körper und somit auch das Gehör beeinträchtigen (Savitska et al., 2022). Da GR in verschiedenen Zellen der Cochlea exprimiert sind, ist davon auszugehen, dass eine Verbindung zwischen dem auditorischen System und der Stressachse besteht. Wurde die Stressachse vor der akustischen Stimulation durch Immobilisation aktiviert, wurden mehr GC ausgeschüttet und die Hörfunktion geschützt (Canlon et al., 2007). In einer weiteren Studie (Singer et al., 2018) wurden Ratten mit Mifepriston, einem GR-Antagonisten, oder Spironolacton, einem MR-Antagonisten, behandelt, um den Effekt der Blockierung von Stressrezeptoren auf die Hörfunktion nach akustischem Trauma zu untersuchen.

Dabei konnte kein Effekt der pharmakologischen Blockade der Stressrezeptoren auf die ÄHZ-Funktion 14 Tage nach akustischem Trauma beobachtet, jedoch eine Protektion der elektrischen Antworten peripherer und zentraler Strukturen der aufsteigenden Hörbahn und spezieller Synapsen der IHZ nach Mifepriston-, nicht jedoch Spironolacton-Behandlung, festgestellt werden. Somit verhinderte die Blockierung von GR, nicht jedoch von MR, die Trauma-induzierte Hörschädigung. GR-Aktivierung beeinflusste IHZ und Nervantworten nach akustischem Trauma vermutlich negativ (Singer et al., 2018). Neben der pharmakologischen Blockade von MR und GR wurde auch eine genetische Deletion der beiden Rezeptoren im Hinblick auf die Hörfunktion untersucht (Marchetta et al., 2022). Dabei wurde festgestellt, dass die kombinierte Deletion von MR und GR zu einer schnelleren Prozessierung von Informationen in der Cochlea und verstärkten Hirnreaktionen auf amplitudenmodulierte Töne führte. Dies legt nahe, dass die kombinierte Aktivierung von MR und GR beispielsweise unter erhöhtem chronischen Stress die Prozessierung auditorischer Informationen hemmt (Marchetta et al., 2022). Zudem existieren Hinweise, dass das Innenohr über ein eigenes Stress-System verfügt, welches nach Schallschädigung die Hörfunktion und den Erhalt sensorischer Strukturen beeinflusst. Trotz des bis heute nicht ausreichend bekannten Wirkmechanismus werden synthetische GC sowohl bei der Therapie schallinduzierten Hörverlustes als auch zur Otoprotektion im Rahmen von Cochlea-Implantat-Operationen eingesetzt (Dhanasingh et al., 2021).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die jeweils im Alter von zwei Monaten und vier Monaten Stress auslösenden Situationen wie etwa dem Verharren in einer engen Röhre ausgesetzt waren, im Alter von sechs Monaten Defizite in den hippocampalen LTP-Messungen aufwiesen (Grigoryan et al., 2014). Dies passt auch zu der Beobachtung, dass GR im Frontalhirn eine wichtige Funktion bei der Langzeitpotenzierung im Hippocampus spielen (Shrivastava et al., 2021), sodass Stressereignisse über Stresshormone und die jeweiligen Rezeptoren auch auf die LTP-Messungen Einfluss nehmen können.

Die Beleuchtung unterschiedlicher Fallstudien an Patienten legt nahe, dass GC sehr unterschiedlich auf die Hörfunktion wirken. In den 1960er Jahren zeigten

Patienten mit einer Corticosteroid-Defizienz eine gesteigerte auditorische Sensitivität, welche nach Corticosteroid-Therapie normale Niveaus erreichte (Henkin et al., 1967). Zudem sind Corticosteroide übliche Therapeutika zur Behandlung von idiopathischem sensorischen Hörverlust. (Basappa et al., 2012).

1.3 Neurovaskuläre Kopplung

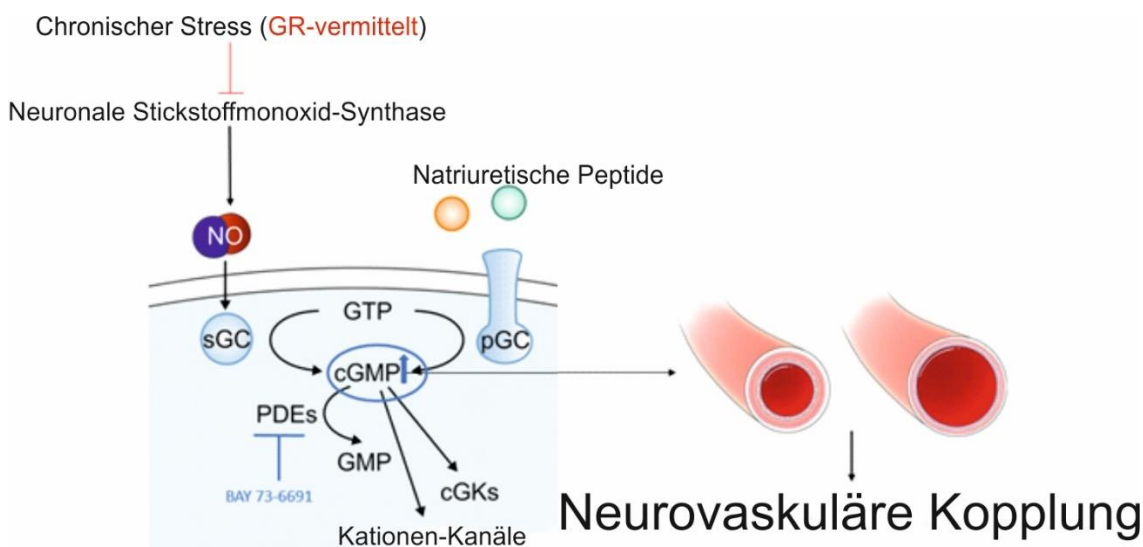


Abbildung 5: Aktivierung und Wirkung von cGMP auf Blutgefäße. cGMP wird unter anderem durch die sGC gebildet, wobei die sGC durch NO aktiviert wird. cGMP führt über Vasodilatation zur Erweiterung zerebraler Gefäße, wodurch der zerebrale Blutfluss und damit auch die Versorgung des Gehirns mit Stoffwechselmetaboliten wie Glucose gesteigert wird (adaptiert von Philine Marchetta). cGMP = cyclic guanosine monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat); sGC = soluble guanylyl cyclase (lösliche Guanylylzyklase); NO = nitric oxide (Stickstoffmonoxid).

Stress beeinträchtigt neben wichtigen zentralen Körperfunktionen wie dem Gehör auch die neurovaskuläre Kopplung (NVK) (Han et al., 2019).

NVK ist die enge Beziehung zwischen lokaler neuronaler Aktivität und darauffolgenden Veränderungen im zerebralen Blutfluss. Dadurch stellt sie eine wichtige Funktion für die Erhaltung der Homöostase des Gehirns dar. NVK befähigt das mikrovaskuläre System dazu, metabolische Bedürfnisse bei neuronaler Aktivität zu decken (Chen et al., 2014). Exzitatorische Neurone, inhibitorische Neurone, Gliazellen und zerebrale Blutgefäße sind Komponenten der NVK. Intensive Wechselwirkungen zwischen diesen Komponenten regulieren die Blut- und Nährstoffversorgung zu diversen Hirnregionen (Iadecola, 2017). Zudem haben auch Interneurone mit γ -Aminobuttersäure (*gamma*-Aminobutyric

acid = GABA) als Neurotransmitter direkten Kontakt mit angrenzenden parenchymalen Arteriolen. Die Interneurone regulieren den arteriolen Durchmesser durch Expression vasoaktiver Mediatoren wie Neuropeptid Y, Somatostatin und neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase (neuronal nitric oxide synthase = nNOS) (Cauli et al., 2004). Optogenetische Aktivierung GABAerger Interneurone kann einen gesteigerten zerebralen Blutfluss provozieren (Vazquez et al., 2018). All diese Studien zeigen, dass jegliche abnormalen Interaktionen zwischen GABAergen Interneuronen und vaskulären Funktionen unter pathologischen Bedingungen hämodynamische Signale beeinflussen können (Han et al., 2019).

Die durch die Interneurone exprimierte nNOS generiert unter anderem auch Stickstoffmonoxid (nitric oxide = NO), welcher die lösliche Guanylylzyklase (soluble guanylyl cyclase = sGC) aktiviert (Abbildung 5). Diese bildet zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate = cGMP), welches über die Vasodilatation zerebraler Gefäße an der neurovaskulären Kopplung beteiligt ist. Chronischer Stress, welcher über GR vermittelt wird, hemmt jedoch die nNOS und damit die cGMP-vermittelte neurovaskuläre Kopplung (Han et al., 2019). Diese GR-vermittelte Hemmung der nNOS stellt damit den Zusammenhang zwischen chronischem Stress, cGMP-vermittelter NVK und kognitiven Funktionen her, die durch den veränderten zerebralen Blutfluss beeinflusst werden.

1.3.1 Wirkung von cGMP auf Hören und neuronale Plastizität

Dadurch, dass cGMP zu einer Vasodilatation zerebraler Gefäße führt (Han et al., 2019, Yu et al., 2002), steigt auch der zerebrale Blutfluss und damit die Versorgung des Hirns mit Sauerstoff und wichtigen Stoffwechselmetaboliten wie Glucose. Es konnte gezeigt werden, dass Glucose-Gaben an ältere Menschen verbesserte Leistungen des episodischen Gedächtnisses erzielten (Van der Zwaluw et al., 2015). Entsprechend konnte ein erhöhter cGMP-Spiegel durch Hemmer der Phosphodiesterase (PDE) bereits positive Wirkungen auf Kognition und LTP in Mäusen entfalten (Hutson et al., 2011) sowie otoprotektiv bei akuter

Belastung durch akustische Reize mit hoher Schallintensität wirken (Jaumann et al., 2012). In Arbeiten mit KO-Mäusen, bei denen cGMP-produzierende Enzyme deletiert wurden, zeigte sich eine wichtige Rolle dieser Enzyme und damit von cGMP für die metabolische Versorgung und Stabilität der OHC (Marchetta et al., 2020). Die Vermutung, dass sich cGMP positiv auf neuronale Plastizität auswirkt, wird dadurch bekräftigt, dass cGMP bei der Regulation post- und präsynaptischer Übertragungseigenschaften elementar für die Plastizität der Synapse ist (Swetha et al., 2022).

1.3.2 Wirkung von PDE9a-Hemmer auf cGMP-Levels

Der intrazelluläre cGMP-Spiegel kann über die Aktivierung cGMP-synthetisierender Guanylylzyklen oder durch die Hemmung der cGMP-abbauenden PDEs gesteigert werden (Russell & Morgan, 2010). Es sind elf verschiedene PDEs bekannt (Orhan et al., 2022). Dabei fungiert der N-Terminus als regulatorische Region, während der C-Terminus cAMP (cyclic adenosine monophosphate = zyklisches Adenosinmonophosphat) oder cGMP oder beide als Substrate erkennt (Jansen et al., 2016). Unter den PDEs weist PDE9 die höchste Affinität zu cGMP auf (Rana et al., 2021). PDE9a-Hemmer sind eine Wirkstoff-Gruppe, welche die cGMP abbauende PDE 9 hemmt, sodass es durch die Hemmung des Abbaus zu erhöhten cGMP-Spiegeln kommt (Swetha et al., 2022). Diese erhöhten cGMP-Spiegel könnten die NVK verbessern.

1.4 TMX-GRCaMKII α CreERT2-WT und -KO-Mäuse

Um die Funktion von zentralen GR bei stressbedingten Effekten auf Gehör und Kognition zu untersuchen, wurden für diese Arbeit spezielle Mausmutanten generiert, in denen GR zentral im Frontalhirn deletiert wurden. Diese Deletion erfolgte konditional unter dem Promotor Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α (CaMKII α). Dieser Promotor wurde gewählt, da er spezifisch im Frontalhirn vorgefunden wird, wo auch das limbische System und der Hippocampus lokalisiert sind (Erondu & Kennedy, 1985; Dragatsis & Zeitlin, 2000; Wang et al., 2013). Somit erfolgte die Deletion allein im Frontalhirn und

nicht etwa im Innenohr. Da für die Experimente Mäuse mit normal entwickeltem Stress-System benötigt wurden, durfte die Deletion nur im adulten, normal entwickelten Tier stattfinden. Hierzu wurde ein Tamoxifen (TMX)-induzierbares Mausmodell verwendet, um akute Knockout-Tiere (KO) zu generieren (Feil et al., 1997; Günschmann et al., 2014; Erdmann et al., 2007). Diese Mausmutanten mit einer zentralen, konditionalen Deletion von GR mithilfe der CaMKII α -basierten, TMX-induzierbaren *CreERT2/loxP*-Methode werden im Folgenden mit GR cKO abgekürzt, während die Kontrolltiere ohne zentrale Deletion von GR mit WT abgekürzt werden. Bei den mit WT abgekürzten Kontrolltieren handelt es sich nicht um Wildtypen im Sinne eines natürlichen vorkommenden Genotypen, sondern um Mausmutanten, welche lox-markierte Gensequenzen für den GR aufweisen, nicht jedoch die für die Deletion der GR notwendige CreERT2-Rekombinase (siehe Kapitel 2.1.1).

1.5 Zielsetzung

Die systematische pharmakologische Antagonisierung von Stressrezeptoren und deren Effekt wurden bereits getestet (Singer et al., 2018). Dabei zeigte sich, dass die Blockierung von GR, nicht jedoch MR, Trauma-induzierte Effekte auf elektrische Antworten verschiedener Strukturen der aufsteigenden Hörbahn sowie Verluste von IZH-Synapsen kompensierte. Dies lässt darauf schließen, dass Stress die Dynamik der Schallverarbeitung im Hörnerv und damit wiederum die zentrale Hörschärfe beeinträchtigt. Da diese Veränderungen durch Mifepriston als GR-Antagonist verhindert werden, sind sie vermutlich GR-vermittelt (Singer et al., 2018). Neben der pharmakologischen Blockierung von GR wurde auch bereits die konditionale Deletion von GR im Frontalhirn nach TMX-Injektion samt ihren Effekten auf das Gehör untersucht (Marchetta et al., 2022). Hierbei zeigte sich, dass die GR-vermittelten Effekte durch zentrale Stressantworten verursacht wurden und über einen Top-down-Mechanismus die Hörnerven in der auditorischen Peripherie beeinflussten. Dabei zeigte sich bei den GR cKO eine auditive Desinhibition im Sinne einer gesteigerten und beschleunigten Hörnerv-Antwort und ebenfalls gesteigerten und beschleunigten

Antworten der Hörbahn auf Stammhirn-Ebene (Marchetta et al., 2022). In der vorliegenden Arbeit werden nun erstmalig dieselben GR cKO und WT mit PDE9a-Hemmer oder einer Kontrollsubstanz behandelt und mittels verschiedener elektrophysiologischer Messungen untersucht. Da das Signalmolekül cGMP an diversen Vorgängen während der Stressreaktion beteiligt ist (Carvalho-Costa et al., 2014), erweist es sich als vielversprechendes Zielmolekül für die pharmakologische Therapie von stressassoziierten Hörstörungen. Durch Behandlung mit PDE9a-Hemmer wird der cGMP-Spiegel der behandelten WT und GR cKO pharmakologisch erhöht und untersucht, inwieweit die Stressantwort im Gehirn in Bezug auf Gehör und Kognition moduliert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Hörmessungen an GR cKO im Vergleich zu Kontrolltieren

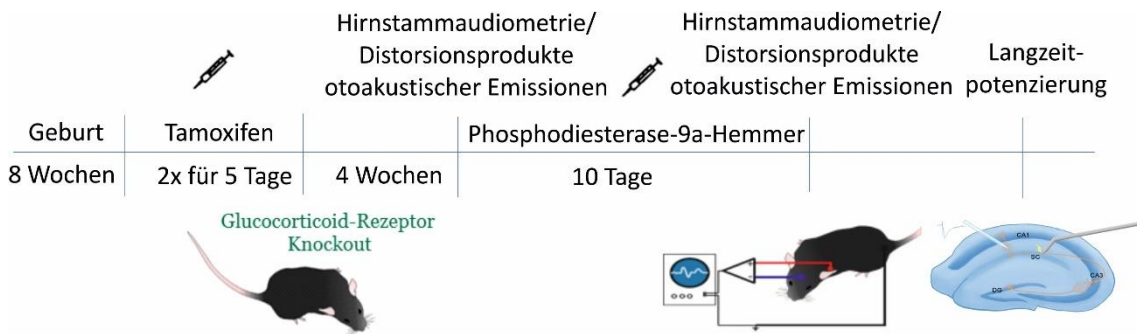


Abbildung 6: Arbeitsablauf der Messungen. Acht Wochen nach Geburt wurde TMX zwei Mal täglich an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal (i.p.) injiziert, wodurch die zentrale GR-Deletion herbeigeführt wurde. Vier Wochen später wurde die Hörfunktion der Tiere in Form von ABR- und ASSR-Messungen sowie bei zwölf der insgesamt 30 Tiere in Form von DPOAE-Messungen überprüft. An den zehn darauffolgenden Tagen erfolgte jeweils eine Injektion von PDE9a-Hemmer i.p., woran sich erneut ABR- und ASSR-Messungen und bei den zwölf Tieren mit vorherigen DPOAE-Messungen zusätzliche DPOAE-Messungen anschlossen. Einen Tag danach erfolgte die LTP-Messung ex vivo. TMX = Tamoxifen; i.p. = intraperitoneal; GR = Glucocorticoid-Rezeptor; ABR = Auditory brainstem response (Hirnstammaudiometrie); ASSR = Auditory steady-state responses (Dauerantworten auf Hörreize); DPOAE = distortion product otoacoustic emission (Distorsionsprodukt otoakustischer Emissionen); PDE9a = Phosphodiesterase 9a

2.1.1 Zucht, Haltung und Gruppeneinteilung der Mausmutanten

Insgesamt wurden 30 GR cKO und WT-Mäuse, davon 18 männlich und zwölf weiblich, für die Experimente verwendet. Sie waren zwischen 3,2 und 6,2 Monate alt und hatten während der Experimente ein Körpergewicht zwischen 16 g und 31 g. Sie wurden wie in Erdmann et al., 2007 beschrieben generiert, und von Philine Marchetta gezüchtet. Der Genotyp der Tiere wurde aus Ohrstanzen, die zur Markierung gesetzt wurden, im Alter von drei Wochen bestimmt. Sie wurden in der Tierhaltung Schnarrenberg-2 der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Tübingen gezüchtet und gehalten. Sie bekamen Wasser und Futter *ad libitum*. Sie wurden allein oder in Gruppen von zwei bis fünf Tieren gehalten. Weibchen und einzeln gehaltene Männchen erhielten Holz-Häuschen oder -tunnel in ihren Käfigen. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 12-12 h mit einer Hellphase von sechs Uhr bis 18 Uhr Sommerzeit. Die Luftfeuchtigkeit betrug 55 (+/- 5) % und die Temperatur 21,5 (+/- 1) °C. Das Gewicht der Tiere wurde täglich

während der Injektionen, einmal wöchentlich während der Erholungsphase und zu Beginn jedes Versuchstages kontrolliert. Die Nutzung, Behandlung und Haltung der Tiere und die Versuchsprotokolle basierten auf den Richtlinien der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Universität Tübingen. Sie wurden vom Tierschutzbeauftragten des Regionalvorstands (EU-Richtlinie 2010/63/EU) für wissenschaftliche Tierversuche in Tübingen unter dem Aktenzeichen HN 1/16 genehmigt.

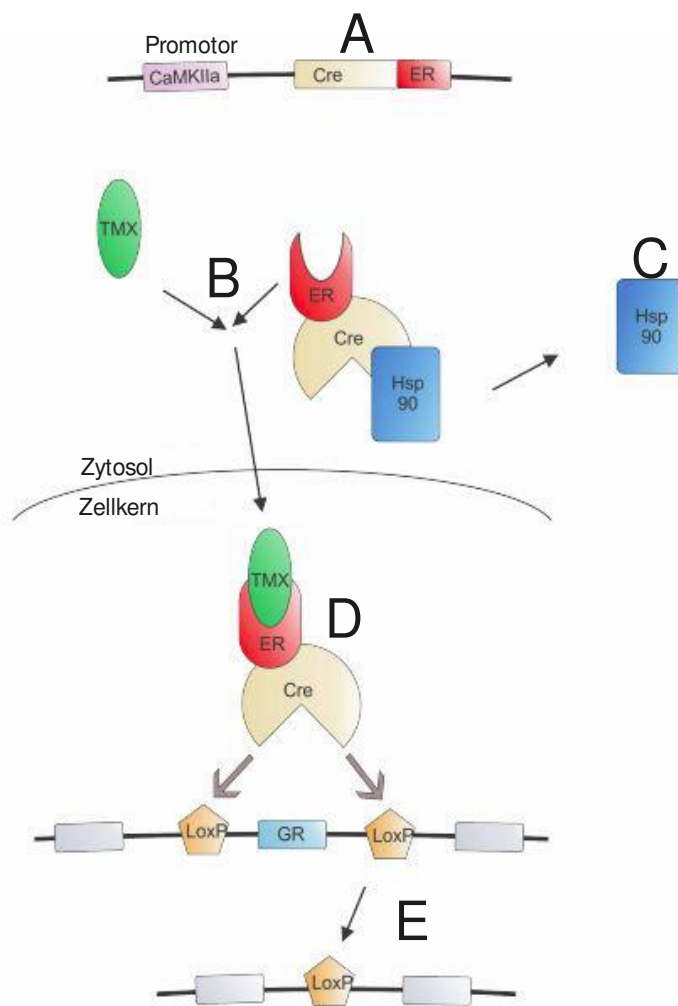


Abbildung 7: Schematische Darstellung des TMX-induzierbaren Cre-loxP-Systems. Die CreERT2-Rekombinase unter dem Promotor CaMKII α (A) bindet über einen kombinierten ER TMX (B), wodurch sich ein Heat-Shock-Protein löst (C), der Komplex in den Zellkern gelangt (D) und das geflochte Zielgen für den GR rekombiniert (E). Dies ermöglicht die konditionale GR-Deletion bei adulten Tieren (adaptiert von Günschmann et al., 2014). TMX = Tamoxifen; CaMKII α = Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α ; ER = estrogen receptor (Östrogenrezeptor); GR = Glucocorticoid-Rezeptor.

Das hier gewählte konditionale Maus-Modell ermöglicht es, dass eine Gen-Ausschaltung in der Keimbahn und damit lethale Phänotypen vermieden werden können. Die benutzte Mauslinie GR cKO und WT besitzt gefloxt GR-Gene und eine CreERT2-Rekombinase unter dem Promotor CaMKII α (Abbildung 7 A). Zur gezielten Deletion von DNA-Sequenzen wurde das Cre/lox-System, welches ursprünglich aus der Bakteriophagen P1 stammt, verwendet. Dabei werden Cre und Promotor in das Mausgenom eingebracht, wobei das Cre-Gen die Informationen für die Cre-Rekombinase trägt, welche wiederum lox-markierte Sequenzen schneidet (Güschmann et al., 2014). Die Cre-Rekombinase ist mit einem modifizierten Östrogen-Rezeptor (estrogen receptor = ER) assoziiert, welcher kein endogenes Östrogen, dafür jedoch den Östrogen-Antagonisten TMX (trans-1-(4-dimethylaminoethoxyphenyl) -1,2-diphenyl-but-1-en) bindet (Abbildung 7 B). Erst durch TMX-Injektion können die lox-markierten Abschnitte der GR-kodierenden Gene geschnitten werden (Feil et al., 1997; Erdmann et al., 2007), da erst durch TMX-Bindung das Hitzeschockprotein 90 (Heat shock protein 90 = Hsp90) entfernt wird (Abbildung 7 C), durch welches der ER im inaktiven Zustand außerhalb des Zellkerns blockiert wird. Nun kann der ER-Cre-Proteinkomplex in den Zellkern transportiert werden (Abbildung 7 D) und die Cre-Rekombinase dort die lox-markierten Zielsequenzen für den GR schneiden und damit das gefloxt Zielgen für den GR rekombinieren (Abbildung 7 E) (Güschmann et al., 2014). Alle Mäuse erhielten im Alter von ungefähr acht Wochen intraperitoneal (i.p.) TMX-Injektionen mit 1 mg TMX (Sigma-Aldrich, T-5648, München) in 100 μ l TMX-Lösungsmittel zwei Mal täglich an fünf aufeinander folgenden Tagen. Für die Lösung wurden 50 mg TMX in 500 μ l abs. (Merck, Darmstadt) gelöst und mit 4,5 ml Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich, S-5007) gemischt. Die Kontrollgruppe bestand aus TMX-GRCaMKIIICreERT2-negativen Mäusen, welche hier als WT bezeichnet werden. Vor Beginn der Hörmessungen erhielten alle Tiere vier Wochen Zeit zur Regeneration in ihren Heimkäfigen.

2.1.2 Anästhesie der Mausmutanten

Für die *in-vivo*-Hörmessungen wurde zur Anästhesie eine Vier-Komponenten-Narkose verwendet. Als Analgetikum diente der Opioid-Agonist Fentanyl (Fentanyl-Hameln; Hameln Pharma plus, Hameln, Deutschland) mit einer Dosierung von 0,05 mg/kg Körpergewicht (KG). Zur Relaxierung diente das Benzodiazepin Midazolam (Midazolam-hameln; Hameln Pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland) mit 2,5 mg/kg KG. Ergänzend fungierte der spezifische 2-Adrenozeptor-Agonist Medetomidin (Sedator; Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) als sedatives Analgetikum mit 0,5 mg/kg KG. Zur Vermeidung von Bradycardie wurden 0,2 mg/kg KG Atropinsulfat (B. Braun, Melsungen, Deutschland) hinzugefügt. Die Pharmaka wurden zur Injektion mit sterilem Wasser so verdünnt, dass die Anästhesie in einer Konzentration von 10 ml/kg KG verabreicht werden konnte (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Die initiale Injektion wurde i.p. durchgeführt, die Auffrisch-Injektion nach einer Stunde subkutan (subcutaneous = s.c.) mit einem Drittel der Initialdosis. Die Lagerung erfolgte bei 4°C und die Injektion im Anschluss nach Erwärmung auf Raumtemperatur.

Das Antidot für die Anästhesie bestand aus drei verschiedenen Komponenten. Naloxon (Naloxon-Hameln; Hameln Pharma plus GmbH) fungierte als Antagonist für Opioid-Rezeptoren mit einer Konzentration von 1,2 mg/kg KG. Flumazenil (Flumazenil; Fresenius Kabi) mit einer Konzentration von 0,55 mg/kg KG antagonisierte das Benzodiazepin Midazolam. Atipamezol (Antisedan; VETOQUINOL GmbH, Ravensburg, Deutschland) wurde als 2-Adrenoceptorantagonist mit einer Konzentration von 2,5 mg/kg KG verabreicht. Das Antidot wurde bis zu einer Konzentration von 10 ml/kg KG mit destilliertem Wasser verdünnt. Für jede vergangene Stunde seit der letzten Injektion des Anästhesie-Gemischs wurde das Volumen für das Antidot halbiert. Das Anti-FDD wurde s.c. injiziert. Während der Aufwachzeit wurden die Tiere in einem mit einer Wärmelampe bestrahlten Käfig platziert, bis die Körperspannung zurückgekehrt war. Das Antidot wurde bei 4°C gelagert und nach Erwärmung auf Raumtemperatur injiziert.

2.1.3 DPOAE-Messungen an Mausmutanten

Otoakustische Emissionen entstehen durch nichtlineare cochleäre Amplifikation (Dallos et al., 1992; Brownell et al., 1985) durch die Elektromotilität der ÄHZ. Sie sind ein funktioneller Biomarker für den Nachweis einer intakten ÄHZ-Funktion (Rüttiger et al., 2017) und sind ein objektives Messverfahren, welches sowohl in der klinischen Audiologie als auch im Tierexperiment etabliert ist.

Bei den Distorsionsprodukten der otoakustischen Emissionen (distortion product otoacoustic emissions = DPOAEs) handelt es sich um die kubischen Distorsionen infolge der Stimulation mit zwei Sinustönen verschiedener Frequenz und Intensität. Bei gleichzeitigem Abspielen von zwei Tönen in den Gehörgang kann ein dritter Ton gemessen werden, da es zu einer nichtlinearen Intermodulation der beiden Töne durch die Elektromotilität der ÄHZ kommt. Die aus der Elektromotilität der ÄHZ resultierende Druckwelle wandert zurück zum Trommelfell, welches in Schwingung versetzt wird und die Messung eines dritten Tons mittels eines Mikrofons im Gehörgang ermöglicht (Lonsbury-Martin & Martin, 1990).

Die beiden Anregungstöne der hier verwendeten Frequenzpaare f_1 und f_2 standen im Verhältnis $f_2 = 1,24 * f_1$. Die stärksten Antworten wurden bei einer Frequenz von $2f_1 - f_2$ gemessen (Abbildung 8).

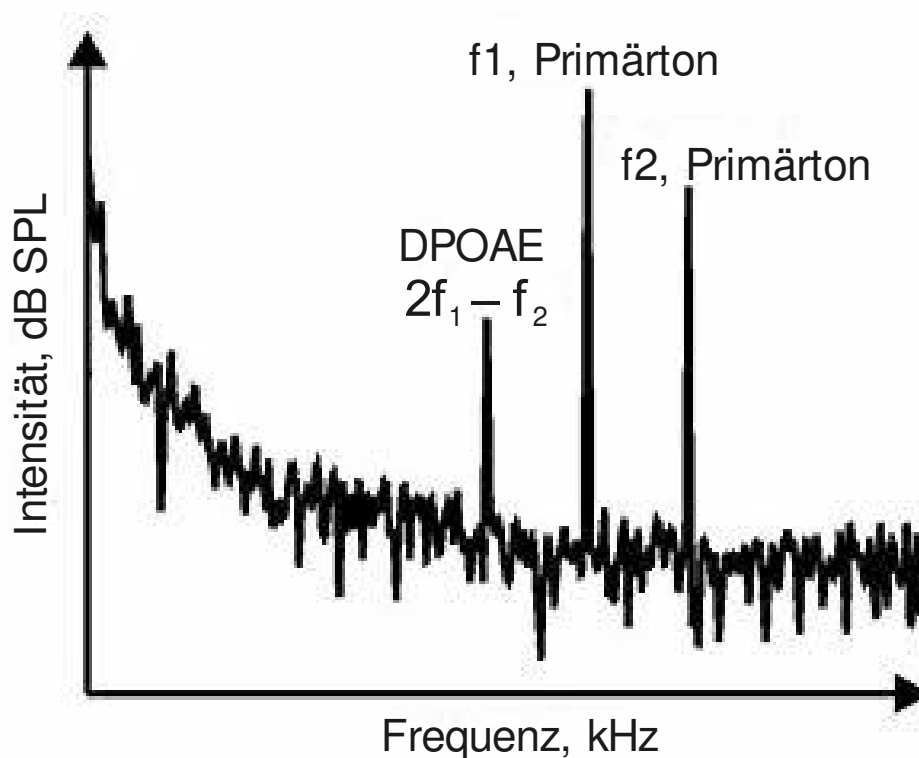


Abbildung 8: Beispiel einer DPOAE-Messung. Abgebildet sind die Primärtöne mit den Frequenzen f_1 und f_2 sowie das $2f_1 - f_2$ Distorsionsprodukt (adaptiert von Rüttiger et al., 2017). Durch die Stimulation mit zwei Sinustönen entsteht im Innenohr eine dritte Schwingung mit anderer Frequenz. Bei der Frequenz $2f_1 - f_2$ ist im vorliegenden Messaufbau die größte Amplitude der DPOAE messbar. DPOAE = distortion product otoacoustic emission (Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen).

Bei den Messungen wurde das narkotisierte Tier seitlich in die schalldichte Messkammer gelegt (IAC 400-A, Industrial Acoustics Company GmbH, Niederkrüchten). Augensalbe (Vidisc, Dr. Mann Pharma, Bausch + Lomb GmbH, Deutschland) wurde zur Protektion vor Austrocknung auf die Augen aufgetragen. Mit einem Operationsmikroskop (Zeiss OPMI1-104937, Deutschland) und einer Pinzette wurde der Gehörgang auf Ohrschmalz, Verletzungen und Infektionen untersucht. Bei klaren, freien Ohren wurde der als Mikrofon und Lautsprecher fungierende Koppler vorsichtig im ersten Gehörgang platziert.

Die Sinustöne wurden computergesteuert (Software: „DPOAE.exe“ 2008, M. Müller, L. Rüttiger, basierend auf C++/CVI National Instruments, USA. Erstellt mit LabWindows/CVI 5.0.1) erzeugt und gelangten über einen Abschwächer und Verstärker (Wulf Elektronik, Frankfurt, Deutschland) schließlich zum

Lautsprecher des Kopplers (Beyerdynamic DT-911), Heilbronn). Das kubische $2f_1 - f_2$ Distorsionsprodukt otoakustischer Emissionen (DPOAE) wurde für $f_2 = 1,24 \times f_1$ und $L_2 = L_1 - 10$ dB gemessen. Im ersten Schritt wurde f_1 von 1.59 kHz auf 25.80 kHz und f_2 von circa 2 kHz auf 32 kHz erhöht. L_2 hatte eine konstante Intensität von 50 dB SPL. Ein Mikrofon (Brüel & Kjaer 4191, Naerum, Dänemark) im Koppler maß das reflektierte, kubische $2f_1 - f_2$ DPOAE-Signal (= DP-gram). Ein Vorverstärker (2669C, Brüel & Kjaer, Dänemark) und Messverstärker (Nexus, Brüel & Kjaer, Dänemark) waren ebenfalls in den Messvorgang involviert. In einem zweiten Schritt wurden sieben Frequenz-Paare f_1 und f_2 mit f_1 von 4 kHz bis 32 kHz in Halb-Oktav-Schritten präsentiert. Der Pegel von L_1 wurde von -5 bis 65 dB SPL in 5 dB-Schritten erhöht. Zur Analyse wurden die Hörschwellen für die einzelnen Frequenzen bestimmt sowie die Wachstumsfunktion bei $f_1 = 11,3$ kHz. Kriterien zur Bestimmung der Hörschwelle waren, dass das DPOAE-Signal lauter als -15 dB SPL, 5 dB über Noise-Level und Teil einer Wachstumsfunktion sein musste.

2.1.4 ABR-Messungen an Mausmutanten

Hirnstammaudiometrien (Auditory brainstem responses = ABR) finden sowohl zu klinischen, als auch zu Forschungszwecken regelmäßig Anwendung bei Tieren und Menschen (Rüttiger et al., 2017; Ordiway et al., 2022). ABR-Schwellen mit bestimmten Stimuli können als funktionelle Biomarker für die Zerstörung der ÄHZ in bestimmten cochleären Regionen verwendet werden (Rüttiger et al., 2017), da die Hörschwellen für akustisch evozierte Potenziale von neuronalen Schäden unbeeinflusst bleiben, solange die Funktion der ÄHZ gegeben ist (Liberman et al., 1997). Über die Analyse der ABR-Wellen-Amplituden kann die Hörfunktion unabhängig von der Funktion der ÄHZ untersucht werden (Rüttiger et al., 2017; Johnson et al., 1976). Die Latenz der ABR-Wellen ist ein Maß für die Dauer der Informationsverarbeitung nach Beginn des Stimulus bis zum Auftreten des Maximums der jeweiligen ABR-Welle (Rasetshwane et al., 2013). Erhöhte Latenzen sind ein Biomarker für Dysfunktionen des auditorischen Nerven und wurden bereits mit Hörverlust korreliert (Rüttiger et al., 2017; Collet et al., 1992).

Verkürzte Latenzen wurden bereits mit einer verbesserten Hörfunktion assoziiert (Firat et al., 2008) und können darauf hindeuten, dass mehr Hörnerv-Fasern mit einer hohen spontanen Entladerate aktiviert werden, um bereits bei geringeren Intensitäten Signale weiterzuleiten. Verwendete Stimuli in dieser Arbeit waren kurze Klick-Geräusche, komplexere Töne oder frequenzspezifische Töne. Bei der ABR-Messung wird die neuronale Aktivität der aufsteigenden Hörbahn wiedergegeben, indem über vier durch eine Hautfalte gestochene Messelektroden (eine Erdungs-, eine negative Referenz- und zwei positive Referenzelektroden) Potenziale abgeleitet und schließlich bis zu 512 aufeinander folgende Signalantworten gemittelt werden. Durch das häufige Mitteln von gegenpolig präsentierten Stimuli wird das Lautsprecherartefakt herausgemittelt, sodass das ABR-Signal verbleibt.

Die fünf ABR-Wellen innerhalb von 10 ms nach Stimulus-Beginn repräsentieren die Strukturen der aufsteigenden Hörbahn (Chonchaiya et al., 2013). Welle I zeigt die Antwort der peripheren Hörnerven, Welle II des Nucleus cochlearis, Welle III des kontralateralen oberen Olivenkomplexes, Welle IV des lateralen Lemniscus und Welle V des Colliculus inferior (Rüttiger et al., 2017) (Abbildung 9 B). Bei der hier verwendeten Polarität der Elektrodenverschaltung folgt nach einer negativen eine positive Spitze der Welle.

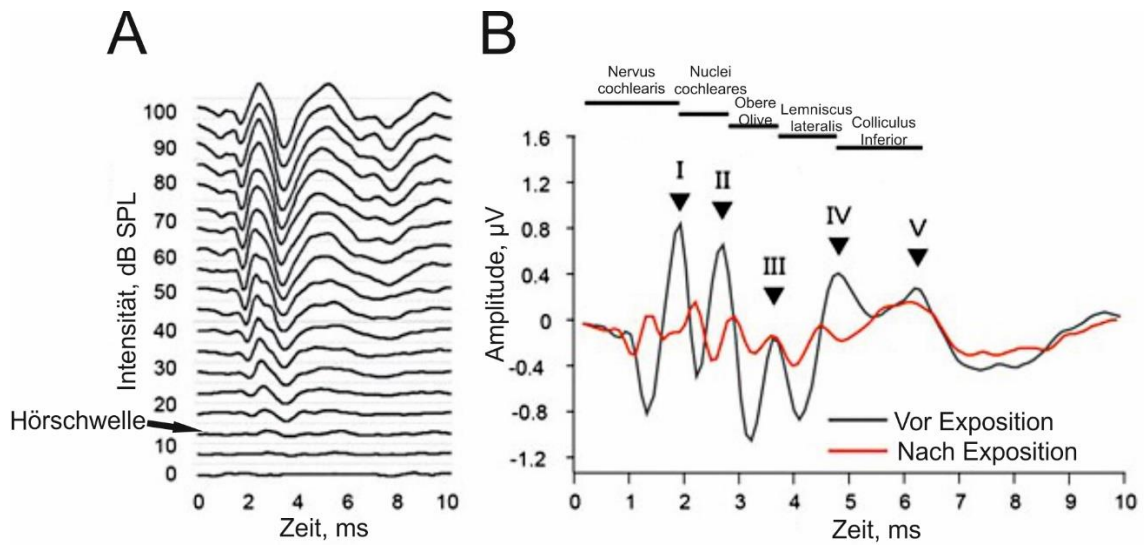


Abbildung 9: Akustisch evozierte Hirnstammsignale (ABR). Die ABR-Wellen zeigen die elektrischen Antworten verschiedener Strukturen der aufsteigenden Hörbahn (adaptiert von Rüttiger et al., 2017). Links befindet sich eine Darstellung der Wellen einer ABR-Messung mit von unten nach oben zunehmenden Stimuluspegeln, während rechts eine schematische Darstellung der Wellen zu sehen ist. Abgebildet sind die ABR-Wellen vor einer traumatischen Schall-Exposition in schwarz und 14 Tage nach Exposition in rot dieselben Wellen mit verringerter Amplitude und Latenzverschiebung. Das ABR-Signal dauert 10 ms und umfasst fünf ABR-Wellen. ABR = auditory brainstem response (Hirnstammaudiometrie).

Das verwendete Mess-Setup mit den unten genannten Modifikationen entsprach dem der DPOAE-Messungen.

Das Tier wurde auf einer Heizmatte in einer schalldichten Kammer platziert. Augensalbe wurde zur Protektion vor Austrocknung aufgetragen. Vier Elektrodendrähte unterschiedlicher Länge wurden durch feine Nadel-Einstichkanäle durch eine Hautfalte hindurchgeführt. Der kürzeste Draht diente als Erdungs-Elektrode und wurde am Rücken nahe dem Schwanz platziert. Der längste Draht wurde als negative Referenz-Elektrode zwischen den Augen im Bereich der Stirn angebracht. Die dritte und vierte aktive Elektrode wurden als positive Pole unterhalb des rechten oder linken Ohres platziert. Die Elektroden-Enden wurden mit Kabeln verbunden. Das Mikrophon in der Kammer wurde zur Kalibrierung und Aufnahme der vom Lautsprecher produzierten akustischen Stimuli genutzt. Die Maus wurde unmittelbar unter das Mikrophon gelegt. Die Tür der Kammer wurde geschlossen und sowohl am Oszilloskop außerhalb der Kammer als auch mit dem akustischen Signal eines weiteren Lautsprechers

außerhalb der Kammer das Signal-Rausch-Verhältnis überprüft. Die Erzeugung des Stimulus erfolgte über eine Input/Output-Karte (PCI-6052E, PCI-6251 oder PCIe-6259, National Instruments, Austin, Texas, USA) in einem IBM-kompatiblen Computer. Das SPL der Stimuli wurde über einen Verstärker und ein Abschwächer-System (Wulf Elektronik, Frankfurt) moduliert. Die gemessenen Signale wurden über einen Bandpass-Filter von 200 Hz bis 5 kHz (6-pole Butterworth hardware filter, Wulf Elektronik, Frankfurt) gefiltert und mit dem Faktor 100000 amplifiziert. Die Analog/Digital-Rate betrug 20 kHz. Zur Versuchssteuerung und Datenaufzeichnung für die Hörmessungen wurde ein laboreigenes Computerprogramm („Cap.exe“, Beta-Version, Rüttiger, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland) verwendet. Falls die Signalamplitude nach Amplifikation über 1,5 V betrug, wurde das Einzelsignal von der Software nicht berücksichtigt, um Bewegungsartefakte etwa durch muskuläre Aktivität oder Atmung auszuschließen.

Klick- und Rauschstimuli (im Folgenden als Click und Noise bezeichnet) wurden während der Messungen präsentiert. Die Intensität des Stimulus wurde zuerst mit 105 dB abgeschwächt, woraufhin die Abschwächung in 5-dB-Schritten bis zu einer Abschwächung von 5 dB reduziert wurde. Dies entsprach dem Stimulus mit der höchsten Intensität (circa 95 dB SPL). Der Click-Stimulus hatte eine Länge von 100 μ s. Der Frequenzgehalt des Click-Stimulus war maximal bei Frequenzen zwischen 1 und 6 kHz mit einem 30 dB SPL roll-off zwischen 6 und 45 kHz. Bei 10, 20, 30 und 40 kHz konnten lokale Minima gefunden werden. Der Mittelwert der Fourier-Transformation lag bei 5,4 kHz.

Der Noise-Stimulus hatte eine Länge von 1 ms und keine on- und off-set Rampen. Bei dem Stimulus handelte es sich um ein white broadband noise mit mehr Energie bei höheren Frequenzen über 10 kHz. Die Frequenz-Spanne bei maximalem Frequenzgehalt des Noise-Stimulus betrug 1-30 kHz und es gab einen Abfall von 30 dB SPL von 35 zu 65 kHz. Der Mittelwert der Fourier-Transformation lag bei 7,9 kHz.

Nach der Messung des ersten Ohres wurde das Tier umgedreht und zur Messung des anderen Ohres auf dieselbe Weise verfahren.

Im Anschluss an die Click- und Noise-Messungen beidseits wurde das Ohr mit der besseren Hörschwelle in den Click- und Noise-Messungen anschließend für frequenzspezifische Reinton-Messungen verwendet. Die Tondauer betrug 3 ms mit einem Anstieg und Abfall mit einer Dauer von je 1 ms. Zunächst wurden die für Mäuse üblichen Frequenzen 2, 2,83, 4, 5,66, 8, 11,31, 16, 22,63 und 32 kHz getestet, wobei die Intensitäten bei jeder Frequenz in 5 dB SPL-Schritten von 10 bis 100 dB SPL gesteigert wurden und dies 256 Mal wiederholt wurde.

Zur Auswertung der Hörschwellen mussten Hörmessungen für alle Click-, Noise- und frequenzspezifischen Stimuli durchgeführt werden. Die Hörschwelle wurde hierzu definiert als die niedrigste Lautstärke, bei der ein klares Signal von der Grundlinie unterschieden werden konnte (Abbildung 9 A).

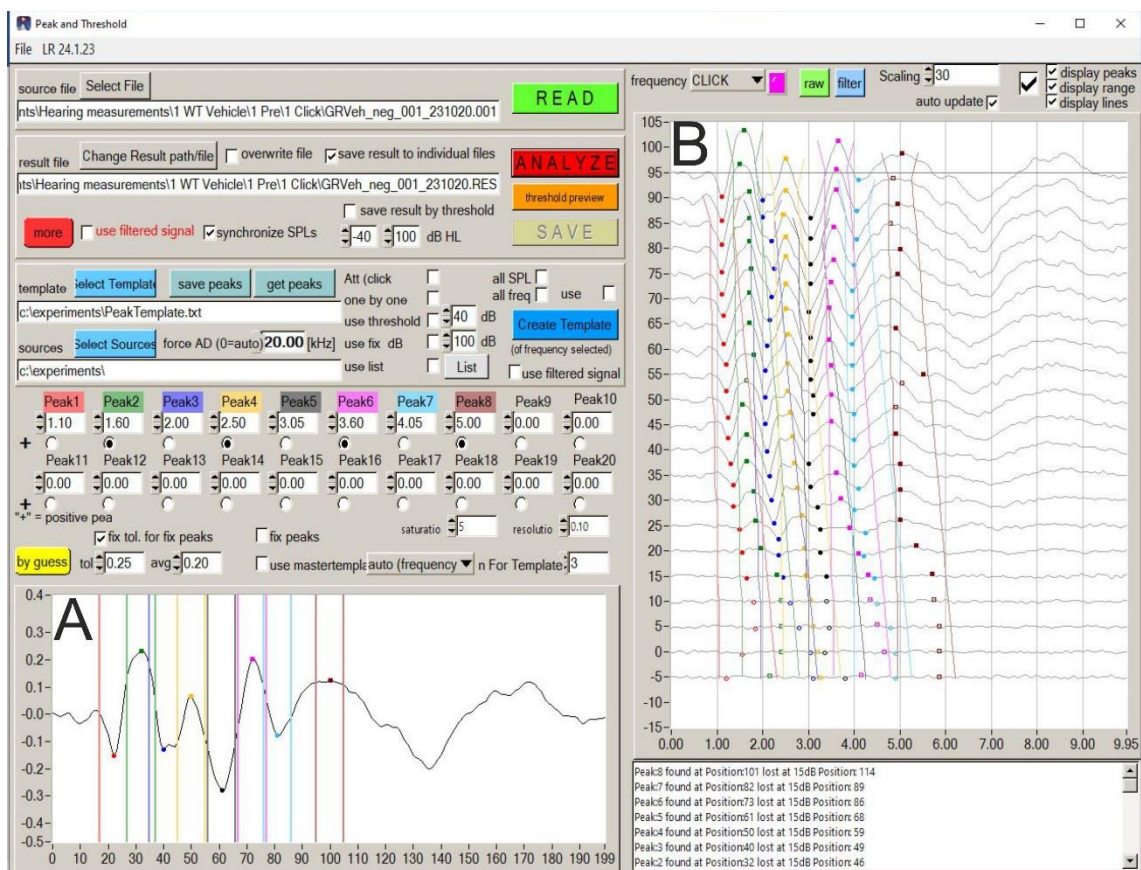


Abbildung 10: Auswertung der ABR-Wellen-Amplituden mit dem PEAK-Programm. Nachdem die ABR-Messungen im PEAK-Programm eingelesen wurden, konnten die Positionen der Minima und Maxima für eine Intensität manuell festgelegt werden (A). Die festgelegten Positionen wurden anschließend vom Programm für alle anderen SPL übernommen (B), sodass nun für jedes SPL die Positionen der insgesamt vier Minima und vier Maxima der ABR-Wellen I – IV bestimmt wurden. ABR = auditory brainstem response (Hirnstammaudiometrie); SPL = sound pressure level (Schalldruckpegel).

Jede ABR-Messung wurde mit dem Programm PEAK („PEAK.exe“ Version 1.0, Rüttiger, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland) geöffnet, sodass die Wellen bei allen gemessenen Lautstärkepegeln mit positiven und negativen Spitzen dargestellt werden konnten. Um nun die exakten Werte der einzelnen Spitzen insbesondere für Welle I und IV zu bestimmen, wurden die Minima und Maxima manuell bei einer konstanten Intensität ausgewählt (Abbildung 10 A) und deren Position anschließend vom PEAK-Programm für alle anderen SPL übernommen (Abbildung 10 B). Ebenso konnte bei vom Programm fehlplatzierten Spitzen manuell eine Korrektur vorgenommen werden, während zu kleine Spitzen vom PEAK-Programm nicht akzeptiert wurden. Die berechneten Werte wurden automatisch in einer Excel-Datei gespeichert.

Die vom PEAK-Programm generierten Daten wurden in Excel (Microsoft Excel Windows 2016, Rüttiger, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland) mit dem Vorlagen-Datensortierer (Microsoft Excel Windows 2016, Rüttiger, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland) sortiert und die positiven und negativen Spitzen mit der Spitzen-Evaluierungsvorlage (Microsoft Excel Windows 2016, Rüttiger, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland) beurteilt. Nur Spitzen, die groß genug und in der richtigen Zeit-Position waren, wurden als valide bewertet. Diese validen Daten wurden in die Vorlage für Spitzen-Amplituden (individuell angefertigt, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) kopiert. Sie wurden in einem Graphen dargestellt, der die positiven und negativen Spitzen mit korrigierter Amplitude und Zeit in Bezug zu den ABR-Messungen zeigt. Manuell wurden dann die positiven und negativen Spitzen von Welle I und Welle IV geordnet. Schließlich konnten Welle I- und Welle IV-Wachstumsfunktionen vor und nach Behandlung verglichen werden.

Die Daten werden schwellennormiert gezeigt und die Statistik wurde auch entsprechend angefertigt, da nach Vergleich der Hörschwellen die Kurven und ihre Steilheit von Interesse waren. In nicht-schwellennormierten Vergleichen würden die Effekte stets von den unterschiedlichen Schwellen abhängen. Würde man beispielsweise ABR-Wachstumsfunktionen wie in Abbildung 14 miteinander vergleichen aber nicht schwellennormieren, so würde die Kurve der Gruppe mit der niedrigeren Hörschwelle bereits bei niedrigeren Stimulusintensitäten

ansteigen als die Kurve der anderen Gruppe. Dadurch würden sich die beiden Kurven bei derselben Stimulusintensität stets an unterschiedlichen Zeitpunkten ihres Verlaufs befinden und ein direkter Vergleich etwa der Steilheit wäre nicht gegeben.

2.1.5 ASSR-Messungen an Mausmutanten

Dauerantworten auf Hörreize (Auditory steady-state responses = ASSR) sind elektrophysiologische Antworten, die durch periodisch wiederholte auditorische Stimuli evoziert wurden (Lee et al., 2022), wobei die Antworten zeitlich stabil sind. Die ASSR-Signale reflektieren dabei die Aktivität von Neuronen im Hirnstamm, im auditorischen Cortex und thalamocorticale Projektionen (Li et al., 2021). Sie dienen der Überprüfung der zeitlichen Auflösungsleistung und der Integrität der Hörbahn und des Cortex (Kuwada et al., 2002). Dabei werden ASSR typischerweise durch amplituden- oder frequenzmodulierte Töne evoziert (Liu et al., 2019), indem eine Trägerfrequenz von einer zweiten langsameren Frequenz moduliert wird (Lins et al., 1996).

Im Anschluss an die frequenzspezifische ABR-Messung wurde die Amplitudenmodulation am Ohr mit der besseren Hörschwelle untersucht. Da hierbei eine Trägerfrequenz von 11,3 kHz 40 dB oberhalb der Hörschwelle verwendet wurde, musste zuvor die Hörschwelle bei dieser Frequenz exakt bestimmt werden. Hierzu wurde eine ABR-Messung bei 11,3 kHz in 2 dB-Schritten durchgeführt. Anschließend wurden die sinusförmigen Stimuli amplitudenmoduliert bei 100 % zwischen 64 und 2048 Hz in Halb-Oktav-Schritten präsentiert. Für die Wachstumsfunktion wurde die Stimulationsintensität von 0 dB über Schwelle bis 60 dB über Schwelle variiert bei einer konstanten Modulationstiefe von 100 % und einer Modulationsfrequenz von 512 Hz. Ein Modulationskontrast für individuelle Tiere wurde berechnet, indem das Verhältnis von maximalem Signal und Grundlinie (Mittelwert aller Punkte außer dem Maximum und benachbarter Punkte) ermittelt wurde. Bei einer Modulationsfrequenz von 512 Hz wurden Antworten auf Modulationstiefen von 100 %, 71 %, 50 %, 35 %, 25 %, 18 %, 12 %, 8,8 %, 6,2 %, 4,4 %, 3,1 %, 2,2 %, 1,5 %, 1,1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0005 %, 0,0003 %, 0,0002 %, 0,0001 %, 0,00005 %, 0,00003 %, 0,00002 %, 0,00001 %.

1,6 %, 1,1 % und 0 % (unmoduliert) gemessen. Hörschwellen der Antworten auf modulierte Stimuli wurden definiert als die niedrigste Modulationstiefe, bei der das Signal das 85 %-Konfidenzintervall des Noise-Levels überstieg. Insgesamt wurden also die Modulationstiefe, die Intensität und die Modulationsfrequenz variiert.

2.2 Pharmakologische Behandlung mit PDE9a-Hemmer

Für 10 ml PDE9a-Hemmer wurden 3 mg BAY 73-6691 in 500 µl pharmazeutischem Ethanol gelöst. Anschließend wurden 9,5 ml 10 % Solutol (10 g Solutol + 90 µl doppelt destilliertes Wasser) hinzugefügt und gemischt.

Für die Kontrollsubstanz (Vehikel) wurden lediglich 500 µl pharmazeutischen Ethanols mit 9,5 ml 10 % Solutol gemischt.

Zur Substanzapplikation wurde die Substanz an zehn aufeinander folgenden Tagen abwechselnd in den linken oder rechten unteren Quadranten des Abdomens mit einer Konzentration von 10 ml x 3 mg/kg KG i.p. injiziert.

2.3 LTP-Messungen an hippocampalen Hirnschnitten

Um die zentralen Effekte der GR-Deletion und der Behandlungen auch auf Prozesse abseits des Gehörs und kognitive Veränderungen in anderen Hirnarealen als der direkt in der Hörbahn involvierten zu untersuchen, wurden LTP-Messungen im Hippocampus durchgeführt. Zudem konnte mit LTP-Messungen im Hippocampus das Konzept der NVK, also der engen Beziehung zwischen lokaler neuronaler Aktivität und darauffolgenden Veränderungen im zerebralen Blutfluss, untersucht werden.

2.3.1 Herstellung der hippocampalen Hirnschnitte

Das Tier wurde in seinem Heimkäfig mit CO₂ getötet, wobei das Gas mindestens bis 10 Sekunden nach der letzten sichtbaren Atemexkursion einströmte und auch der Zwischenzehenreflex ausgefallen war. Anschließend wurde der Kopf mit

einer Schere abgetrennt und die Kopfhaut von posterior nach anterior aufgeschnitten, um den Schädel freizulegen. Muskeln und restliches Gewebe wurden entfernt. Drei kleine Schnitte wurden am posterioren Ende des knöchernen Schädels gesetzt und die Knochensubstanz mit einer Zange von posterior nach anterior entfernt. Zudem wurden die Meningen mit einer Pinzette entfernt. Mit einem Spatel wurde das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel entnommen. Das Hirn wurde unverzüglich in gekühlter artifizierender zerebrospinaler Flüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid oder ACSF-Slice (mM): 127 NaCl, 1,9 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 2 MgSO₄ und 1,1 CaCl₂, konstant mit 5 % CO₂ und 95 % O₂ bei pH 7,4) aufbewahrt.

Anschließend wurde das Gehirn zu einem Vibratom (Leica VT 1000S Wetzlar, Deutschland) gebracht. Nach Entfernung des Cerebellums per Skalpell wurde das restliche Gehirn per Gewebekleber auf einem Vibratom-Träger fixiert und erneut in ACSF Slice und Eis aufbewahrt und über einen Schlauch mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) versorgt.

Nachdem die Grundstellung des Vibratoms circa in Höhe des Hippocampus eingestellt wurde, erfolgte der schichtweise Schneidevorgang bei einer Schnittdicke von 400 µm. Die dabei angefertigten Schnitte vom Hippocampus wurden anschließend in der Mitte halbiert, sodass pro Hirn bis zu acht Schnitte mit 16 Hälften mit Anteilen vom Hippocampus hergestellt wurden. Die Schnitte wurden nach Halbierung in oxygeniertem ACSF Store (in mM: 127 NaCl, 1,9 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 1 MgSO₄, 2,2 CaCl₂; pH 7,4) gelagert. Parallel zur Lagerung der bisherigen Schnitte wurden die nächsten Schnitte hergestellt. Nach Herstellung aller hippocampalen Schnitte erfolgte die Lagerung im Wasserbad für 1 h bei 30 °C und anschließend bei Raumtemperatur die Messung in einer Messkammer (Warner Instruments, Holliston, USA).

2.3.2 Erzeugung der LTP in hippocampalen Hirnschnitten bei Mausmutanten

Exzitatorische postsynaptische Feldpotenziale (field excitatory postsynaptic potentials = f-EPSP) sind elektrische Potenziale, die durch neuronale Erregung

extrazellulär abgeleitet werden und beispielsweise über die Stimulation afferenter Fasern die Aktivierung von Neuronen anzeigen können (Batallán Burrowes et al., 2021). Sie entstehen durch Ionenströme, die durch die Zellmembran des Neurons fließen (Kratzer et al., 2013). Die primäre synaptische Aktivierung der abgeleiteten Neurone zeigt sich durch eine initiale negative Auslenkung im monosynaptisch evozierten Feldpotenzial (Amer et al., 2021).

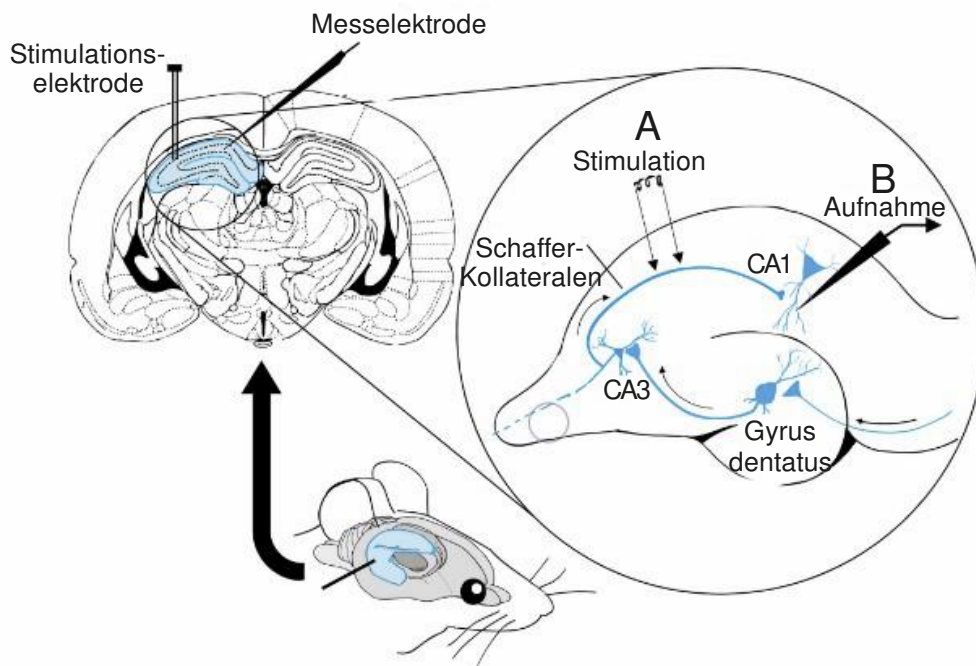


Abbildung 11: Schematische Darstellung der LTP-Messung. Abgebildet sind auch die Position von Stimulations- (A) und Messelektrode (B). Beide wurden im Stratum radiatum positioniert, um fEPSP der Schaffer-Kollateralen zu messen (adaptiert von Hosseini et al., 2021). LTP = long-term potentiation (Langzeitpotenzierung); fEPSP = field excitatory postsynaptic potential (exzitatorisches postsynaptisches Feldpotenzial).

Bei den Messungen in der Messkammer wurden die Stimulations- (TM53CCINS, WPI) (Abbildung 11 A) und die Messelektrode (Silberdraht in ACSF-gefüllter Glaspipette, 2-3 M Ω) (Abbildung 11 B) im Stratum radiatum positioniert, um an der Schaffer-Kollateralen fEPSP zu messen. Signale wurden mit einem Axopatch 200B (Molecular Devices, San Jose, USA) amplifiziert, bei 5 kHz mit einer Datenerfassungs-Schnittstelle (ITC-16, HEKA, London, England) digitalisiert und mit WinWCP von Strathclyde Electrophysiology Suite gemessen. Stimuli (100 μ s) wurden über einen Stimulus Isolator (TM53CCINS, WPI,

Sarasota, USA) abgegeben, wobei für jeden Schnitt die Stimulations-Intensität (regulär zwischen 30-125 μA) so gewählt wurde, dass 40-60 % der maximalen Antwort gemessen an der initialen fEPSP-Kurve evoziert wurden. Dabei wurden nur Hirnschnitte mit stabilen fEPSP zur Messung verwendet. Dieselbe Stimulus-Intensität wurde während Baseline-Messungen (0,067 Hz, 15 Minuten) und der Induktion von Langzeitpotenzierung (LTP) durch 100 Stimuli bei einer Frequenz von 100 Hz (1s) verwendet. Die Baseline wurde über den Mittelwert der initialen fEPSP Kurven vor der tetanischen Stimulation zur LTP-Induktion bestimmt (mindestens 15 Minuten lang stabile Mess-Signale). Die LTP wurde über den Mittelwert der fEPSP Kurven während der Periode zwischen 50 und 60 Minuten nach der Hochfrequenzstimulation bestimmt.

Zur Auswertung der LTP-Messungen wurden die Daten mit WinWCP V5.5.5, Clampfit 10.7 (Molecular Devices) und Microsoft Excel analysiert.

2.4 Statistische Auswertung

Hinsichtlich der statistischen Auswertung der Hörmessungen wurden die verschiedenen Gruppen mit einem ungepaarten t-Test oder einer 2-way ANOVA (GraphPad Prism 9) verglichen. Dabei wurden stets die verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander verglichen, beziehungsweise zur Untersuchung des Knockout-Effekts die beiden Genotypen. Ein ungepaarter t-Test wurde beim Vergleich der maximalen Amplituden im DP-gram (Abbildung 12 A) und zur statistischen Auswertung der Hörschwellen bei Click- und Noise-Stimulus (Abbildung 13 A und B) verwendet. Bei allen anderen Hörmessungen mit den Messgrößen Signalamplituden oder -latenzen wurden die Stimulusintensitäten oder -frequenzen variiert, sodass eine 2-way-ANOVA verwendet wurde. Der Post-hoc-Test für die ANOVA war der Holm-Sidak multiple comparison Test. Statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von 5% getestet.

Statistisch wurden bei den LTP-Messungen die verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney U Test oder einer One-way ANOVA (GraphPad Prism 9) verglichen. Für den Mann-Whitney U Test wurden als Faktoren die Genotypen,

also WT und GR cKO, und die Mittelwerte der Signalamplituden der letzten 10 Minuten der Messung verwendet. Für die One-way ANOVA wurden als Faktoren ebenfalls die verschiedenen Behandlungsgruppen, also WT oder GR cKO mit Vehikel-Behandlung oder PDE9a-Hemmer-Behandlung, sowie die Mittelwerte der Signalamplituden in den letzten 10 Minuten der Messungen verwendet. Der Post-hoc-Test für die One-way ANOVA war der Holm-Sidak multiple comparison Test. Statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von 5% getestet. Von einem statistischen Trend ((*)) sprach man für $0,05 < p < 0,08$.

3 Ergebnisse

3.1 GR cKO weisen im Vergleich zu WT keine veränderten Hörschwellen, jedoch gesteigerte und beschleunigte ABR-Antworten auf

Im ersten Unterabschnitt des Ergebnisteils werden die Hörfunktionen der GR cKO und WT vor den Behandlungen mit Vehikel oder PDE9a-Hemmer miteinander verglichen, um den Effekt des GR KO zu untersuchen.

3.1.1 GR cKO weisen keine Unterschiede in den DPOAE-Messungen im Vergleich zu WT auf

DPOAE-Signale wurden wie in *Material und Methoden* beschrieben zur Überprüfung der Funktion der ÄHZ gemessen. Dabei ergaben sich die maximalen DPOAE-Amplituden bei einer konstanten Intensität $L_1 = 50$ dB SPL und lagen bei Frequenzen f_2 im Bereich von 9,5 kHz bis 13,4 kHz und am häufigsten bei $f_2 = 11,3$ kHz vor (DP-gram). Die DPOAE-Hörschwellen wurden für f_2 im Bereich von 4 kHz bis 32 kHz mit L_1 von -5 dB SPL bis 65 dB SPL untersucht und die Wachstumsfunktion für $f_2 = 11,3$ kHz mit Intensitäten L_1 von 20 dB SPL bis 75 dB SPL abgebildet. Unterhalb von $L_1 = 20$ dB SPL zeigten sich nur Rauschsignale, weshalb dieser Bereich hier nicht abgebildet wurde.

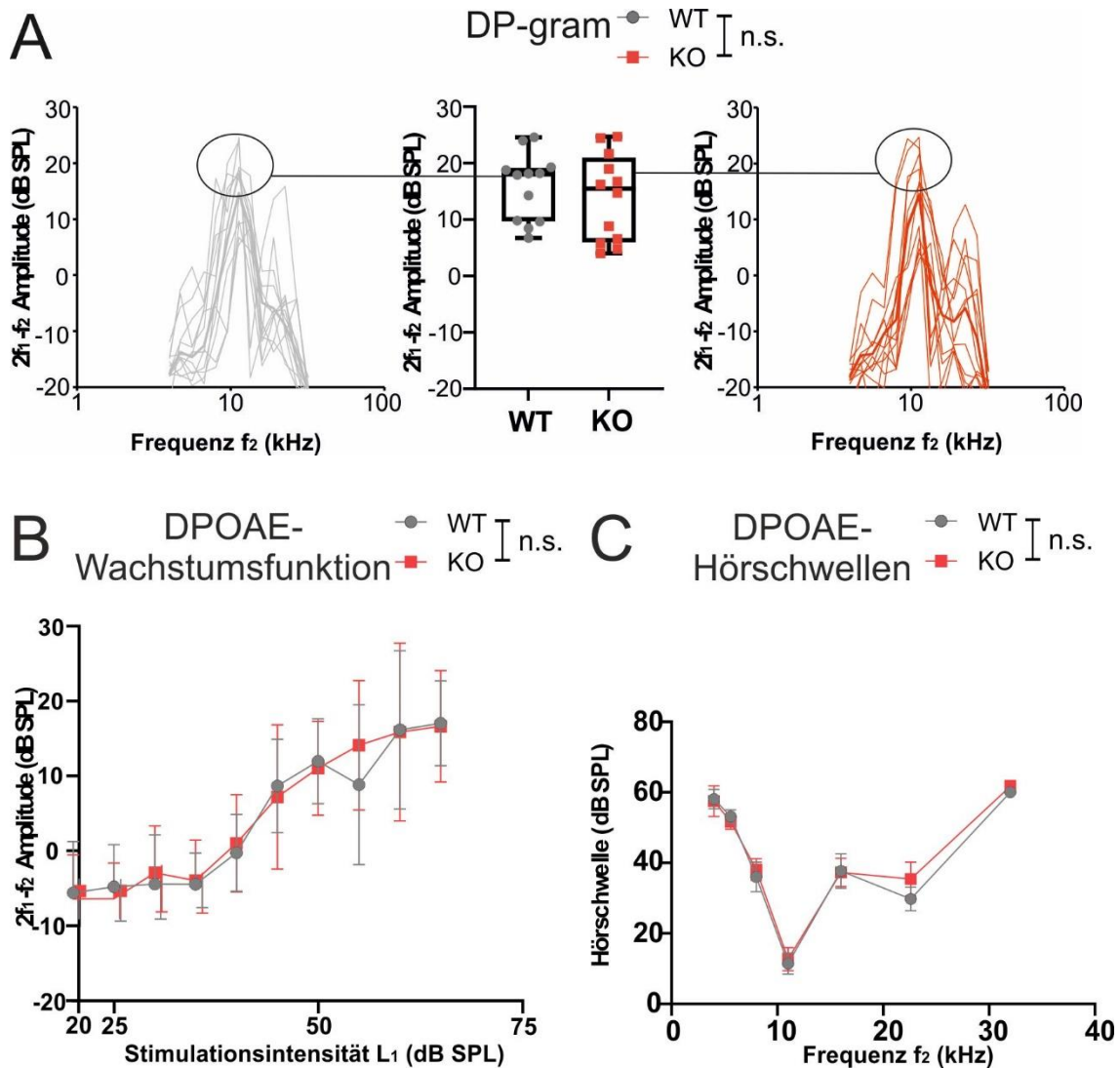


Abbildung 12: Maximale DPOAE-Amplituden im DP-gram, DPOAE-Wachstumsfunktion und DPOAE-Hörschwellen in WT und GR cKO. Maximale $2f_1$ - f_2 -Amplitude im DP-gram (A), die DPOAE-Amplituden bei $f_2 = 11,3$ kHz (B) und die DPOAE-Hörschwellen (C). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und GR cKO. Abbildung A zeigt im Boxplot die höchsten Messwerte im DP-gram für jedes einzelne Ohr und daneben die Messkurven der einzelnen Ohren. Schwarz = WT; rot = GR cKO. $p > 0,05$ ($n = 6$ Tiere / 12 Ohren). Abbildung B und C zeigen die gemittelten Werte aller WT und GR cKO in der Wachstumsfunktion bei $f_2 = 11,3$ kHz beziehungsweise bei den DPOAE-Hörschwellen. WT in grau, GR cKO in rot. Fehlerbalken repräsentieren den SEM; $p > 0,05$ ($n = 3$ Tiere / 6 Ohren).

Es konnte kein Effekt des Genotyps auf die maximale $2f_1$ - f_2 -Amplitude (Abbildung 12 A; ungepaarter t-Test; $t(22) = 0,66$; $p = 0,52$), die DPOAE-Amplituden bei $f_2 = 11,3$ kHz (Abbildung 12 B; 2-way ANOVA; $F(1, 330) = 0,12$; $p = 0,73$) und die DPOAE-Hörschwellen (Abbildung 12 C; 2-way ANOVA; $F(1, 114) = 0,20$; $p = 0,65$) festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in GR cKO kein Effekt des Genotyps auf die DPOAE-Messergebnisse und damit auf die Funktion der ÄHZ festgestellt werden.

3.1.2 GR cKO weisen keine Unterschiede in den ABR-Schwellen im Vergleich zu WT auf

Bei 16 WT und 14 GR cKO wurden die ABR-Schwellen der Click- und Noise-ABR-Messungen sowie der frequenzspezifischen ABR-Messungen (f-ABR) zur Überprüfung der Hörschwelle ermittelt.

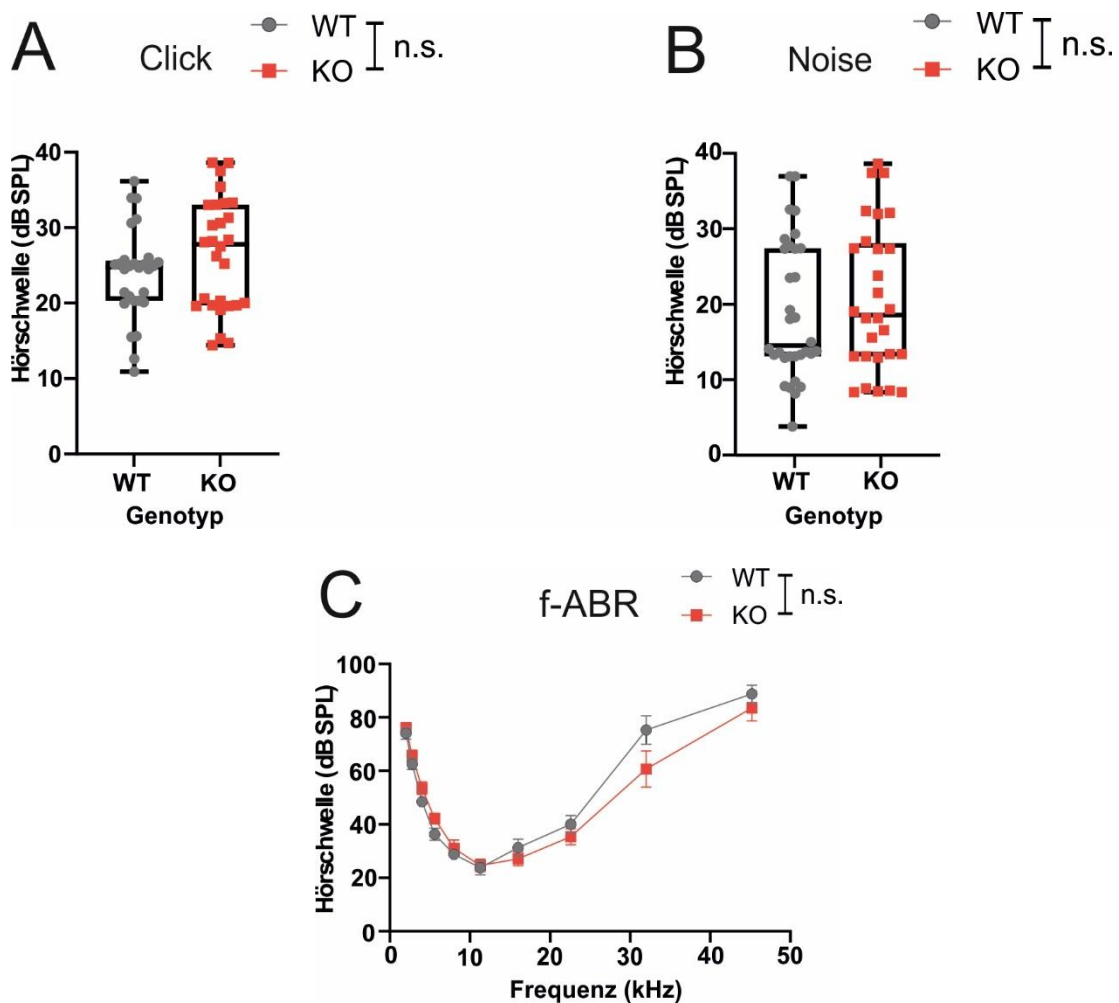


Abbildung 13: ABR-Schwellen in WT und GR cKO. Hörschwellen für Click- (A), Noise- (B) und f-ABR (C). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und GR cKO. WT in schwarz, GR cKO in rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM; $p > 0,05$ ($n = 16$ Tiere / 32 Ohren für WT und 14 Tiere / 28 Ohren für GR cKO).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Hörschwellen der WT und GR cKO für Click-Stimuli (Abbildung 13 A; ungepaarter t-Test; $t(58) = 0,84$; $p = 0,40$), Noise-Stimuli (Abbildung 13 B; ungepaarter t-Test; $t(58) = 0,72$; $p = 0,47$) und teils tendenziell niedrigere Schwellen der GR cKO in der f-ABR gefunden werden, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abbildung 13 C, 2-way ANOVA; $F(1, 276) = 0,40$; $p = 0,53$).

Zusammenfassend konnten keine Effekte der konditionalen zentralen GR-Deletion auf die Hörschwellen in den ABR-Messungen festgestellt werden. Dies bestätigt die DPOAE-Ergebnisse, die keinen Effekt der konditionalen zentralen GR-Deletion auf die Funktion der ÄHZ zeigten.

3.1.3 GR cKO zeigen sowohl peripher als auch zentral erhöhte ABR-Wellen-Amplituden im Vergleich zu WT

Nachdem die ABR-Schwellen bei den Mausmutanten untersucht wurden, wurden als nächstes die elektrischen Antworten der auditorischen Nervenfasern in ABR-Welle I sowie des Lemniscus lateralis und Colliculus inferior in ABR-Welle IV untersucht. Hierbei wurden ABR-Welle I- und IV-Amplituden von WT und GR cKO miteinander verglichen.

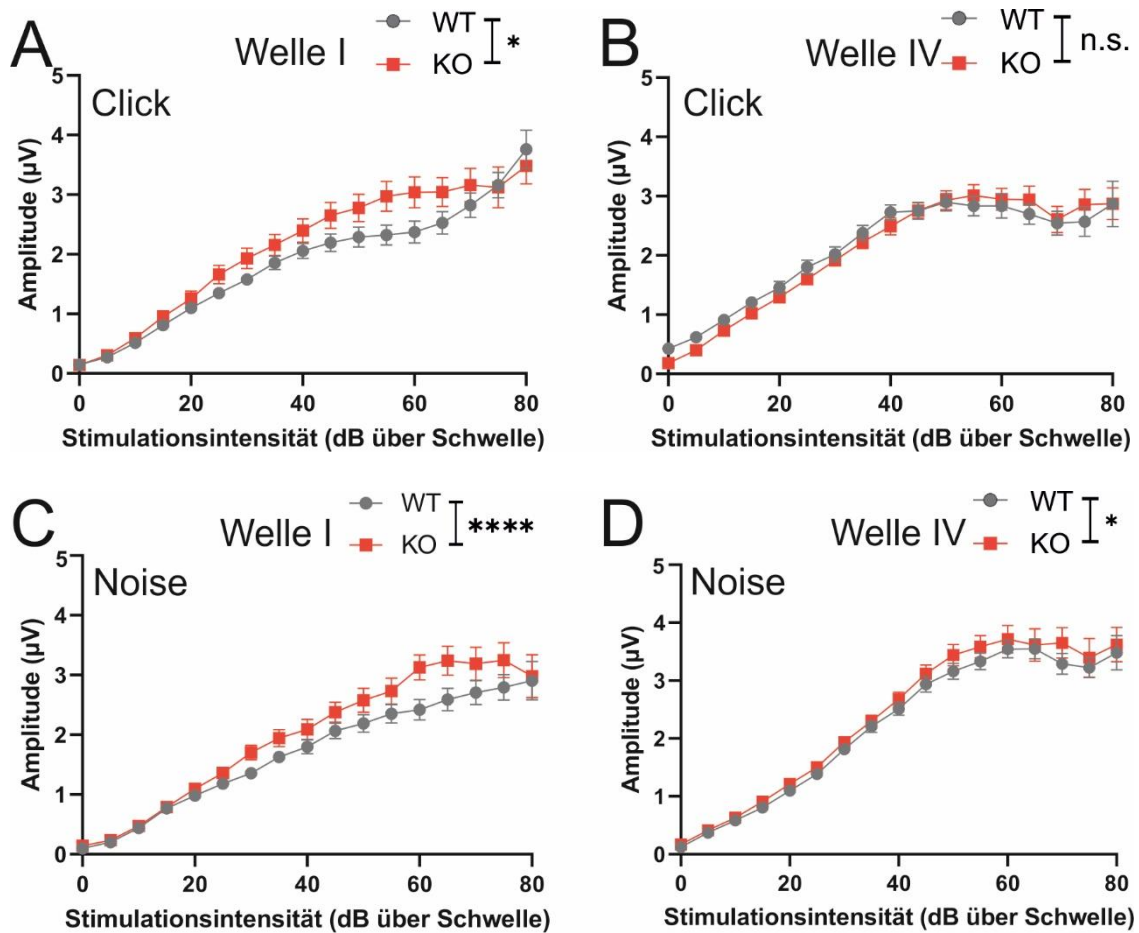


Abbildung 14: ABR-Wellen-Amplituden in Welle I und IV von WT und GR cKO bei Click- und Noise-Stimuli. Amplituden bei Click-Stimuli in ABR-Welle I (A) und IV (B) und bei Noise-Stimuli in Welle I (C) und IV (D). Bei Click-Stimulus zeigten sich in ABR-Welle I für GR cKO signifikant größere Amplituden sowie bei Noise-Stimulus sowohl in Welle I als auch in Welle IV. WT in schwarz, GR cKO in rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ ($n = 16$ Tiere / 32 Ohren für WT und 14 Tiere / 28 Ohren für GR cKO).

Die GR cKO zeigten signifikant größere ABR-Wellen-Amplituden in Welle I bei Click-Stimulus (Abbildung 14 A; 2-way ANOVA; $F(1, 857) = 6,53$; $p = 0,011$), nicht jedoch in Welle IV (Abbildung 14 B, 2-way ANOVA; $F(1, 817) = 0,57$; $p = 0,45$). Auch bei Noise-Stimulus zeigten sich signifikant höhere Amplituden in ABR-Welle I der GR cKO (Abbildung 14 C; 2-way ANOVA; $F(1, 871) = 22,00$; $p < 0,0001$). In Welle IV waren auch bei Noise-Stimulus (Abbildung 14 D, 2-way ANOVA; $F(1, 836) = 5,27$; $p = 0,02$) signifikant größere ABR-Wellen-Amplituden in GR cKO messbar.

Zusammenfassend sah man trotz ausschließlich zentraler Deletion des GR periphere Effekte in Form von signifikant größeren Amplituden in der ABR-Welle I. In Welle IV sah man diese größeren Amplituden ebenfalls bei Noise-Stimulus.

3.1.4 GR cKO zeigen peripher verkürzte ABR-Wellen-Latenzen im Vergleich zu WT

Es wurden die Latenzen der ABR-Wellen I und IV von WT und GR cKO miteinander verglichen.

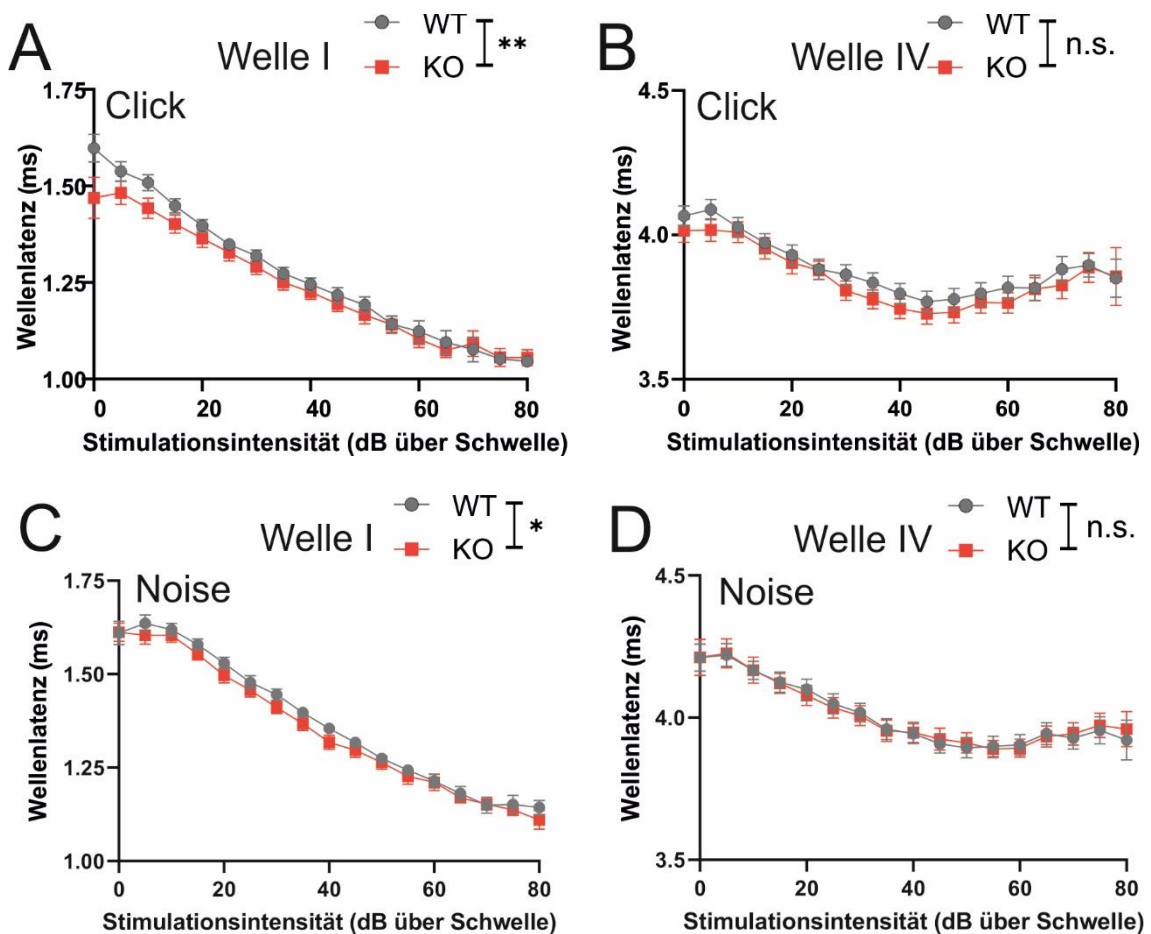


Abbildung 15: ABR-Wellen-Latenzen in Welle I und IV von WT und GR cKO bei Click- und Noise-Stimuli. Latenzen bei Click-Stimuli in ABR-Welle I (A) und IV (B) und bei Noise-Stimuli in Welle I (C) und IV (D). Sowohl bei Click- als auch bei Noise-Stimulus zeigten GR cKO signifikant kürzere Latenzen in ABR-Welle I. WT in schwarz, GR cKO in rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n = 16$ Tiere / 32 Ohren für WT und 14 Tiere / 28 Ohren für GR cKO).

Die Latenz der ABR-Welle I war in der Click-Messung bei den GR cKO im Vergleich zu den WT signifikant kürzer (Abbildung 15 A; 2-way ANOVA; $F(1, 890) = 8,38$; $p = 0,004$), während in Welle IV für Click-Stimuli keine signifikanten Unterschiede zwischen GR cKO und WT gefunden wurden (Abbildung 15 B; 2-way ANOVA; $F(1, 895) = 0,70$; $p = 0,35$). Für Noise-Stimuli zeigte sich ebenfalls in Welle I eine kürzere Latenz bei den GR cKO im Vergleich zu WT (Abbildung 15 C; 2-way ANOVA; $F(1, 908) = 6,47$; $p = 0,01$), während sich in Welle IV keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ergaben (Abbildung 15 D; 2-way ANOVA; $F(1, 903) = 0,57$; $p = 0,95$).

Zusammenfassend sah man trotz ausschließlich zentraler Deletion des GR periphere Effekte in Form einer kürzeren Latenz in der ABR-Welle I. In Welle IV sah man keine signifikanten Unterschiede.

3.1.5 GR cKO weisen bei hohen Intensitäten in der Wachstumsfunktion der ASSR-Messung erhöhte Signale im Vergleich zu WT auf

Als weitere Messmethode zur Überprüfung der Hörfunktion wurden ASSR-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde die Modulationstiefe, -frequenz und -intensität variiert. Die Messdaten der WT wurden schließlich mit denen der GR cKO verglichen.

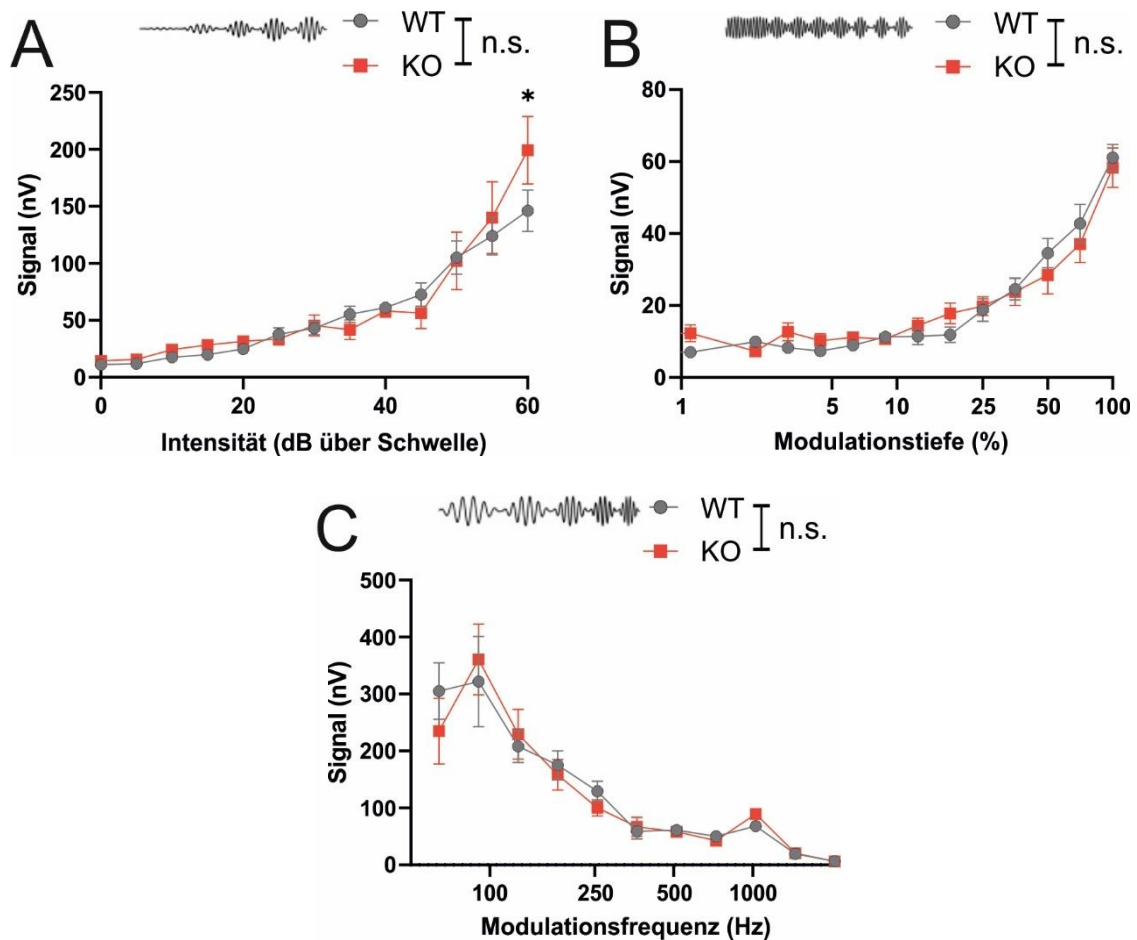


Abbildung 16: ASSR-Messungen in WT und GR cKO. ASSR-Signale bei Variation der Modulationsintensität (A), der Modulationstiefe (B) und der Modulationsfrequenz (C). Bei Variation der Modulationsintensität zeigten sich bei 60 dB über Schwelle signifikant größere Signalamplituden bei den GR cKO. WT in schwarz, GR cKO in rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM; * $p < 0,05$ ($n = 6$ Tiere / 6 Ohren für WT und 5 Tiere / 5 Ohren für GR cKO).

GR cKO wiesen im Vergleich zu WT bei einer Intensität von 60 dB über der Hörschwelle in der Wachstumsfunktion ein größeres Signal auf, was im Post-hoc-Test statistisch signifikant war (Abbildung 16 A; 2-way ANOVA; $F(1, 370) = 1,47$; $p = 0,23$; Holm-Sidak multiple comparison Test bei 60 dB über der Hörschwelle $p = 0,004$). Bei Veränderung der Modulationstiefe (Abbildung 16 B; 2-way ANOVA; $F(1, 322) = 0,19$; $p = 0,67$) oder -frequenz (Abbildung 16 C; 2-way ANOVA; $F(1, 264) = 0,08$; $p = 0,78$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Signalamplitude. In den ASSR-Messungen fand man keine Unterschiede zwischen WT und GR cKO außer bei hohen Pegeln in der Wachstumsfunktion. Entsprechend konnten lediglich Hinweise auf größere Signalstärken der GR cKO im Vergleich zu WT gefunden werden.

Zusammenfassend gab es bei den DPOAE-Hörschwellen und -amplituden, ABR-Schwellen sowie Latenzen in ABR-Welle IV keine signifikanten Unterschiede zwischen GR cKO und WT. Bei GR cKO war die Latenz der ABR-Welle I kürzer und die Amplitude der ABR-Welle I höher als bei WT, sodass Effekte der Deletion auf die auditorische Peripherie beobachtet wurden. In der Wachstumsfunktion der ASSR-Messungen zeigten sich nur bei hohen Pegeln größere Signale der GR cKO.

3.2 PDE9a-Hemmer verhindern negative zentrale und periphere Effekte bei WT und GR cKO verglichen mit Vehikel

Da sich sowohl bei den WT als auch GR cKO bereits vor Behandlung die mit Vehikelsubstanz und mit PDE9a-Hemmer zu behandelnden Versuchstiere stark in ihren Messwerten unterschieden, wurden zu einer besseren Interpretation der Ergebnisse die Differenzen zwischen den Werten vor und nach den jeweiligen Behandlungen berechnet, welche im Ergebnisteil als Delta-Werte bezeichnet werden. Im nachfolgenden Ergebnisteil beziehen sich Abbildungen und Statistiken auf den Vergleich der Differenzen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen.

3.2.1 PDE9a-Hemmer verhindern eine Senkung der DPOAE-Amplituden in der Wachstumsfunktion bei GR cKO verglichen mit Vehikel

In Abbildung 17 sind die Delta-Werte der Amplituden im DP-gram, der DPOAE-Wachstumsfunktion bei 11,3 kHz und der DPOAE-Hörschwellen für WT und GR cKO abgebildet, wobei die Vehikel-Behandlung mit der PDE9a-Hemmer-Behandlung verglichen wird. Dabei entsprechen negative Deltawerte der Amplituden in den Abbildungen 17 A, B und C einer Verschlechterung der Hörleistung, während negative Deltawerte in den Abbildungen 17 D und E einer niedrigeren und damit besseren Hörschwelle entsprechen.

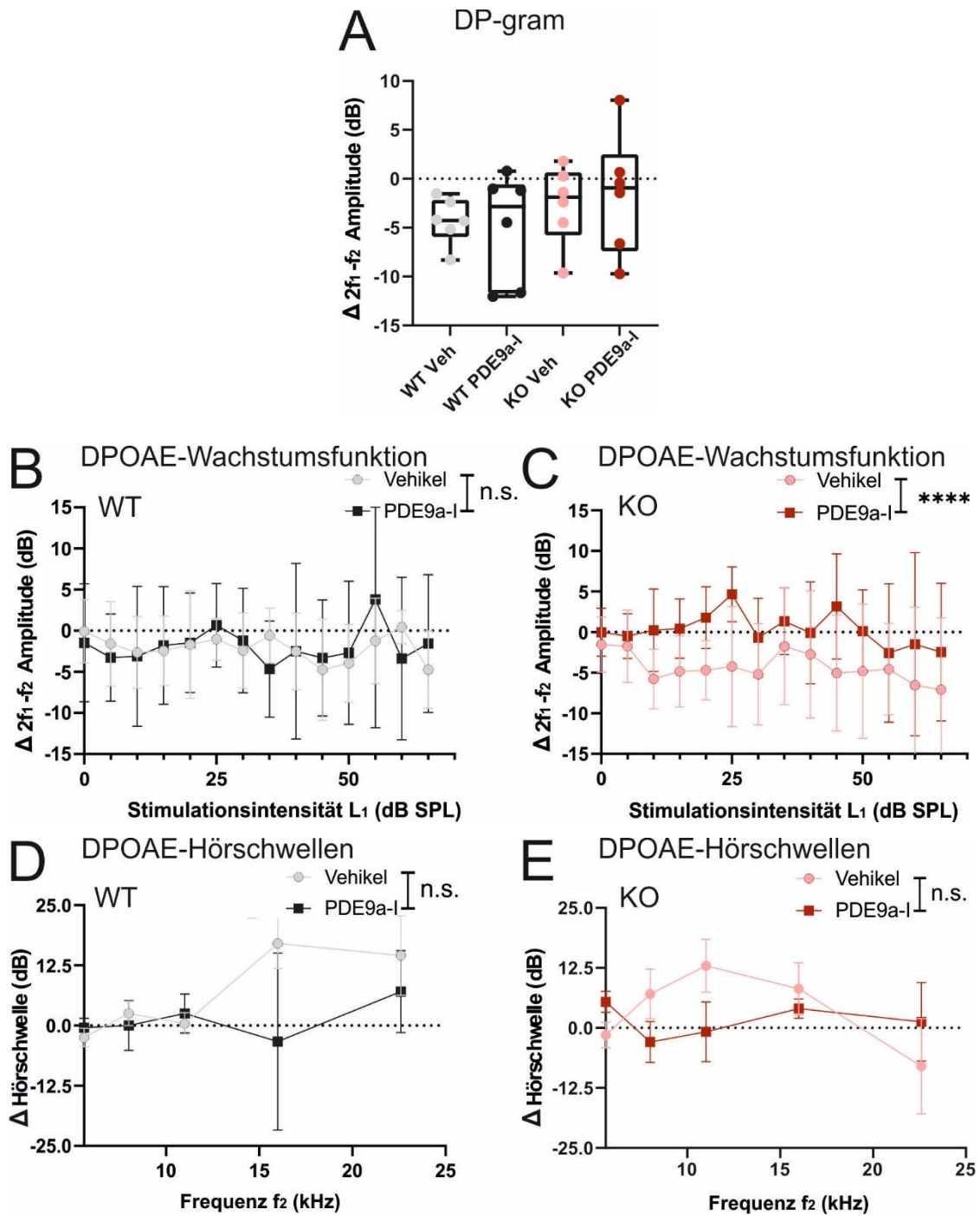


Abbildung 17: Veränderungen der maximalen DPOAE-Amplituden im DP-gram, der DPOAE-Wachstumsfunktion und der DPOAE-Hörschwellen in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung. Veränderungen der maximalen DP-gram-Amplituden (A), der Amplituden der DPOAE-Wachstumsfunktion bei $f_2 = 11,3$ kHz bei WT (B) und GR cKO (C) und der DPOAE-Hörschwellen bei WT (D) und GR cKO (E). Die Boxplots in Abbildung 17 A zeigen dabei die Veränderungen der maximalen DPOAE-Amplituden nach Behandlung für jedes einzelne Ohr. Bei GR cKO führte die Vehikel-Behandlung in der DPOAE-Wachstumsfunktion zu einer signifikanten Amplitudenreduktion im Vergleich zum PDE9a-Hemmer. WT in grau/schwarz, GR cKO in rosa/rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM; **** $p < 0,0001$ ($n = 3$ Tiere / 6 Ohren).

Weder bei WT (Abbildung 17 A; ungepaarter t-Test; $t = 0,25$; $p = 0,81$), noch bei GR cKO (Abbildung 17 A; ungepaarter t-Test; $t = 0,29$; $p = 0,78$) konnte ein signifikanter Unterschied im Behandlungseffekt zwischen Vehikel- und PDE9a-Hemmer gefunden werden. Alle Gruppen zeigten eine nicht-signifikant verkleinerte Amplitude nach Vehikel- und PDE9a-Hemmer-Behandlung (Abbildung 17 A). In der Wachstumsfunktion unterschieden sich die Effekte der Behandlungen bei $f_2 = 11,3$ kHz nicht (Abbildung 17 B; 2-way ANOVA; $F(1, 150) = 0,07$; $p = 0,79$), während bei GR cKO die Amplitude durch Vehikel im Vergleich zu PDE9a-Hemmer signifikant um bis zu circa 5 dB kleiner wurde (Abbildung 17 C; 2-way ANOVA; $F(1, 150) = 22,57$; $p < 0,0001$). Bei den DPOAE-Hörschwellen zeigten sich weder bei WT (Abbildung 17 D; 2-way ANOVA; $F(1, 46) = 1,90$; $p = 0,17$), noch bei GR cKO (Abbildung 17 E; 2-way ANOVA; $F(1, 43) = 0,44$; $p = 0,51$) statistisch fassbare Unterschiede zwischen der Vehikel- und der PDE9a-Hemmer-Behandlung. Jedoch führte die Vehikel-Behandlung bei WT und GR cKO zu – wenn auch nicht signifikant – höheren DPOAE-Hörschwellen, während bei PDE9a-Hemmer-Behandlung bei beiden Genotypen kaum Veränderungen beobachtet wurden.

Zusammenfassend zeigten sich also keine bedeutsamen Effekte durch PDE9a-Hemmer-Behandlung im Vergleich zur Vehikel-Behandlung bei WT und GR cKO bei den maximalen DPOAE-Amplituden und DPOAE-Hörschwellen. Jedoch fanden sich bei den GR cKO bei der Frequenz $f_2 = 11,3$ kHz signifikant kleinere Amplituden durch die Vehikel-Behandlung im Vergleich zum PDE9a-Hemmer.

3.2.2 PDE9a-Hemmer verhindern eine Verschlechterung der Noise-ABR-Schwellen verglichen mit Vehikel

Bei der hier angewendeten Analyse der ABR-Schwellen entspricht ein negativer Delta-Wert (Post – Pre) einer niedrigeren und damit einer besseren Hörschwelle. Das bedeutet, dass auditorische Reize bereits bei niedrigeren Stimuluspegeln erkannt werden können.

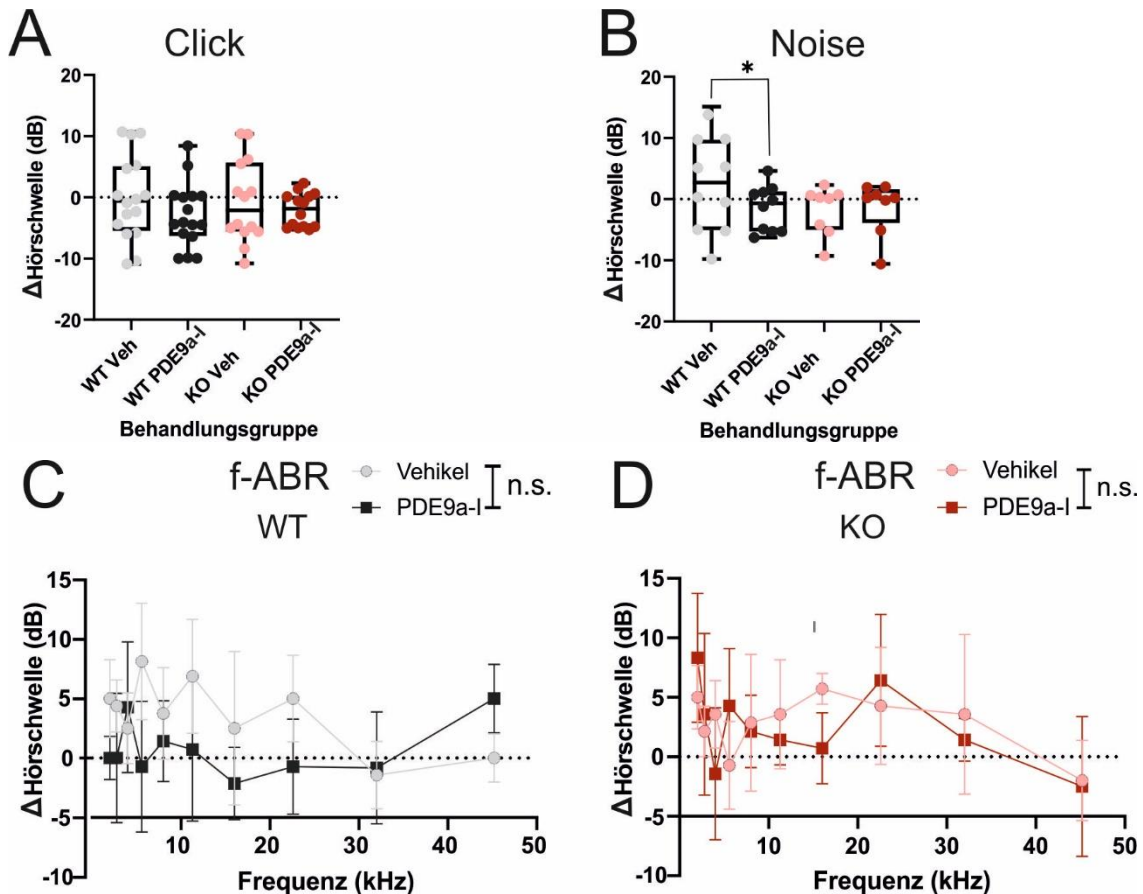


Abbildung 18: Veränderungen der ABR-Schwellen in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung. Veränderungen der Hörschwellen bei Click- (A), Noise- (B) und f-ABR für WT (C) und GR cKO (D). Bei Noise-Stimulus führte die PDE9a-Hemmer-Behandlung bei WT im Vergleich zur Vehikel-Behandlung zu signifikant niedrigeren Hörschwellen. WT in grau/schwarz, GR cKO in rosa/rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM. * $p < 0,05$ ($n = 16$ Tiere / 32 Ohren für WT und 14 Tiere / 28 Ohren für GR cKO).

Bei Click-Stimulus konnte weder für WT (Abbildung 18 A; ungepaarter t-Test; $t(30) = 1,32$; $p = 0,20$), noch für GR cKO (Abbildung 18 A; ungepaarter t-Test; $t(26) = 0,68$; $p = 0,50$) ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Vehikelsubstanz oder PDE9a-Hemmer festgestellt werden, wobei sich insgesamt kleinere Hörschwellen abzeichneten. Mit einem Noise-Stimulus war die Veränderung der Hörschwelle unter PDE9a-Hemmer-Behandlung bei WT signifikant im Vergleich zur Veränderung der Hörschwelle bei Vehikel-Behandlung (Abbildung 18 B; ungepaarter t-Test; $t(30) = 2,52$; $p = 0,017$), was sich bei GR cKO (Abbildung 18 B; ungepaarter t-Test; $t(26) = 1,43$; $p = 0,17$) nicht abzeichnete. In der f-ABR ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen bei WT (Abbildung 18 C; 2-way ANOVA; F

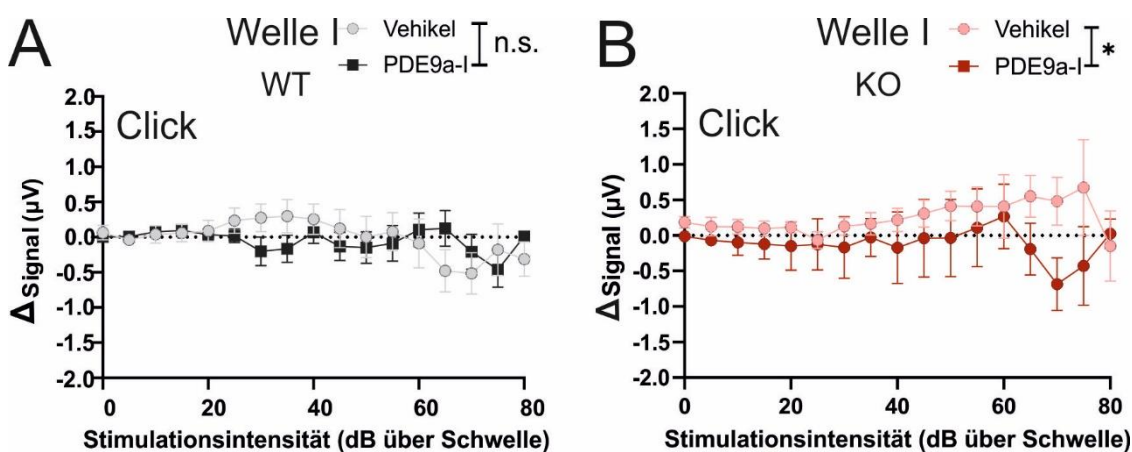
(1, 119) = 2,14; $p = 0,15$) und GR cKO (Abbildung 18 D; 2-way ANOVA; $F(1, 116) = 0,03$; $p = 0,86$).

In der Click-Messung verbesserte sich die Hörschwelle aller Tiere marginal, bei allen Tieren mit PDE9a-Hemmer-Behandlung wurde sie sogar deutlicher gesenkt.

Zusammenfassend führte die Vehikel-Behandlung bei WT mit Noise-Stimuli zu einer Verschlechterung der ABR-Schwellen, nicht jedoch mit Click-Stimuli, während PDE9a-Hemmer-Behandlung zu einer Verbesserung der Hörschwellen führte. Bei GR cKO zeigten sich ähnliche Tendenzen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

3.2.3 PDE9a-Hemmer verhindern negative Effekte auf die ABR-Amplituden von WT und GR cKO verglichen mit Vehikel

Die Messwerte der Amplituden in den ABR-Wellen I und IV zum Messzeitpunkt vor der Behandlung wurden von denen nach der Behandlung subtrahiert und als Delta-Werte in Abbildung 19 illustriert.



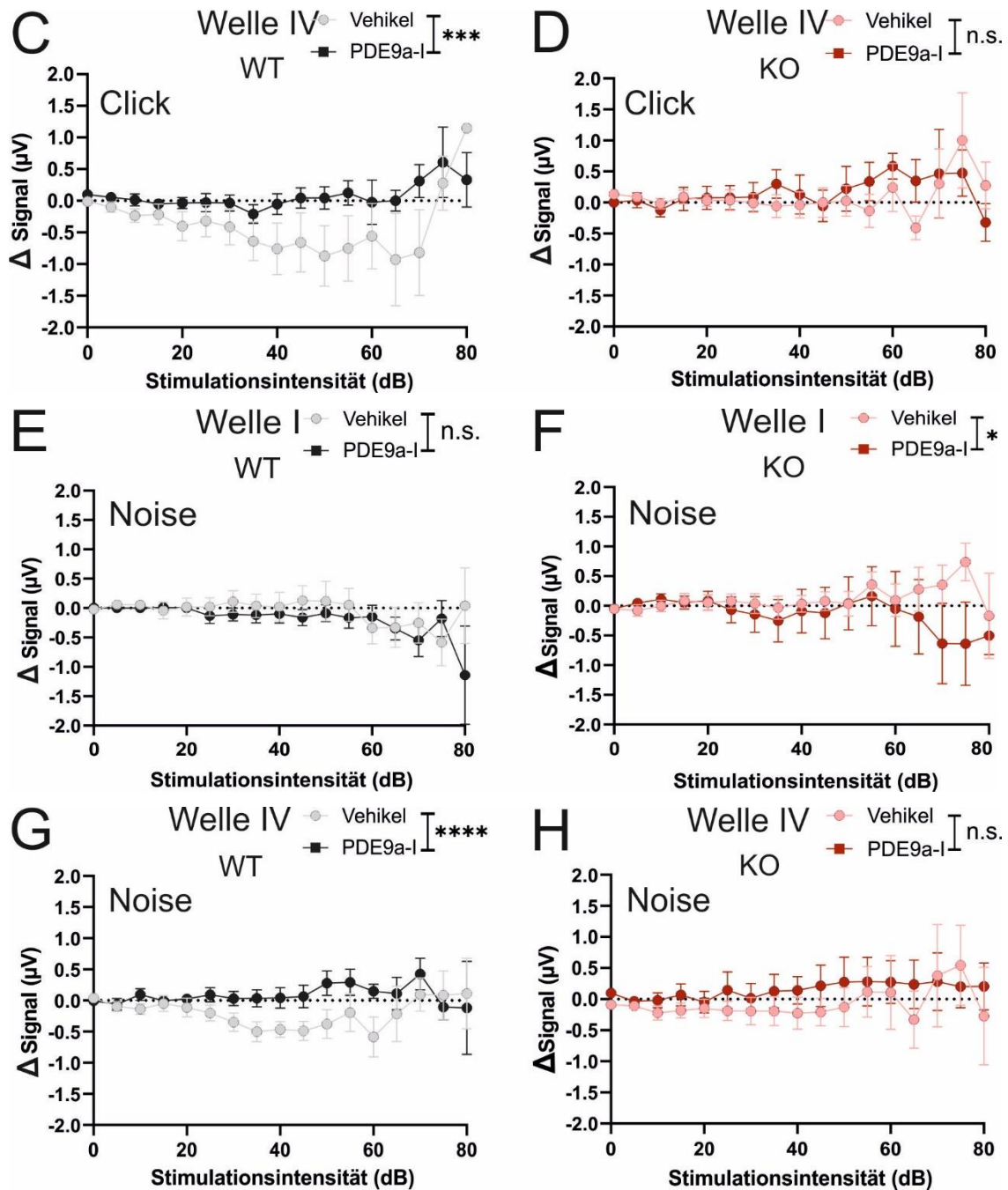


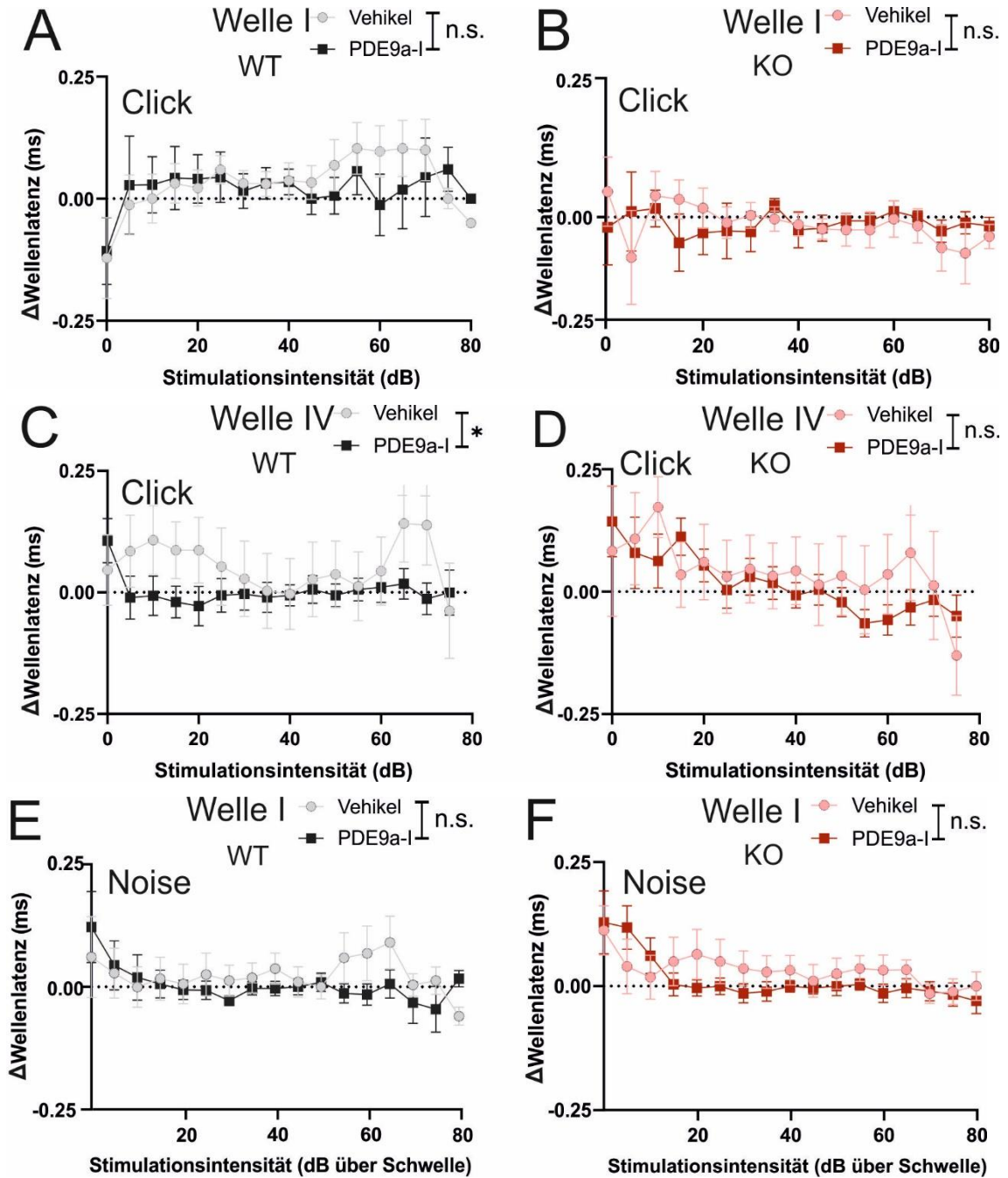
Abbildung 19: Veränderungen der Amplituden in den ABR-Wellen I und IV in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung. Veränderungen der ABR-Amplituden mit Click-Stimulus in Welle I bei WT (A) und GR cKO (B), in Welle IV bei WT (C) und GR cKO (D) und mit Noise-Stimulus in Welle I bei WT (E) und GR cKO (F) und in Welle IV bei WT (G) und GR cKO (H). Bei WT verkleinerte die Vehikel-Behandlung die Welle IV-Amplituden signifikant bei Click- und Noise-Stimulus, während bei GR cKO der PDE9a-Hemmer die behandlungsbedingt größeren Welle I-Amplituden bei Click- und Noise-Stimulus signifikant verkleinerte. WT in grau/schwarz, GR cKO in rosa/rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n = 8$ Tiere / 16 Ohren für WT und 7 Tiere / 14 Ohren für GR cKO).

Die Amplituden der ABR-Welle I bei den WT bei Click-Stimulus mit Vehikel oder PDE9a-Hemmer (Abbildung 19 A; 2-way ANOVA; $F(1, 381) = 0,59$; $p = 0,44$) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bei den GR cKO bewirkte der PDE9a-Hemmer im Vergleich zur Vehikelsubstanz in ABR-Welle I eine signifikante Verkleinerung der durch die Behandlung unspezifisch auftretenden größeren Welle I-Amplitude (siehe Vehikel-Behandlung) bei Click-Stimulus (Abbildung 19 B; 2-way ANOVA; $F(1, 332) = 6,57$; $p = 0,01$). In ABR-Welle IV führte der PDE9a-Hemmer im Vergleich zur Vehikelsubstanz bei den WT zu einer verminderten Verkleinerung und teilweise sogar Erhöhung der Amplitude mit Click-Stimulus (Abbildung 19 C; 2-way ANOVA; $F(1, 391) = 14,14$; $p = 0,0002$), während sich bei den GR cKO bei der Amplitude der ABR-Welle IV mit PDE9a-Hemmer bei Click-Stimulus (Abbildung 19 D; 2-way ANOVA; $F(1, 303) = 0,48$; $p = 0,49$) kein signifikanter Unterschied feststellen ließ. Bei Noise-Stimulus zeigten sich ähnliche Tendenzen wie bei Click-Stimulus. Bei Noise-Stimulus (Abbildung 19 E; 2-way ANOVA; $F(1, 422) = 2,95$; $p = 0,09$) wurden bei den WT die ABR-Welle I-Amplituden durch die Behandlungen kaum unterschiedlich beeinflusst. Auch bei Noise-Stimulus (Abbildung 19 F; 2-way ANOVA; $F(1, 341) = 3,94$; $p = 0,048$) führte die PDE9a-Hemmer-Behandlung zu signifikant kleineren ABR-Welle I-Amplituden im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. Die Amplituden der ABR-Welle IV waren bei WT mit PDE9a-Hemmer-Behandlung ebenfalls signifikant größer (Abbildung 19 G; 2-way ANOVA; $F(1, 375) = 16,01$; $p < 0,0001$). Bei GR cKO zeigten die Behandlungen keine signifikant unterschiedlichen Veränderungen der ABR-Welle IV-Amplitude (Abbildung 19 H; 2-way ANOVA; $F(1, 315) = 3,72$; $p = 0,05$).

Zusammenfassend führte der PDE9a-Hemmer in der Click-Messung zu signifikant kleineren Amplituden der GR cKO in Welle I im Vergleich zur Vehikelsubstanz, während sich bei den WT in Welle I kein signifikanter Effekt beobachten ließ. In Welle IV führte die Vehikelsubstanz zu kleineren Amplituden bei den WT im Vergleich zum PDE9a-Hemmer. Dies zeigte sich auch für Noise-Stimuli.

3.2.4 PDE9a-Hemmer verhindern eine Verlängerung der ABR-Welle IV-Latenz bei WT verglichen mit Vehikel

Die Messwerte der Latenzen in den ABR-Wellen I und IV zum Messzeitpunkt vor der Behandlung wurden von denen nach der Behandlung subtrahiert, um die Delta-Werte zu generieren.



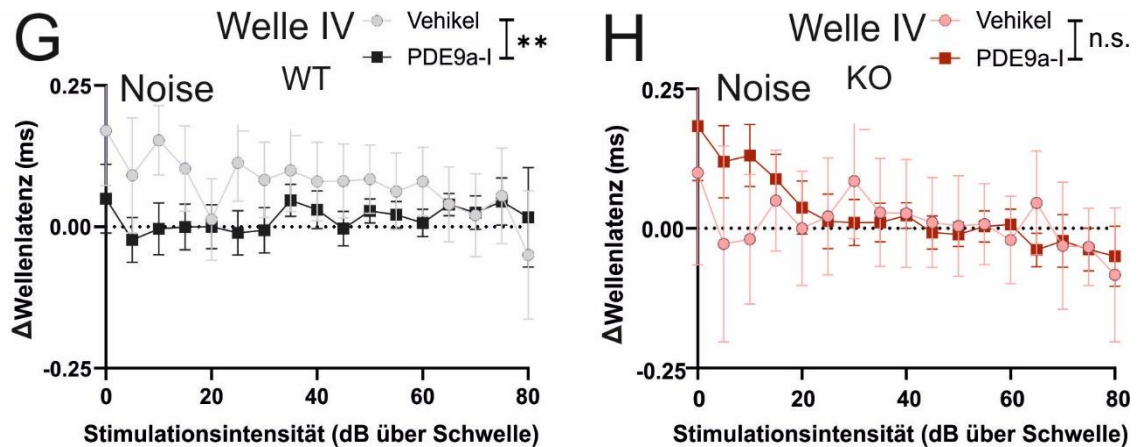


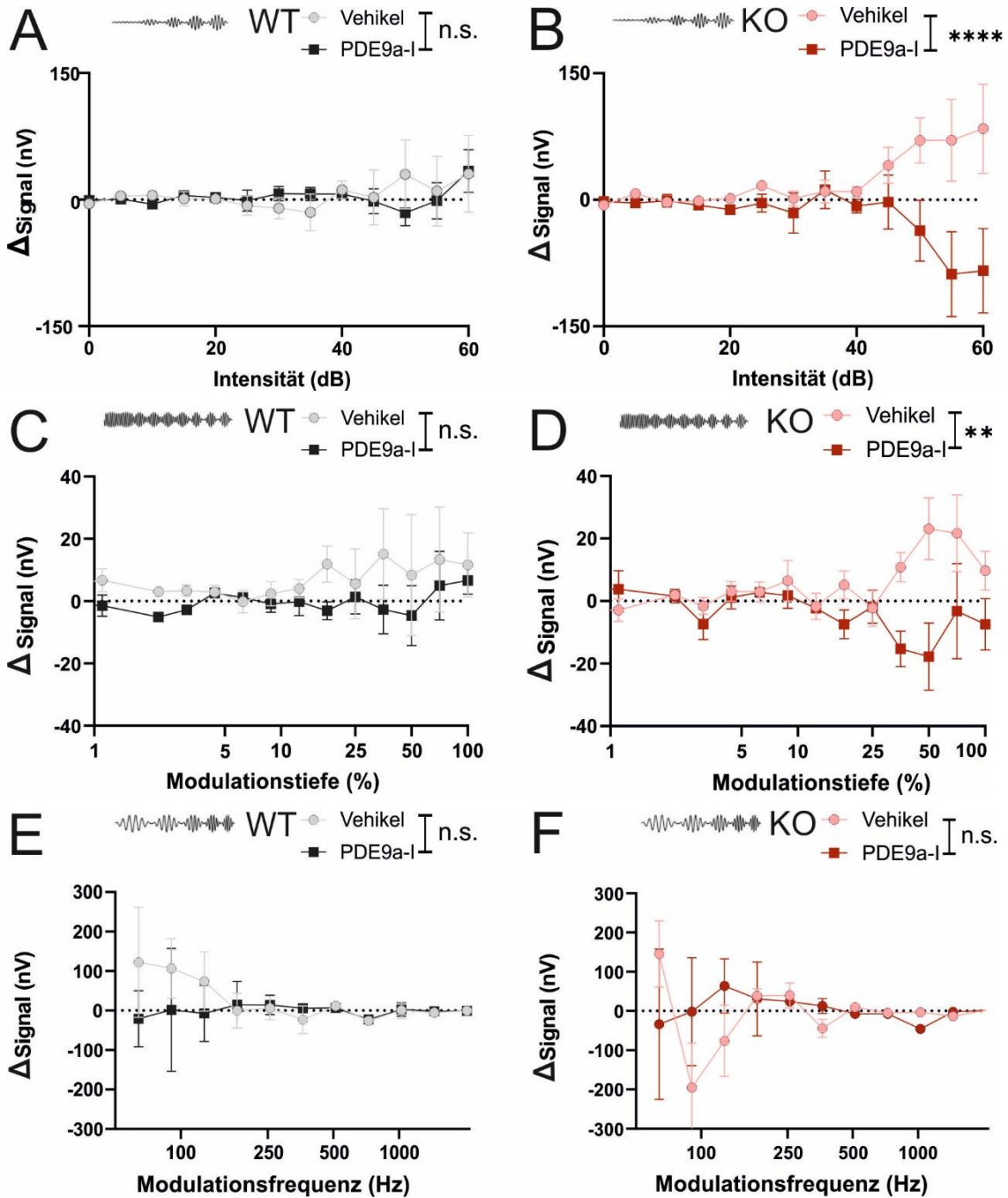
Abbildung 20: Veränderungen der Latenzen in den ABR-Wellen I und IV in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung. Veränderungen der ABR-Latenzen mit Click-Stimulus in Welle I bei WT (A) und GR cKO (B), in Welle IV bei WT (C) und GR cKO (D) und mit Noise-Stimulus in Welle I bei WT (E) und GR cKO (F) und in Welle IV bei WT (G) und GR cKO (H). Vehikel-Behandlung führte im Vergleich zum PDE9a-Hemmer zu signifikant längeren Latenzen in ABR-Welle IV mit Click- und Noise-Stimulus. WT in grau/schwarz, GR cKO in rosa/rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n = 8$ Tiere / 16 Ohren für WT und 7 Tiere / 14 Ohren für GR cKO).

Die Veränderungen der Latenzen der ABR-Welle I wiesen bezüglich der beiden Behandlungen für Click-Stimuli weder bei WT (Abbildung 20 A; 2-way ANOVA; $F(1, 427) = 0,72$; $p = 0,40$), noch bei GR cKO (Abbildung 20 B; 2-way ANOVA; $F(1, 355) = 0,002$; $p = 0,96$) signifikante Unterschiede auf. In Welle IV zeigten sich signifikant längere Latenzen bei WT mit Vehikel-Behandlung (Abbildung 20 C; 2-way ANOVA; $F(1, 426) = 5,81$; $p = 0,016$), nicht jedoch bei GR cKO (Abbildung 20 D; 2-way ANOVA; $F(1, 356) = 2,45$; $p = 0,12$). Auch bei Noise-Stimulus zeigte sich in Welle I für WT (Abbildung 20 E; 2-way ANOVA; $F(1, 448) = 1,89$; $p = 0,17$) und GR cKO (Abbildung 20 F; 2-way ANOVA; $F(1, 374) = 2,96$; $p = 0,086$) kein signifikanter Unterschied und in Welle IV für WT (Abbildung 20 G; 2-way ANOVA; $F(1, 425) = 7,99$; $p = 0,005$) signifikant längere Latenzen, nicht jedoch für GR cKO (Abbildung 20 H; 2-way ANOVA; $F(1, 362) = 0,36$; $p = 0,55$).

Zusammenfassend führte die Vehikel-Behandlung zu längeren Latenzen in ABR-Welle IV der WT für Click- und Noise-Stimuli im Vergleich zur PDE9a-Hemmer-Behandlung.

3.2.5 PDE9a-Hemmer reduzieren die ASSR-Signale in der Wachstumsfunktion und bei starker Modulationstiefe bei GR cKO

Die Signalamplituden der ASSR-Messungen (Wachstumsfunktion, Variation der Modulationstiefe und -frequenz) zum Messzeitpunkt vor der Behandlung wurden von denen nach der Behandlung subtrahiert, um die Delta-Werte zu generieren.



*Abbildung 21: Veränderungen der Signalstärken in den ASSR-Messungen in WT und GR cKO nach Vehikel- bzw. PDE9a-Hemmer-Behandlung. Veränderungen der ASSR-Signale in der Wachstumsfunktion bei WT (A) und GR cKO (B), bei variiertes Modulationstiefe bei WT (C) und GR cKO (D) und bei variiertes Modulationsfrequenz bei WT (E) und GR cKO (F). Bei GR cKO führte der PDE9a-Hemmer im Vergleich zur Vehikel-Behandlung zu signifikant niedrigeren ASSR-Signalen in der Wachstumsfunktion und bei variiertes Modulationstiefe. WT in grau/schwarz, GR cKO in rosa/rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ ($n = 6$ Tiere / 6 Ohren für WT und 5 Tiere / 5 Ohren für GR cKO).*

Bei WT zeigten die Vehikel- und die PDE9a-Hemmer-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in ihrer Wirkung auf die Signalstärke in der Wachstumsfunktion (Abbildung 21 A; 2-way ANOVA; $F(1, 180) = 0,08$; $p = 0,77$). Bei GR cKO führte die Vehikel-Behandlung in der Wachstumsfunktion zu größeren Signalen, wohingegen die Signale unter PDE9a-Hemmer-Behandlung signifikant kleiner waren (Abbildung 21 B; 2-way ANOVA; $F(1, 142) = 24,50$; $p < 0,0001$). Bei variiertes Modulationstiefe wiesen die WT bei Vehikel-Behandlung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen auf (Abbildung 21 C; 2-way ANOVA; $F(1, 162) = 3,61$; $p = 0,059$). Bei GR cKO zeigten sich hingegen wie bei der Wachstumsfunktion signifikant kleinere Signale durch PDE9a-Hemmer im Vergleich zur Vehikelsubstanz (Abbildung 21 D; 2-way ANOVA; $F(1, 130) = 8,44$; $p = 0,004$). Bei variiertes Modulationsfrequenz zeigten sich weder bei WT (Abbildung 21 E; 2-way ANOVA; $F(1, 134) = 1,29$; $p = 0,26$) noch bei GR cKO (Abbildung 21 F; 2-way ANOVA; $F(1, 108) = 0,24$; $p = 0,62$) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen.

Zusammenfassend zeigten sich in den ASSR-Messungen bei WT keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen, während bei GR cKO die Vehikel-Behandlung zu größeren Signalen insbesondere bei hohen Intensitäten in der Wachstumsfunktion und bei einer starken Modulationstiefe führte. PDE9a-Hemmer-Behandlung führte hier bei den GR cKO zu kleineren Signalen, wobei der Unterschied zwischen diesen Behandlungseffekten signifikant war. Bei variiertes Modulationsfrequenz konnten generell keine Effekte oder Unterschiede beobachtet werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Vehikel-Behandlung zu kleineren DPOAE-Amplituden bei $f_2 = 11,3$ kHz in GR cKO, zu höheren ABR-Schwellen bei Noise-Stimulus in WT, zu größeren Amplituden bei GR cKO in ABR-Welle I, kleineren

Amplituden bei WT in Welle IV, längeren Latenzen besonders in Welle IV der WT und größeren ASSR-Signalen in WT und GR cKO führte.

PDE9a-Hemmer-Behandlung verhinderte im Vergleich zur Vehikel-Behandlung eine Verkleinerung der DPOAE-Amplituden bei $f_2 = 11,3$ kHz in GR cKO, führte zu niedrigeren und damit besseren ABR-Schwellen bei Noise-Stimulus in WT, kleineren Amplituden der bereits initial größeren ABR-Welle I in GR cKO und größeren Amplituden der ABR-Welle IV in WT. Im Vergleich zur Vehikel-Behandlung verhinderte der PDE9a-Hemmer eine Verlängerung der Latenzen der ABR-Welle IV in WT und führte zu niedrigeren ASSR-Signalen in GR cKO.

3.3 Konditionale zentrale GR-Deletion und Vehikel-Behandlung können zu Veränderungen in der hippocampalen LTP führen

3.3.1 GR cKO zeigen Trends zu reduzierter LTP im Vergleich zu WT

Um den Effekt der konditionalen zentralen GR-Deletion auf kognitive Funktionen zu untersuchen, wurden LTP-Messungen durchgeführt.

Die hier gezeigten Daten wurden von Dila Calis (cand. rer. nat., AG Knipper „Molekulare Hörphysiologie“) erhoben, ausgewertet und visualisiert und die Abbildung von mir adaptiert. Da in den eigenen Vorarbeiten alle Mäuse entweder mit Vehikelsubstanz oder PDE9a-Hemmer zum Zeitpunkt der LTP-Messungen behandelt wurden, musste für die Beantwortung der Fragestellung nach dem Effekt der zentralen GR-Deletion an sich auf die Messungen von Dila Calis zurückgegriffen werden. Dabei wurden von jedem Versuchstier die fEPSP von ein bis zwei hippocampalen Hirnschnitten gemessen. Als Messgröße zur Quantifizierung der Fähigkeit zur hippocampalen LTP wurde die fEPSP in % bezogen auf die Größe des Baseline-Signals verwendet. Die Messungen erfolgten vier Wochen nach Beendigung der TMX-Injektionen.

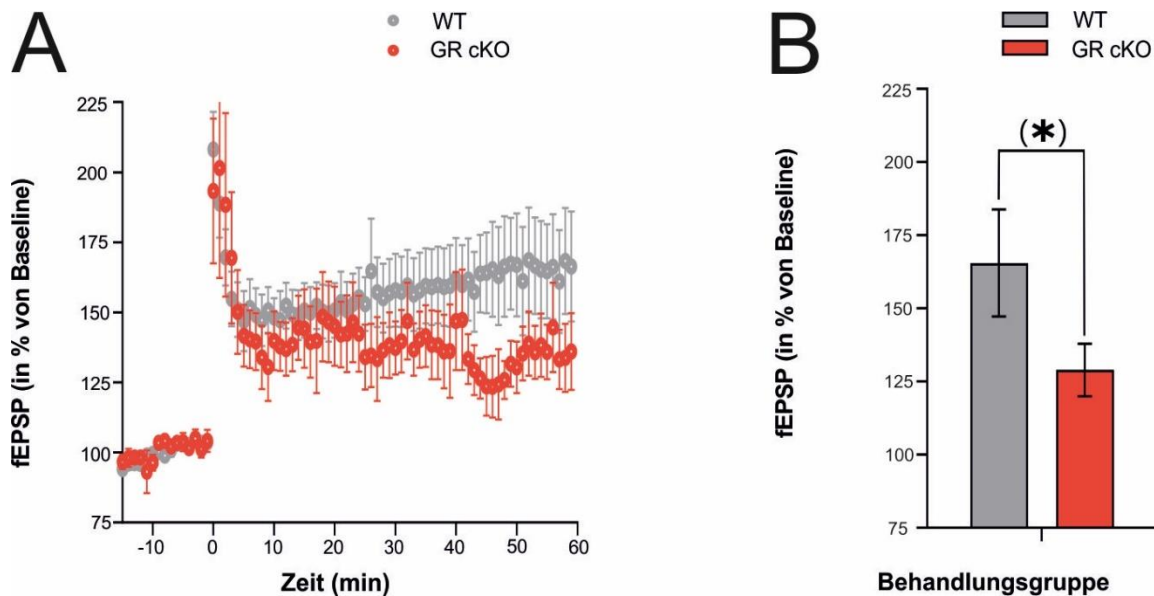


Abbildung 22: fEPSP in % des Grundlinien-Signals 10 Minuten vor Beginn des Stimulus bis 60 Minuten nach Stimulus und in den Minuten 50-60 nach Stimulus bei WT und GR cKO mit alleiniger TMX-Behandlung. fEPSP in % des Grundlinien-Signals 10 Minuten vor Beginn des Stimulus bis 60 Minuten nach Stimulus (A) und in den Minuten 50-60 nach Stimulus (B) bei WT und GR cKO mit alleiniger TMX-Behandlung (Calis et al., 2023). Die zentrale Deletion des GR zeigte einen statistischen Trend zu kleinerer LTP (Calis et al., 2023). WT in grau, GR cKO in rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM. (0,05 (n = 5 Tiere / 7 Schnitte für WT und 6 Tiere / 9 Schnitte für GR cKO) (*) $p < 0,08$; adaptiert von Calis et al., 2023).

GR cKO ohne weitere Behandlungen (abgesehen von TMX-Injektionen zur Generierung des Knockout) wiesen wie aus Vorarbeiten bekannt (Calis et al., 2023) einen Trend in Richtung kleinerer fEPSP und damit LTP auf (Abbildung 22 B; WT 165,52 fEPSP Steigung (% Grundlinie), SEM (standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes) 18,27, n = 7; GR cKO 128,96 fEPSP Steigung (% Grundlinie), SEM 8,98, n = 9; Mann-Whitney U Test, U (151,0 , 124,0) = 12, p = 0,0721).

Zusammenfassend zeigten GR cKO einen statistischen Trend zu kleineren fEPSP und damit verminderter Fähigkeit zu LTP.

3.3.2 PDE9a-Hemmer zeigen keine Effekte auf die LTP von WT und GR cKO, während Vehikel-Behandlung die LTP bei WT reduziert

Um nun den Effekt der verschiedenen Substanzen bei WT und GR cKO auf die Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung zu untersuchen, wurden LTP-Messungen

durchgeführt. Die Vehikelsubstanz beziehungsweise der PDE9a-Hemmer wurden jeweils über einen Zeitraum von zehn Tagen einmal täglich injiziert.

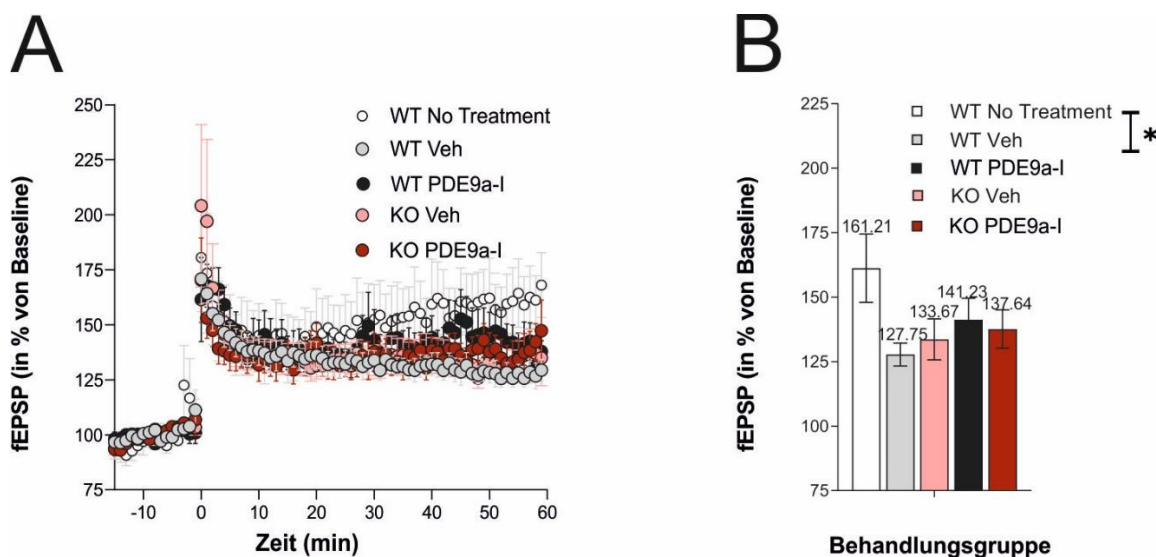


Abbildung 23: fEPSP in % des Grundlinien-Signals 10 Minuten vor Beginn des Stimulus bis 60 Minuten nach Stimulus und in den Minuten 50-60 nach Stimulus bei WT und GR cKO nach Vehikel-, PDE9a-Hemmer- oder keiner Behandlung. 10 Minuten vor Beginn des Stimulus bis 60 Minuten nach Stimulus (A) und 50-60 Minuten nach Stimulus (B) bei WT mit alleiniger TMX-Injektion (gemessen und ausgewertet von Dila Calis) und WT und GR cKO mit Vehikel oder PDE9a-Hemmer-Behandlung. Vehikel-Behandlung führte bei WT im Vergleich zu Tieren ohne Vehikel- oder PDE9a-Hemmer-Behandlung zu einer signifikant kleineren fEPSP. WT in weiß/grau/schwarz, GR cKO in rosa/rot. Fehlerbalken repräsentieren SEM. * $p < 0,05$ ($n = 5$ Tiere / 5 Schnitte für WT ohne Behandlung, 6 Tiere / 13 Schnitte für WT mit Vehikel-Behandlung, 6 Tiere / 9 Schnitte für WT mit PDE9a-Hemmer-Behandlung, 5 Tiere / 8 Schnitte für GR cKO mit Vehikel-Behandlung, 5 Tiere / 10 Schnitte für GR cKO mit PDE9a-Hemmer-Behandlung).

Mit Vehikel behandelte WT zeigten signifikant kleinere fEPSP im Vergleich zu WT ohne jegliche Behandlung (Abbildung 23 A und B). Der Vergleich zwischen WT mit Vehikel-Behandlung und GR cKO mit Vehikel-Behandlung ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Ebenso führte die Behandlung mit einem PDE9a-Hemmer weder in GR cKO noch WT zu signifikanten Veränderungen in der Größe des fEPSP.

Neben den Messwerten aus besagten Vorarbeiten bestätigten auch weitere Messungen der Arbeitsgruppe (durchgeführt und ausgewertet von Dila Calis) die LTP-Messwerte für WT mit alleiniger TMX-Behandlung (Abbildung 23 B; WT No Treatment 161,21 fEPSP Steigung (% Grundlinie), SEM 13,21, $n = 5$). Im

Vergleich zu diesen WT mit alleiniger TMX-Behandlung zeigten die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen und ausgewerteten WT mit Vehikel-Behandlung (WT Veh 127,75, SEM 4,47, n = 13) signifikant kleinere fEPSP (Abbildung 23 B; One-way ANOVA; $F(4, 40) = 2,13$; Holm-Sidak multiple comparison Test; $p = 0,029$). Die GR cKO mit Vehikel (KO Veh 133,67, SEM 7,94, n = 8) wiesen im Vergleich zu den WT mit Vehikel ein größeres fEPSP auf, was jedoch nicht signifikant war (Abbildung 23 B; One-way ANOVA; $F(4, 40) = 2,13$; Holm-Sidak multiple comparison Test; $p = 0,98$). Die Behandlung mit PDE9a-Hemmer im Vergleich zur Vehikel-Behandlung bewirkte sowohl bei den WT als auch den GR cKO ein minimal größeres fEPSP, wenn auch nicht statistisch signifikant (WT PDE9i 141,23 fEPSP Steigung (% Grundlinie), SEM 8,39, n = 9; Abbildung 23; One-way ANOVA; $F(4, 40) = 2,13$; Holm-Sidak multiple comparison Test; $p = 0,64$) (KO PDE9i 137,64 fEPSP Steigung (% Grundlinie), SEM 7,41, n = 10; Abbildung 23; One-way ANOVA; $F(4, 40) = 2,13$; Holm-Sidak multiple comparison Test; $p = 0,996$).

Zusammenfassend führte die Vehikel-Behandlung zu kleineren fEPSP der WT, was bei den fEPSP der GR cKO nicht beobachtet werden konnte. WT und GR cKO mit PDE9a-Hemmer-Gabe wiesen größere Signale im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Vehikelsubstanz auf, was jedoch nicht statistisch signifikant war.

4 Diskussion

Im Ergebnisteil zeigte sich ein Phänotyp der GR cKO mit größeren und schnelleren Antworten in der ABR und ASSR und einem Trend zu kleinerer LTP im Vergleich zu WT. Zudem zeigten sich nach Vehikel-Behandlung insgesamt kleinere und langsamere auditorische Antworten und bei WT kleinere LTP, was durch PDE9a-Hemmer-Behandlung kompensiert wurde. Diese Einzelergebnisse werden in den nachfolgenden Abschnitten unter Berücksichtigung des aktuellen Kenntnisstands diskutiert.

4.1 Konditionale zentrale GR-Deletion steigert die ABR-Signale und zeigt einen Trend zu reduzierter LTP

Im ersten Abschnitt dieser Diskussion werden die Effekte der konditionalen zentralen GR-Deletion auf die Hörfunktion und LTP untersucht und die Messwerte der Mausmutanten (GR cKO) und WT vor den jeweiligen Behandlungen mit PDE9a-Hemmer oder Vehikelsubstanz miteinander verglichen.

4.1.1 Effekte auf die Hörfunktion

Die erste im Rahmen dieser Promotionsarbeit betrachtete Komponente der Hörfunktion war die Funktionsfähigkeit der äußeren Haarzellen (ÄHZ). Hierzu wurden bei den Mäusen nach Induktion der konditionalen zentralen GR-Deletion die Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) gemessen und hinsichtlich der maximalen Signalamplituden (DP-gram), der Wachstumsfunktion und der Hörschwellen miteinander verglichen. Dabei war aus Vorarbeiten (Marchetta et al., 2022) bereits bekannt, dass es bei den DPOAE-Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und GR cKO gab. Da sich diese Beobachtung auch in der vorliegenden Promotionsarbeit bei den maximalen DPOAE-Amplituden, in der Wachstumsfunktion und in den Hörschwellen

bestätigte (Abbildung 12), kann daraus abgeleitet werden, dass der konditionale zentrale GR-KO sich nicht auf die Funktion der ÄHZ auswirkt.

Als nächstes wurden die Hörschwellen der WT und GR cKO in der Hirnstammaudiometrie (ABR) miteinander verglichen, da ABR-Schwellen als weitere Biomarker für die ÄHZ-Funktion ergänzend herangezogen werden können (Rüttiger et al., 2017). Wie bei den DPOAE zeigten sich auch hier weder in den Vorarbeiten (Marchetta et al., 2022) noch in der vorliegenden Promotionsarbeit (Abbildung 13) signifikante Unterschiede zwischen WT und GR cKO. Die Ergebnisse der ABR-Schwellen decken sich also sowohl mit denen der DPOAE-Messungen als auch mit der Literatur.

Im nächsten Schritt wurden die Amplituden der verschiedenen ABR-Wellen untersucht. Die Analyse der Amplituden ermöglicht es, die Hörfunktion unabhängig von der Funktion der ÄHZ zu beurteilen und so auch Aufschlüsse über die Aktivität der auditorischen Nervenfasern und zentral gelegenen Strukturen der Hörbahn zu geben (Rüttiger et al., 2017). So wiesen Mäuse mit zentralem GR-KO in Vorarbeiten sowohl peripher in Welle I als auch zentral in Welle IV erhöhte Signalamplituden auf (Marchetta et al., 2022). Diese Signalveränderungen ließen sich hier ebenfalls beobachten (Abbildung 14 A, C und D), wobei die zentralen Effekte in Welle IV schwächer ausgeprägt beziehungsweise bei Click-Stimulus nicht vorhanden waren (Abbildung 14 B). Interessant an diesen Ergebnissen ist, dass die GR-Deletion im Frontalhirn neben zentralen Effekten auch periphere Effekte zeigte. Denn neben den elektrischen Antworten auf Höhe des Lemniscus lateralis (Welle IV) sind auch die Antworten der Hörnerven (Welle I) gesteigert, obwohl peripher keine GR-Deletion erfolgte. Diese peripheren Veränderungen könnten damit erklärt werden, dass die Deletion des dämpfenden GR zentral zu diesen Phänotypen mit gesteigerten auditorischen Funktionen führt. Im Sinne eines Top-down-Mechanismus könnte das ZNS über efferente Rückkopplungs-Systeme die peripheren Hörnerven modulieren. Diese Hypothese eines Top-down-Mechanismus wurde bereits in Vorarbeiten diskutiert (Marchetta et al., 2022). Dabei sind die lateralen olivocochleären Fasern (lateral olivocochlear complex = LOC) ein wichtiger Modulator (Guinan 2006), wobei Dopamin postsynaptisch an den Terminalen

afferenter Dendriten als hemmender Neurotransmitter (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001) fungiert. Entsprechend könnte der Verlust Dopamin-gesteuerter Hemmung ursächlich sein für die Desinhibition der GR cKO. Weitere Untersuchungen bezüglich der Funktionalität des LOC bei GR cKO wären somit aufschlussreich und könnten zum grundlegenden Verständnis der Wirkweise von GR bei der Stressantwort beitragen.

Ein weiterer zu diskutierender Punkt dieser Ergebnisse ist, weshalb insbesondere die zentralen Effekte in Form der ABR-Welle IV in den Vorarbeiten (Marchetta et al., 2022) stärker ausgeprägt waren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die hier verwendeten Mäuse einen niedrigeren Erregungszustand aufwiesen und deshalb womöglich weniger empfänglich für die Erhöhung zentraler Signale waren. Die Rolle des Erregungszustands von Versuchstieren zur Erfassung von Trainingserfolgen wurde bereits in Vorarbeiten betrachtet, wobei Erregung hier als physiologische und psychologische Aktivierung in einen Wachzustand definiert wurde (Starling et al., 2013). In künftigen Studien könnte deshalb zum Beispiel unter standardisierten Bedingungen der Antrieb der Tiere zu bestimmten Verhaltensweisen wie Nahrungsaufnahme, Bewegung oder Fluchtreaktionen vor den Messungen untersucht werden. Dabei muss natürlich auch berücksichtigt werden, dass solche Tests vor den Messungen die eigentlichen Messungen beeinträchtigen können, sodass beispielsweise Tiere, die zu einer Fluchtreaktion animiert werden, schwieriger in Narkose versetzt werden könnten.

Als nächstes wurden die Latenzen der ABR-Wellen betrachtet, welche ein Maß für die Dauer der auditorischen Informationsverarbeitung darstellen (Rasetshwane et al., 2013). Da sie wie die ABR-Amplituden eine Beurteilung der Aktivität von Hörnervenfasern und zentral gelegenen Strukturen der Hörbahn ermöglichen (Rüttiger et al., 2017), war ihre Untersuchung in der vorliegenden Arbeit von Interesse. In Vorarbeiten (Marchetta et al., 2022) zeigten sich verkürzte Welle-I- und Welle-IV-Latenzen der GR cKO im Vergleich zu WT. Im Vergleich dazu zeigten die in dieser Arbeit untersuchten GR cKO auch verkürzte Latenzen in ABR-Welle I (Abbildung 15 A und C), nicht jedoch in ABR-Welle IV (Abbildung 15 B und D). Wie bereits bei den Amplituden deckten sich die

vorliegenden Effekte in Welle I mit denen in der Literatur, während sie in Welle IV abgeschwächt beziehungsweise überhaupt nicht auftraten, was ebenfalls mit dem Erregungszustand der Tiere erklärt werden könnte. Die verkürzten Latenzen, welche bereits mit einer verbesserten Hörfunktion assoziiert wurden (Firat et al., 2008), könnten auf eine erhöhte Synchronizität der Entladerate auditorischer Nervenfasern zurückgeführt werden, sodass mehr Nervenfasern mit einer hohen Entladerate gleichzeitig feuern und Signale bereits bei geringeren Intensitäten weiterleiten. In Kombination mit den erhöhten Amplituden ergänzen sie das Bild eines auditorisch desinhibierten Phänotypen, dessen periphere Veränderungen durch die zentrale GR-Deletion auf den zuvor beschriebenen Top-down-Mechanismus zurückgeführt werden könnten (Marchetta et al., 2022).

Um den Effekt des zentralen GR-KO auf noch zentralere Strukturen der Hörbahn sowie die zeitliche Auflösungsleistung und Integrität von Hörbahn und Cortex zu untersuchen, wurden ASSR-Messungen (Auditory steady-state responses = Dauerantworten auf Hörreize) durchgeführt (Li et al., 2021; Kuwada et al., 2002). In Vorarbeiten (Marchetta et al., 2022) zeigten sich gesteigerte Signalstärken der GR cKO im Vergleich zu WT, was in der vorliegenden Arbeit nur bei hohen Intensitäten in der Wachstumsfunktion festgestellt werden konnte (Abbildung 16 A). Ein möglicher Erklärungsansatz für die hier erhöhten ASSR-Signale involviert die im Einleitungsteil genannten Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR), welche neben Mineralocorticoiden auch Glucocorticoide (GC) mit höherer Affinität aber geringerer Kapazität binden als die GR. Über MR ist bekannt, dass sie mit Aufmerksamkeit zusammenhängen (Cornelisse et al., 2011). Da Aufmerksamkeit die ASSR signifikant beeinflusst (Gander et al., 2010), könnten ASSR-Veränderungen auf MR-Aktivitäten zurückgeführt werden. Im Falle der GR cKO könnten also verstärkte Aufmerksamkeits-Effekte durch das Überwiegen von MR-Aktivitäten auf die ASSR bei fehlenden GR-Effekten die Signalsteigerung erklären. Um dies zu überprüfen, sind weitere Messungen an MR-Knockout-Mäusen notwendig, wobei bisherige Messungen keine Hinweise auf verringerte ASSR-Signale in MR-Knockout-Mäusen erbrachten und auch bei Doppel-Knockout-Mäusen, bei denen sowohl MR als auch GR konditional zentral im

adulten Zustand ausgeschaltet wurden, gesteigerte ASSR-Signale beobachtet wurden (Marchetta et al., 2022).

4.1.2 Effekte auf die LTP

Da alle hier gemessenen Tiere entweder den PDE9a-Hemmer oder die Kontrollsubstanz erhielten, konnte der KO-Effekt allein hier nicht untersucht werden, sodass auf die Ergebnisse aus parallel durchgeführten Studien in unserer Abteilung im Rahmen der Promotionsarbeit von Dila Calis (cand. rer. nat.) Bezug genommen wurde.

Um ein vollständigeres Bild von den Effekten des zentralen GR-KO auf weitere kognitive Funktionen wie dem Gedächtnis zu erlangen und den Zusammenhang zwischen Stress, Gehör und Gedächtnis besser zu verstehen, wurden LTP-Messungen mit den GR cKO und WT durchgeführt.

Vorarbeiten zeigten, dass bei Mäusen mit zentraler, konditionaler GR-Deletion ein statistischer Trend zu kleineren fEPSP beobachtet wurde (Abbildung 22 B) (Calis et al., 2023). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass zentrale GR eine wichtige Rolle bei der LTP im Hippocampus spielen und deren Deletion zu einer Störung der Fähigkeit zu LTP führt (Steckler et al., 2001). Ebenso beschrieben Vorarbeiten (Calis et al., 2023) veränderte Spiegel der cGMP synthetisierenden Stickstoffmonoxid-aktivierten Guanylylzyklase (Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase = NO-GC) bei GR cKO. Diese veränderten Spiegel könnten sich ebenfalls auf die synaptische Plastizität im Hippocampus auswirken, da cGMP unmittelbar an synaptischen Vorgängen beteiligt ist (Barmashenko et al., 2014). So aktiviert cGMP die cGMP-abhängige Proteinkinase G, welche den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein = cAMP Antwortsequenz-bindendes Protein) phosphoryliert (Wang et al., 2018). Daraufhin kann CREB die synaptische Übertragung steigern (Swetha et al., 2022), sodass ein durch die zentrale konditionale GR-Deletion beeinflusster cGMP-Spiegel über CREB die synaptische Übertragung im Hippocampus beeinflussen kann.

Künftige Studien sollten sich deshalb auch noch mit der Quantifizierung von GR im Hippocampus etwa über immunhistochemische Verfahren beschäftigen, sodass genauer untersucht werden kann, inwieweit die GR-Expression im Hippocampus bei einem GR cKO mit der Fähigkeit des Hippocampus zur synaptischen Plastizität korreliert.

4.2 PDE9a-Hemmer zeigen positive Effekte auf WT und GR cKO in den Hörmessungen, jedoch keine auf die LTP

Nachdem zunächst die Effekte der konditionalen zentralen GR-Deletion auf die Hörfunktion und die LTP betrachtet und mit Vorarbeiten verglichen wurden, wird nun die primäre Fragestellung der Promotionsarbeit beleuchtet, nämlich der Effekt eines PDE9a-Hemmers auf die Hörfunktion und LTP der GR cKO.

4.2.1 Effekte auf die Hörfunktion

Wie im ersten Abschnitt des Diskussionsteils wurden zunächst die Effekte auf die DPOAE und damit auf die Funktion der ÄHZ betrachtet, nun bezogen auf die PDE9a-Hemmer-Behandlung. Dabei war aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Jaumann et al., 2012) bekannt, dass PDE5-Hemmer otoprotektive Wirkungen erzielen können. Während in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Behandlungseffekte auf die maximalen DPOAE-Amplituden (Abbildung 17 A) oder die Hörschwellen (Abbildung 17 D/E) auftraten, zeigten sich Hinweise für eine otoprotektive Wirkung des PDE9a-Hemmers in der Wachstumsfunktion der GR cKO (Abbildung 17 B/C). Da mit Vehikelsubstanz behandelte Tiere signifikant niedrigere Signalamplituden aufwiesen als Tiere aus der PDE9a-Hemmer-Kohorte, konnten PDE9a-Hemmer die Vehikel-bedingte Amplitudensenkung verhindern und damit eine wie in der Literatur beschriebene otoprotektive entfalten. Dass wiederholte Injektionen bei Mäusen zu Stress führen, welcher sich negativ auf Körperfunktionen auswirken kann und bei schwangeren Mäusen die Wahrscheinlichkeit aggressiven Verhaltens des männlichen Nachwuchses erhöht, wurde bereits aufgezeigt (Ogrizek et al., 2018). Ebenso konnten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass wiederholter

Injektionsstress bei Mäusen erhöhte Corticosteron-Spiegel im Blut und reduzierte Amplituden der Hörnerven in der ABR-Messung zur Folge haben kann (Savitska et al., 2022). Dementsprechend könnte die Amplitudenreduktion bei Vehikel-Behandlung darauf zurückgeführt werden, dass die Behandlungsprozedur in Form von wiederholten i.p. Injektionen Stress bei den Tieren bewirkt, welcher sich negativ auf die ÄHZ-Funktion auswirkt. Da in der vorliegenden Arbeit 6 Ohren von 3 Tieren gemessen wurden, sollte in weiteren Arbeiten bei höherer n-Zahl untersucht werden, ob die Reduktion der DPOAE-Amplituden bei Vehikel-Behandlung statistische Signifikanz erreicht oder in dieser Arbeit nur zufällig beobachtet wurde. Eine Power-Analyse (Cohen`s d = 0,50, α = 0,05 und Power = 0,80) zur Fallzahlplanung ergab für einen zweiseitigen abhängigen t-Test zwischen den DPOAE-Amplituden vor und nach Behandlung eine n-Zahl von 17 Ohren und damit 8-9 Mäusen pro Gruppe. In weiterführenden Arbeiten sollten diese Quantifizierungen des Stresspegels über die Corticosteron-Konzentration im Blut auch mit den in dieser Arbeit verwendeten WT und GR cKO durchgeführt und mit den Ergebnissen der Hörmessungen korreliert werden.

Desweiteren gilt es zu diskutieren, weshalb der Effekt auf die GR cKO nicht auch bei den WT beobachtet werden konnte. Angesichts der steigerungsfähigen Fallzahl könnte dies auch daran liegen, dass es sich um eine zufällige Beobachtung handelt. Ansonsten könnte auch der bereits veränderte cGMP-Spiegel in Folge des GR cKO in Form einer gesteigerten Expression von NO-GC mRNA (messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure) im auditorischen Cortex (Calis et al., 2023) dazu führen, dass eine weitere pharmakologische Beeinträchtigung der cGMP-Spiegel umso stärkere otoprotektive Effekte herbeiführte. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass auch die Stressachse vom cGMP-Spiegel ebenfalls über PDE-Hemmer beeinflusst werden kann (Ruan et al., 2019). Auch dieser Umstand könnte erklären, wieso der PDE9a-Hemmer auf die GR cKO anders wirkt als auf die WT, da die GR cKO sowohl eine veränderte Stressantwort, als auch veränderte Expressionsmuster von Enzymen des cGMP-Stoffwechsels aufweisen, was durch zusätzliche pharmakologische Intervention noch weiter beeinflusst werden könnte.

Zur weiteren Überprüfung des PDE9a-Hemmer-Effekts auf die ÄHZ-Funktion wurden die ABR-Schwellen untersucht. Auch bei den ABR-Schwellen zeigten Vorarbeiten (Jaumann et al., 2012) bereits protektive Wirkungen für PDE5-Hemmer. Dies zeigte sich in den ABR-Messungen der vorliegenden Arbeit auch bei WT-Mäusen mit Noise-Stimulus (Abbildung 18 B). So führte der Stress durch Vehikel-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung und damit Verschlechterung der ABR-Schwellen im Vergleich zur PDE9a-Hemmer-Behandlung, wo eine solche Verschlechterung nicht beobachtet werden konnte. Bei Click-Stimulus und bei den GR cKO zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. PDE9a-Hemmer kompensiert also die negativen Stresseffekte der Vehikel-Behandlung auf die ABR-Schwellen bei WT, womit die protektive Wirkung von PDE-Hemmern für ABR-Schwellen (Jaumann et al., 2012) in einem weiteren Tiermodell bestätigt werden konnte.

Ein Erklärungsansatz für die niedrigeren Hörschwellen nach PDE9a-Hemmer-Gabe abseits der Verbesserung der Hörleistung ist, dass es durch die Behandlung zu einem reduzierten Grundrauschen im Gegensatz zur Vehikel-Behandlung kommt und dadurch die Hörschwelle visuell besser geschätzt werden kann. Dabei kann eine verstärkte Aktivierung hemmender Interneurone das kleinere Rauschen herbeiführen und das klarere Signal so eine bessere Schwellenschätzung ermöglichen. Die Tatsache, dass die Unterschiede bei Noise-Stimuli stärker sind als bei Click-Stimuli könnte darauf zurückgeführt werden, dass Noise-Stimuli höherfrequent sind und sich die Unterschiede bei hohen Frequenzen vergrößern, also der PDE9a-Hemmer besonders bei höheren Frequenzen die ABR-Schwellen schützt. Die Ergebnisse der Click- und Noise-Hörschwellen decken sich nicht komplett mit denen der f-ABR (frequenzspezifische ABR, Abbildung 18 C), da die Effekte bei WT bei höheren Frequenzen schwächer sind als bei niedrigeren, obwohl die stärkeren Effekte beim höherfrequenten Noise-Stimulus und nicht beim Click-Stimulus beobachtet wurden. Dies kann auf verschiedene Dinge zurückgeführt werden. Zum einen handelt es sich um unterschiedliche Stimuli (Reintöne bei der f-ABR und breitbandige Töne bei Click und Noise), zum anderen werden die Schwellen visuell beurteilt, was aufgrund der Darstellung bei den verschiedenen Messungen

unterschiedlich präzise möglich ist. Desweiteren erfolgten die f-ABR-Messungen nach den Click- und Noise-Messungen, sodass bei der f-ABR längere Narkosedauern und damit auch unterschiedliche Erregungszustände der Tiere vorlagen.

Die Feststellung, dass sich die benannten Effekte auf WT und GR cKO durch Vehikelsubstanz und PDE9a-Hemmer auf die DPOAE-Messung und ABR-Schwellen-Messung nicht deckten, obwohl beide Messungen die Funktion der ÄHZ beurteilen, kann unter anderem daran liegen, dass bei den DPOAE-Messungen in erster Linie die ÄHZ und bei der ABR auch die IHZ und zentralere Strukturen der Hörbahn miterfasst werden.

Als nächstes wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der PDE9a-Hemmer-Effekt auf die ABR-Wellen-Amplituden und damit auf die Aktivität auditorischer Nervenfasern und zentral gelegener Strukturen der Hörbahn beleuchtet. Dabei zeigten sich unterschiedliche Effekte für GR cKO und WT. Im Vergleich zur Vehikel-Behandlung führte PDE9a-Hemmer bei GR cKO zu einer signifikanten Verringerung der Amplitude in ABR-Welle I (Abbildung 19 B und F). Bei den WT hingegen ergab der Vergleich der beiden Behandlungen signifikant verringerte Amplituden der ABR-Welle IV nach Vehikelsubstanz (Abbildung 19 C und G). Das bedeutet, dass PDE9a-Hemmer bei GR cKO in ABR-Welle I die auditorische Desinhibition durch die zentrale GR-Deletion bei Click-Stimuli kompensieren und womöglich sogar auf WT-Niveau zurückbringen kann, während diese Tendenz auch bei Noise-Stimuli vorliegt. Dieser kompensierende Effekt des PDE9a-Hemmers auf die Effekte durch die GR-Deletion ist interessant, weil er ein Beleg dafür sein könnte, dass cGMP unmittelbar an der GR-vermittelten Wirkung von Stress auf das Gehör beteiligt ist und die zentrale GR-Deletion womöglich ebenfalls über die bereits erwähnte Beeinflussung des cGMP-Spiegels seine Wirkung entfaltet.

Diese Erkenntnis könnte ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der GR-vermittelten Stresseffekte auf zentrale und periphere Anteile des auditorischen Systems sein. Entsprechend sollten sich künftige Studien konkret mit der Erforschung des cGMP-Metabolismus von GR cKO befassen. Während in Calis

et al., 2023 bereits eine erhöhte Expression von NO-GC mRNA in der CA1-Region des Hippocampus gemessen wurde, sollten weiterführende Arbeiten auch in wesentlichen Strukturen des auditorischen Systems wie etwa dem auditorischen Cortex die Menge an mRNA für NO-GC und weitere Enzyme des cGMP-Stoffwechsels messen. Falls ein Zusammenhang zwischen dem veränderten cGMP-Stoffwechsel bei GR cKO und damit einhergehenden auditorischen Veränderungen noch weiter bestätigt werden kann, könnte diese Erkenntnis für die pharmakologische Therapie stressassoziierter Hörstörungen genutzt werden.

Der Effekt in ABR-Welle IV der WT hingegen zeigt, dass der PDE9a-Hemmer den Abfall der Amplitude verhindern konnte. Dies kann als eine Verbesserung der Hörleistung im Sinne der neurovaskulären Kopplung gedeutet werden. Laut Vorarbeiten anderer Autoren (Han et al., 2020) führt akuter Stress zu einer verschlechterten neurovaskulären Kopplung. Die nach Vehikelsubstanz reduzierten Welle-IV-Amplituden der WT (Abbildung 19 C und G) würden zu dieser Hypothese insofern passen, als eine verschlechterte neurovaskuläre Kopplung die Leistung zentral gelegener Strukturen wie in ABR-Welle IV vermindert. PDE9a-Hemmer könnte über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels die neurovaskuläre Kopplung verbessern und damit der Amplitudensenkung bei Vehikel-Behandlung entgegenwirken. In weiteren Arbeiten müsste man auch hier den Corticosteron-Spiegel im Blut messen, um den Injektionsstress zu quantifizieren.

Zudem gilt es zu klären, als welche Art von Stress die tägliche i.p. Injektion an zehn aufeinander folgenden Tagen bei der Maus einzuordnen ist. Da die Vehikel-Behandlung diverse Messwerte bei WT und GR cKO negativ beeinträchtigt hat, ist davon auszugehen, dass dabei eher schädigender und nicht etwa akuter, protektiver Stress vorlag. Da GR für chronischen schädigenden Stress wichtig sind (Marchetta et al., 2022), wäre im Falle einer Einordnung der hier gewählten Behandlungsform als chronischer Stress davon auszugehen, dass GR cKO trotz Fehlens der zentralen GR nicht robust genug sind, um die „stressige“ Behandlungsprozedur unbeschadet zu überstehen. GR bilden sicherlich nur einen Anteil aller Rezeptoren im komplexen Stress-System ab. Gegen die

Einordnung der Behandlung als akuter Stress spricht, dass praktisch keine positiven Effekte durch die Vehikel-Behandlung auf WT oder GR cKO beobachtet werden konnten, wie das bei der otoprotektiven Wirkung von akutem Stress (Meltser & Canlon, 2011) erwartet werden könnte. Andererseits zeigten Han et al., 2020, wie bereits erwähnt, dass akuter Stress die neurovaskuläre Kopplung verschlechtert, was wiederum für eine Klassifikation als akuter Stress sprechen würde.

Eine weitere Überlegung wäre, dass diese duale Vorstellung von akut protektivem und chronisch schädigendem Stress nicht differenziert genug ist und der Stress durch Vehikel-Injektion womöglich einem Intermediärtypen von Stress wie etwa subakutem Stress entspricht, der sich nochmal anders auf den Organismus auswirkt. Auch hier ist es entscheidend, dass künftige Studien die Stresshormonspiegel während und nach der Behandlung berücksichtigen und damit auch eine fundierte Klassifikation der Stressart vornehmen können. Da es neben der HPA-Achse auch noch das adrenerge Stress-System gibt, sollten für die künftige Erforschung der Stressantwort klarere Kriterien für die Klassifikation herausgearbeitet werden.

Ergänzend zu den Untersuchungen der ABR-Amplituden wurden auch die Latenzen nach PDE9a-Hemmer-Behandlung untersucht. Dabei zeigten die mit Vehikel behandelten WT signifikant verlängerte Welle-IV-Latenzen im Vergleich zur PDE9a-Hemmer-Behandlung (Abbildung 20 C und G). PDE9a-Hemmer-Gabe konnte also die stressbedingte Latenzverlängerung kompensieren. Dieser stresskompensierende Effekt des PDE9a-Hemmers deckt sich auch mit dem zuvor genannten kompensierenden Effekt auf die Welle-IV-Amplituden bei WT. Die Hypothese, dass sich Stress negativ auf die neurovaskuläre Kopplung auswirkt (Han et al., 2020), findet also auch in diesen Ergebnissen Bestätigung. Denn mit der Beeinflussung der neurovaskulären Kopplung gehen Effekte auf zentrale Funktionen wie eine Verlängerung der Latenz in ABR-Welle IV einher. Die Erhaltung der Latenz durch PDE9a-Hemmer-Behandlung trotz des Behandlungsstressses entspräche also der Verbesserung der Hörfunktion durch Verbesserung der neurovaskulären Kopplung.

Bei GR cKO hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Latenzen festgestellt werden. Dies ergänzt nicht die Beobachtung der Kompensation des Knockout-Effekts bei der Amplitude in ABR-Welle I, da die ebenfalls pathologisch verkürzte Latenz der GR cKO in Welle I durch PDE9a-Hemmer unverändert bleibt. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die in dieser Arbeit gemessenen Mäuse nur so marginal beschleunigte Hörnerv-Antworten aufwiesen, dass eine Kompensation durch den PDE9a-Hemmer nicht fassbar war.

Noch zentraler lokalisierte Effekte des PDE9a-Hemmers hinsichtlich zeitlicher Auflösungsleistung und Integrität von Hörbahn und Cortex konnten mit den ASSR-Messungen überprüft werden. Während WT keine wesentlichen Effekte in der ASSR durch eine der Behandlungen zeigten (Abbildung 21 A, C und E), zeigten die beiden Behandlungen unterschiedliche Effekte bei GR cKO. So kam es zu einer weiteren Steigerung des bereits initial nach dem Knockout erhöhten Signals bei Vehikel-Behandlung, während die Signale bei PDE9a-Hemmer-Behandlung abgesenkt wurden (Abbildung 21 B/D). Stress durch Vehikel-Behandlung erhöhte also die bereits gesteigerten ASSR-Signalstärken bei GR cKO. Die PDE9a-Hemmer-Behandlung hingegen senkte die Signalstärken bei GR cKO in Richtung physiologischerer Levels. Auch diese Ergebnisse passen zu der Hypothese, dass Behandlungsstress zu einer pathologischen Steigerung des Signals führt und PDE9a-Hemmer über neurovaskuläre Kopplung eine Eindämmung des Signals in Richtung physiologischerer Levels bewirkt.

All dies zeigte sich jedoch nur in der Wachstumsfunktion bei hohen Intensitäten und bei großer Modulationstiefe der ASSR bei GR cKO (Abbildung 21 B/D). Dies wiederum könnte daran liegen, dass sich die Effekte in der ASSR nur bei sehr hohen Erregungsniveaus in Form von hohen Stimulusintensitäten mit hohem Lautstärkepegel oder großer Modulationstiefe, nicht jedoch bei veränderter Modulationsfrequenz bemerkbar machen. Dass nur bei hohen Intensitäten Effekte sichtbar wurden, könnte auch damit erklärt werden, dass bei hohen Intensitäten spezielle auditorische Fasern erregt werden. So wäre denkbar, dass erst bei Aktivierung der Typ-I-Fasern des auditorischen Nerven mit hohen Antwort-Schwellen (Rüttiger et al., 2017) ein messbarer Effekt durch den PDE9a-

Hemmer auf die ASSR-Signale auftritt. Zudem muss das auditorische System womöglich erst stark stimuliert werden, um bei narkotisierten Tieren die GR- und cGMP-assoziierten Stressmechanismen zu aktivieren.

Im Gegensatz zu den Messverfahren zur Prüfung der peripheren Hörnerven spiegeln die ASSR-Signale auch Antworten zentraler Strukturen wie des auditorischen Cortex wider. Somit wirkt der PDE9a-Hemmer sowohl peripher als auch zentral auf die GR cKO und untermauert die Vermutung, dass cGMP ein Schlüsselmolekül bei GR-vermittelten Stresseffekten auf Gehör und Kognition sein könnte. Auch hier sind weitere Experimente in Richtung des cGMP-Metabolismus von GR cKO für ein besseres Verständnis notwendig. Eine alternative Überlegung wäre es auch, Knockout-Mäuse mit Deletion einer Komponente der cGMP-Kaskade zu generieren und neben Gehör und Kognition auch immunhistochemisch GR in der Cochlea oder im zentralen Hörsystem zu untersuchen, also die Wechselbeziehung von GR und cGMP-Metabolismus auch aus dieser Perspektive zu erforschen.

4.2.2 Effekte auf die LTP

Zur Erforschung des Effekts von PDE9a-Hemmern auf die Gedächtnisbildungsfähigkeit wurden die LTP-Messungen an WT und GR cKO analysiert. Dadurch sollte das Bild vom Zusammenhang zwischen Stress, Gehör und Gedächtnis ergänzt und die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung über die cGMP-Spiegel eruiert werden.

Dabei zeigten WT mit Vehikel-Behandlung signifikant niedrigere LTP als WT ohne jegliche Behandlung (Abbildung 23 B). Für GR cKO ließ sich keine Aussage hierzu treffen, da in dieser Arbeit keine Daten für gänzlich unbehandelte GR cKO vorlagen. Die Beobachtung, dass Stress in Form der Vehikel-Behandlung die LTP verschlechterte, deckt sich mit der Literatur (Han et al., 2020). Somit führte der Behandlungsstress in Form von zahlreichen i.p. Injektionen bei WT zu einer Verringerung des fEPSP und ergänzt damit die zuvor illustrierten negativen Behandlungseffekte durch Injektionsstress. Jedoch muss berücksichtigt werden,

dass die WT ohne Behandlung von einer anderen Person gemessen und ausgewertet wurden und dies die direkte Vergleichbarkeit der Daten einschränkt.

Tiere mit PDE9a-Hemmer-Behandlung wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Tieren mit Vehikel-Behandlung hinsichtlich fEPSP auf. Es zeigten sich nur höhere Messwerte bei WT und GR cKO, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 23 B). Bei einer höheren n-Zahl könnten diese Signalsteigerungen signifikant werden und die Hypothese untermauern, dass sich PDE9a-Hemmer über cGMP und dadurch neurovaskuläre Kopplung positiv auf LTP im Hippocampus auswirkt. So ergab eine Power-Analyse (Effektstärke $f = 0,40$, $\alpha = 0,05$, Power = 0,80) für eine One-Way ANOVA mit 5 Gruppen eine n-Zahl von 8 Tieren pro Gruppe bei 2 Hirnschnitten pro Tier. Eine positive Beeinflussung des LTP im Hippocampus durch PDE9a-Hemmer wiederum wäre indirekt nützlich für den Prozess des Lernens, sodass bei einer Etablierung in der Patientenbehandlung auch indirekt fördernde Effekte Berücksichtigung finden sollten und zuvor in weiteren Experimenten überprüft werden sollten. Hinsichtlich des Effekts von PDE9a-Hemmer auf das Gedächtnis wären auch Verhaltensexperimente mit Mäusen von Interesse. So konnte bereits gezeigt werden, dass PDE9-Hemmer in Aufmerksamkeits-Übungen bei Ratten scopolamininduzierte Aufmerksamkeitsdefizite kompensieren konnten (Heckman et al., 2015; Van der Staay et al., 2008). So wäre auch denkbar, dass die Tiere erst kognitiv gefordert werden müssen etwa in Form von Aufmerksamkeitsaufgaben, damit PDE9a-Hemmer ihre positiven kognitiven Effekte entfalten können.

Ein weiterer Erklärungsansatz für das Ausbleiben signifikanter Effekte auf die LTP durch den PDE9a-Hemmer wäre, dass die Narkose aus den Post-ABR-Messungen des Vortages noch einen dämpfenden Effekt auf die LTP in dem Sinne haben könnte, dass Alpharezeptoren für Katecholamine, die im Rahmen der Narkose blockiert werden, bis zur LTP-Messung noch nicht freigeschwenkt wurden. So zeigten andere Autoren, dass das Injektionsanästhetikum Etomidat LTP in Mäusen blockieren kann (Zarnowska et al., 2015). Auch diese Hypothese sollte durch weitere Experimente mit größeren Zeitintervallen zwischen Post-

ABR-Messungen und LTP-Messungen oder LTP-Messungen ohne vorangegangene Hörmessungen unter Narkose erfolgen.

Andererseits wäre es auch möglich, dass speziell die PDE9a-Hemmung nicht die effizienteste cGMP-bezogene Strategie zur LTP-Förderung darstellt. Als alternative Zielmoleküle kommen andere Phosphodiesterasen oder cGMP-produzierende Guanylylzyklasen in Frage. So konnte an hippocampalen Hirnschnitten von Ratten bereits demonstriert werden, dass PDE2a-Hemmer, nicht jedoch PDE9a-Hemmer, präsynaptisch die kurzfristige synaptische Plastizität beeinflussen (Fernández-Fernández et al., 2015).

Desweiteren wäre es auch möglich, dass es neben cGMP geeignetere molekulare Korrelate für die Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung geben könnte wie zum Beispiel BDNF (Brain-derived neurotrophic factor = ein den Nervenwachstumsfaktoren ähnliches Neurotrophin) (Leal et al., 2014) oder Dopamin (Speranza et al., 2021). Demnach wäre es von Interesse, die LTP-Messungen von Tieren mit modulierten cGMP-Spiegeln mit denen von Tieren mit modulierten Dopamin- oder BDNF-Spiegeln zu vergleichen.

Als Verbesserung zur vorliegenden Promotionsarbeit sollten für weitere Studien LTP-Messungen mit Tieren unter vergleichbareren Bedingungen wie etwa derselben Person, die Experimente und Datenauswertung durchführt, geplant werden, da sich verschiedene Personen beispielsweise auch im praktischen Umgang mit den Versuchstieren unterscheiden. Die Bedeutung des Stresseffekts durch die Vehikelgabe ergab sich erst im Laufe der Experimente. Entsprechend sollten zusätzliche Messungen mit gänzlich unbehandelten Tieren und mit Vehikel- oder PDE9a-Hemmer-behandelten Tieren erfolgen, um den Effekt der Injektionen auf die LTP im Hippocampus zu untersuchen.

Zudem sind weitere immunhistochemische Untersuchungen des Hippocampus zu Enzymen des cGMP-Metabolismus beziehungsweise deren mRNA (Andreeva et al., 2001, Calis et al., 2023) wichtig, um über deren Quantifizierung Rückschlüsse auf den cGMP-Spiegel im Hippocampus ziehen zu können. Dabei ist anzumerken, dass PDE-Hemmer den Abbau von cGMP reduzieren (Blokland et al., 2012), nicht jedoch die restliche Kaskade beeinflussen.

Resümierend konnten in dieser Arbeit sowohl der auditorisch desinhibierte Phänotyp der GR cKO als auch die negative Wirkung von Injektionsstress auf Gehör und Kognition bestätigt werden. Auf die LTP konnten keine signifikanten Effekte durch den PDE9a-Hemmer gefunden werden. Jedoch liefert die Feststellung, dass PDE9a-Hemmer im Vergleich zur Vehikel-Behandlung sowohl periphere als auch zentrale Hörfunktionen von GR cKO positiv beeinflussen können, starke Hinweise darauf, dass der Einfluss zentraler Stressantworten auf das Gehör mit cGMP zusammenhängt. Diese decken sich mit den Vorarbeiten zu den Effekten von PDE9a-Hemmer auf das Gehör (Jaumann et al., 2012), wobei sie denen auf das fEPSP (Hutson et al., 2011) zumindest nicht widersprechen. Somit könnte cGMP ein geeignetes Zielmolekül für die Behandlung stressassoziierter Hörpathologien darstellen, was in künftigen Arbeiten weiter untersucht werden sollte.

Als Ausblick könnten künftige Arbeiten auf Grundlage der hier skizzierten Fallzahlplanungen die DPOAE- und LTP-Messungen mit größeren Fallzahlen wiederholen. Als Ergänzung zu den durchgeführten Labormethoden könnten auch noch vor und nach den Hörmessungen Urin- und Blutproben entnommen werden und der Corticosteron-Spiegel über ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) ermittelt werden, wobei Blutproben die akute Stressantwort während der Messung und Urinproben einen gemittelten Verlauf über mehrere Stunden vor Probenentnahme darstellen würden. Das im Rahmen der Herstellung der hippocampalen Hirnschnitte gewonnene Cochlea-Gewebe könnte mit Immunfärbung histologisch aufbereitet werden. Im Anschluss daran könnten Ribbonsynapsen und Marker für auditorische Fasern sowie Stressrezeptoren mikroskopisch ausgewertet und quantifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Zielstellung dieser Arbeit war es, anhand von funktioneller Audiometrie zur Hörprüfung und Messung der Langzeitpotenzierung im Hippocampus zur Prüfung der synaptischen Plastizität zu beleuchten, inwiefern der cGMP-Signalweg und der Stress-Signalweg bei der Stressantwort zur Adaptation an veränderte Umgebungsreize miteinander interagieren. Dieser komplexen Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Mausmodells und der Behandlung mit einem den cGMP-Signalweg stimulierenden PDE9a-Hemmer oder Vehikelsubstanz nachgegangen. Das verwendete Mausmodell, die TMX-induzierbare Mausmutante TMX-GRCaMKII CreERT2 , entwickelte sich normal und erfuhr erst im adulten Alter eine gewebsspezifische Deletion des insbesondere mit chronischem Stress assoziierten Glucocorticoid-Rezeptors (GR) im Frontalhirn. GR-vermittelter Stress hemmt über eine Inhibition der cGMP-Produktion auch die neurovaskuläre Kopplung, also die aktivitätsabhängige Hirndurchblutung (Han et al., 2019), und könnte dadurch auch für Gehör und Gedächtnis benötigte Hirnareale beeinflussen. Da zudem bei den zu untersuchenden Mausmutanten bereits ein Ungleichgewicht von der cGMP-produzierenden NO-GC beobachtet werden konnte (Calis et al., 2023), stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob die beeinträchtigte Stressantwort über veränderte cGMP-Spiegel moduliert werden kann. Es wurde davon ausgegangen, dass durch die akute, intraperitoneale Behandlung mit PDE9a-Inhibitor die cGMP-Spiegel der Mausmutanten gesteigert werden konnten und dadurch Effekte in den Hörmessungen und auf das hippocampale LTP überprüfbar würden. Dabei wurde die Funktion der ÄHZ anhand DPOAE und der Schwelle der ABR untersucht, während die IHZ, Hörnervenfasern und weitere Strukturen der aufsteigenden Hörbahn bis hin zum Hirnstamm anhand überschwelliger ABR untersucht wurden. Mit ASSR konnten neuronale Aktivitäten im Bereich des Hirnstamms und des auditorischen Cortex und mit LTP die synaptische Übertragung im Hippocampus beleuchtet werden.

Zunächst wurden die Effekte durch die zentrale GR-Deletion auf die Hörfunktion und LTP untersucht, wobei ein bereits in der Literatur beschriebener auditorisch

desinhibierter Phänotyp bestätigt werden konnte (Marchetta et al., 2022). So zeigten GR cKO noch vor Behandlung mit Vehikel oder PDE9a-Hemmer keine veränderte ÄHZ-Funktion, jedoch peripher und zentral gesteigerte auditorische Antworten und einen Trend zu verringerter hippocampaler LTP. Interpretiert werden konnten die Ergebnisse des GR cKO als Beleg für einen Top-down-Mechanismus, bei dem zentrale GR über Rückkopplungsmechanismen auf periphere Hörfunktionen wirken, aber auch zentrale kognitive Aufgaben für das Hören und Gedächtnis übernehmen (Marchetta et al., 2022).

Neu an dieser Arbeit war die Behandlung der GR cKO mit Vehikelsubstanz oder PDE9a-Hemmer um die Modulation der Stressantwort über gesteigerte cGMP-Spiegel zu untersuchen. Stress durch Vehikel-Behandlung im Sinne von schädigendem Injektionsstress für den Organismus (Ogrizek et al., 2018) wirkte sich sowohl bei WT als auch bei GR cKO negativ auf periphere und zentrale Hörfunktionen und bei WT zusätzlich auf die LTP aus. Während PDE9a-Hemmer keine signifikanten Effekte auf die LTP zeigten, konnten sie eine kompensatorische Wirkung auf eine Vielzahl der negativen Vehikel-Effekte auf die Hörfunktion von WT und GR cKO demonstrieren.

Somit konnten in dieser Arbeit erstmals positive Effekte auf die peripheren und zentralen Hörfunktionen von GR cKO und WT durch PDE9a-Hemmer skizziert werden, welche mit gesteigerten cGMP-Spiegeln und einer verbesserten Hirndurchblutung im Rahmen der neurovaskulären Kopplung zusammen hängen könnten. All diese Beobachtungen liefern starke Hinweise darauf, dass cGMP an der Beeinflussung des Gehörs durch zentrale Stressantworten beteiligt ist und damit ein geeignetes Zielmolekül für die Behandlung von Patienten mit stressassoziierten Hörschädigungen wie Hörsturz oder Tinnitus sein könnte, insbesondere im Rahmen einer Inhibition der PDE9a. Daran anknüpfend sollten zukünftige Experimente die Stresshormon-Spiegel im Blut der GR cKO sowie Synapsen und GR in den Cochleae der Tiere einschließen und Modifikationen des cGMP-Stoffwechsels auf ihre potenziell fördernden Einflüsse auf Gehör und Kognition untersuchen, um eine bestmögliche Behandlung von Patienten mit stressassoziierten Hörpathologien in der Zukunft zu gewährleisten.

6 Literaturverzeichnis

Amarjargal, N., Andreeva, N., Gross, J., Haupt, H., Fuchs, J., Szczepek, A. J., & Mazurek, B. (2009). Differential vulnerability of outer and inner hair cells during and after oxygen-glucose deprivation in organotypic cultures of newborn rats. *Physiological research*, *58*(6), 895–902.

Amer, A., Xia, J., Smith, M., & Martin, J. H. (2021). Spinal cord representation of motor cortex plasticity reflects corticospinal tract LTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(52), e2113192118.

Andreeva, S. G., Dikkes, P., Epstein, P. M., & Rosenberg, P. A. (2001). Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *21*(22), 9068–9076.

Barmashenko, G., Buttgereit, J., Herring, N., Bader, M., Ozcelik, C., Manahan-Vaughan, D., & Braunewell, K. H. (2014). Regulation of hippocampal synaptic plasticity thresholds and changes in exploratory and learning behavior in dominant negative NPR-B mutant rats. *Frontiers in molecular neuroscience*, *7*, 95.

Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, *309*, 1–16.

Basappa, J., Graham, C. E., Turcan, S., & Vetter, D. E. (2012). The cochlea as an independent neuroendocrine organ: Expression and possible roles of a local hypothalamic–pituitary–adrenal axis-equivalent signaling system. *Hearing research*, *288*(1-2), 3-18.

Batallán Burrowes, A. A., Sundarakrishnan, A., Bouhour, C., & Chapman, C. A. (2021). G protein-coupled estrogen receptor-1 enhances excitatory synaptic responses in the entorhinal cortex. *Hippocampus*, *31*(11), 1191–1201.

Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews*, *22*(6), 724–763.

Biacabe, B., Chevallier, J. M., Avan, P., & Bonfils, P. (2001). Functional anatomy of auditory brainstem nuclei: application to the anatomical basis of brainstem auditory evoked potentials. *Auris, nasus, larynx*, *28*(1), 85–94.

Billig, A. J., Lad, M., Sedley, W., & Griffiths, T. D. (2022). The hearing hippocampus. *Progress in neurobiology*, *218*, 102326.

Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, *232*(2), 331–356.

Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., & Baltaci, A. K. (2019). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochemical research*, 44(2), 281–296.

Blokland, A., Menniti, F. S., & Prickaerts, J. (2012). PDE inhibition and cognition enhancement. *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(4), 349–354.

Brownell, W. E., Bader, C. R., Bertrand, D., & De Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science*, 227(4683), 194-196.

Calis D, Hess M, Marchetta P, Singer W, Modro J, Nelissen E, Prickaerts J, Sandner P, Lukowski R, Ruth P, Knipper M and Rüttiger L (2023) Acute deletion of the central MR/GR steroid receptor correlates with changes in LTP, auditory neural gain, and GC-A cGMP signaling. *Front. Mol. Neurosci.* 16:1017761.

Canlon, B., Meltser, I., Johansson, P., & Tahera, Y. (2007). Glucocorticoid receptors modulate auditory sensitivity to acoustic trauma. *Hearing research*, 226(1), 61-69.

Cant, N. B., & Benson, C. G. (2003). Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Research Bulletin*, 60, 457.

Carvalho-Costa, P. G., Branco, L. G., & Leite-Panissi, C. R. (2014). Acute stress-induced antinociception is cGMP-dependent but heme oxygenase-independent. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 47(12), 1057–1061.

Cauli, B., Tong, X. K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., & Hamel, E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(41), 8940–8949.

Chai, Y., Li, Q., Wang, Y., Tao, E., & Asakawa, T. (2022). The Value of HPA Axis Hormones as Biomarkers for Screening and Early Diagnosis of Postpartum Depression: Updated Information About Methodology. *Frontiers in endocrinology*, 13, 916e611.

Chen, B. R., Kozberg, M. G., Bouchard, M. B., Shaik, M. A., & Hillman, E. M. (2014). A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain. *Journal of the American Heart Association*, 3(3), e000787.

Chonchaiya, W., Tardif, T., Mai, X., Xu, L., Li, M., Kaciroti, N., Kileny, P. R., Shao, J., & Lozoff, B. (2013). Developmental trends in auditory processing can provide early predictions of language acquisition in young infants. *Developmental science*, 16(2), 159–172.

- Cornelisse, S., Joëls, M., & Smeets, T. (2011). A randomized trial on mineralocorticoid receptor blockade in men: effects on stress responses, selective attention, and memory. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2720.
- Collet, L., Berger-Vachon, C., Desreux, V., & Morgon, A. (1992). Auditory brainstem response (ABR) latency: relative importance of age, sex and sensorineural hearing-loss using a mathematical model of the audiogram. *The International journal of neuroscience*, 67(1-4), 187–197.
- Curtis, L. M., & Rarey, K. E. (1995). Effect of stress on cochlear glucocorticoid protein. II. Restraint. *Hearing research*, 92(1-2), 120-125.
- Dallos, P. (1992). The active cochlea. *Journal of Neuroscience*, 12(12), 4575-4585.
- De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463-475.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in neurosciences*, 22(10), 422-426.
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews*, 19(3), 269-301.
- Davies, K. L., Smith, D. J., El-Bacha, T., Wooding, P., Forhead, A. J., Murray, A. J., Fowden, A. L., & Camm, E. J. (2022). Cortisol Regulates Cerebral Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Morphology of the Brain in a Region-Specific Manner in the Ovine Fetus. *Biomolecules*, 12(6), 768.
- Dhanasingh A, Hochmair I. Drug delivery in cochlear implantation. *Acta Otolaryngol.* 2021 Mar;141(sup1):135-156.
- Dragatsis, I., & Zeitlin, S. (2000). CaMKII-cre transgene expression and recombination patterns in the mouse brain. *genesis*, 26(2), 133-135.
- Elgoyhen, A. B., Langguth, B., De Ridder, D., & Vanneste, S. (2015). Tinnitus: perspectives from human neuroimaging. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(10), 632-642.
- Erdmann, G., Schütz, G., & Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC neuroscience*, 8(1), 63.
- Erondu, N. E., & Kennedy, M. B. (1985). Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 5(12), 3270-3277.

Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889-895.

Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications*, 237(3), 752-757.

Fernández-Fernández, D., Rosenbrock, H., & Kroker, K. S. (2015). Inhibition of PDE2A, but not PDE9A, modulates presynaptic short-term plasticity measured by paired-pulse facilitation in the CA1 region of the hippocampus. *Synapse (New York, N.Y.)*, 69(10), 484–496.

Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Comprehensive Physiology*. (7), 1197-1227.

Firat, Y., Kizilay, A., Ozturan, O., & Ekici, N. (2008). Experimental otoacoustic emission and auditory brainstem response changes by stellate ganglion blockage in rat. *American journal of otolaryngology*, 29(5), 339–345.

Fujimoto, H., Notsu, E., Yamamoto, R., Ono, M., Hioki, H., Takahashi, M., & Ito, T. (2021). Kv4.2-Positive Domains on Dendrites in the Mouse Medial Geniculate Body Receive Ascending Excitatory and Inhibitory Inputs Preferentially From the Inferior Colliculus. *Frontiers in neuroscience*, 15, 740378.

Gander, P. E., Bosnyak, D. J., & Roberts, L. E. (2010). Evidence for modality-specific but not frequency-specific modulation of human primary auditory cortex by attention. *Hearing research*, 268(1-2), 213-226.

Graydon, K., Waterworth, C., Miller, H., & Gunasekera, H. (2019). Global burden of hearing impairment and ear disease. *The Journal of laryngology and otology*, 133(1), 18–25.

Grigoryan, G., Biella, G., Albani, D., Forloni, G., & Segal, M. (2014). Stress impairs synaptic plasticity in triple-transgenic Alzheimer's disease mice: rescue by ryanodine. *Neuro-degenerative diseases*, 13(2-3), 135–138.

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

Günschmann, C., Chiticariu, E., Garg, B., Hiz, M. M., Mostmans, Y., Wehner, M., & Scharfenberger, L. (2014). Transgenic mouse technology in skin biology: inducible gene knockout in mice. *The Journal of investigative dermatology*, 134(7), e22.

Han, K., Lee, M., Lim, H. K., Jang, M. W., Kwon, J., Lee, C. J., Kim, S. G., & Suh, M. (2020). Excitation-Inhibition Imbalance Leads to Alteration of Neuronal Coherence and Neurovascular Coupling under Acute Stress. *The Journal of*

neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 40(47), 9148–9162.

Han, K., Min, J., Lee, M., Kang, B. M., Park, T., Hahn, J., Yei, J., Lee, J., Woo, J., Lee, C. J., Kim, S. G., & Suh, M. (2019). Neurovascular Coupling under Chronic Stress Is Modified by Altered GABAergic Interneuron Activity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(50), 10081–10095.

Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends in neurosciences*, 20(2), 78–84.

Heckman, P. R., Blokland, A., Ramaekers, J., & Prickaerts, J. (2015). PDE and cognitive processing: beyond the memory domain. *Neurobiology of learning and memory*, 119, 108–122.

Henkin RI, McGlone RE, Daly R, Bartter FC. Studies on auditory thresholds in normal man and in patients with adrenal cortical insufficiency: the role of adrenal cortical steroids. *J Clin Invest*. 1967 Mar;46(3):429-35.

Hibino H, Nin F, Tsuzuki C, Kurachi Y. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch*. 2010 Mar;459(4):521-33.

Hosseini, M., Salmani, H., & Baghcheghi, Y. (2021). Losartan improved hippocampal long-term potentiation impairment induced by repeated LPS injection in rats. *Physiological reports*, 9(10), e14874.

Hutson, P. H., Finger, E. N., Magliaro, B. C., Smith, S. M., Converso, A., Sanderson, P. E., Mullins, D., Hyde, L. A., Eschle, B. K., Turnbull, Z., Sloan, H., Guzzi, M., Zhang, X., Wang, A., Rindgen, D., Mazzola, R., Vivian, J. A., Eddins, D., Uslaner, J. M., Bednar, R., ... Parmentier-Batteur, S. (2011). The selective phosphodiesterase 9 (PDE9) inhibitor PF-04447943 (6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) enhances synaptic plasticity and cognitive function in rodents. *Neuropharmacology*, 61(4), 665–676.

Iadecola C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17–42.

Jansen, C., Kooistra, A. J., Kanev, G. K., Leurs, R., de Esch, I. J., & de Graaf, C. (2016). PDEStrIA: A Phosphodiesterase Structure and Ligand Interaction Annotated Database As a Tool for Structure-Based Drug Design. *Journal of medicinal chemistry*, 59(15), 7029–7065.

Jaumann, M., Dettling, J., Gubelt, M., Zimmermann, U., Gerling, A., Paquet-Durand, F., Feil, S., Wolpert, S., Franz, C., Varakina, K., Xiong, H., Brandt, N., Kuhn, S., Geisler, H. S., Rohbock, K., Ruth, P., Schlossmann, J., Hütter, J.,

Sandner, P., Feil, R., ... Rüttiger, L. (2012). cGMP-Prkg1 signaling and Pde5 inhibition shelter cochlear hair cells and hearing function. *Nature medicine*, *18*(2), 252–259.

Jiang, Z., Chen, C., Weiss, G. L., Fu, X., Stelly, C. E., Sweeten, B., Tirrell, P. S., Pursell, I., Stevens, C. R., Fisher, M. O., Begley, J. C., Harrison, L. M., & Tasker, J. G. (2022). Stress-induced glucocorticoid desensitizes adrenoreceptors to gate the neuroendocrine response to somatic stress in male mice. *Cell reports*, *41*(3), 111509.

Joëls, M., & de Kloet, E. R. (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Progress in neurobiology*, *43*(1), 1-36.

Johnson, D. H., & Kiang, N. Y. (1976). Analysis of discharges recorded simultaneously from pairs of auditory nerve fibers. *Biophysical journal*, *16*(7), 719.

Johnson, J., Marshall, C. R., Weil, R. S., Bamiou, D. E., Hardy, C., & Warren, J. D. (2021). Hearing and dementia: from ears to brain. *Brain: a journal of neurology*, *144*(2), 391–401.

Kim, I. B., Lee, J. H., & Park, S. C. (2022). The Relationship between Stress, Inflammation, and Depression. *Biomedicines*, *10*(8), 1929.

Kratzer, S., Mattusch, C., Metzger, M. W., Dedic, N., Noll-Hussong, M., Kafitz, K. W., Eder, M., Deussing, J. M., Holsboer, F., Kochs, E., & Rammes, G. (2013). Activation of CRH receptor type 1 expressed on glutamatergic neurons increases excitability of CA1 pyramidal neurons by the modulation of voltage-gated ion channels. *Frontiers in cellular neuroscience*, *7*, 91.

Kurylo, D. D., Corkin, S., Allard, T., Zatorre, R. J., & Growdon, J. H. (1993). Auditory function in Alzheimer's disease. *Neurology*, *43*(10), 1893–1899.

Kuwada, S., Anderson, J. S., Batra, R., Fitzpatrick, D. C., Teissier, N., & D'Angelo, W. R. (2002). Sources of the scalp-recorded amplitude-modulation following response. *Journal of the American Academy of Audiology*, *13*(4), 188-204.

Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, *76 Pt C*, 639–656.

Lee, P. L., Lee, T. M., Lee, W. K., Chu, N. N., Shelepin, Y. E., Hsu, H. T., & Chang, H. H. (2022). The Full Informational Spectral Analysis for Auditory Steady-State Responses in Human Brain Using the Combination of Canonical Correlation Analysis and Holo-Hilbert Spectral Analysis. *Journal of clinical medicine*, *11*(13), 3868.

- Leung, C. S., Kosyk, O., Welter, E. M., Dietrich, N., Archer, T. K., & Zannas, A. S. (2022). Chronic stress-driven glucocorticoid receptor activation programs key cell phenotypes and functional epigenomic patterns in human fibroblasts. *iScience*, *25*(9), 104960.
- Li, Z., Li, J., Wang, S., Wang, X., Chen, J., & Qin, L. (2021). Laminar Profile of Auditory Steady-State Response in the Auditory Cortex of Awake Mice. *Frontiers in systems neuroscience*, *15*, 636395.
- Liberman, M. C., Chesney, C. P., & Kujawa, S. G. (1997). Effects of selective inner hair cell loss on DPOAE and CAP in carboplatin-treated chinchillas. *Auditory Neuroscience*, *3*(3), 255-268.
- Lins, O. G., Picton, T. W., Boucher, B. L., Durieux-Smith, A., Champagne, S. C., Moran, L. M., ... & Savio, G. (1996). Frequency-specific audiometry using steady-state responses. *Ear and hearing*, *17*(2), 81-96.
- Liu, X., Liu, S., Guo, D., Sheng, Y., Ke, Y., An, X., He, F., & Ming, D. (2019). Enhanced Auditory Steady-State Response Using an Optimized Chirp Stimulus-Evoked Paradigm. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *19*(3), 748.
- Lonsbury-Martin, B. L., & Martin, G. K. (1990). The clinical utility of distortion-product otoacoustic emissions. *Ear and hearing*, *11*(2), 144–154.
- Malmierca, M. S., & Merchán, M. A. (2004). Auditory system. The rat nervous system, *3*, 997-1082.
- Marchetta, P., Möhrle, D., Eckert, P., Reimann, K., Wolter, S., Tolone, A., Lang, I., Wolters, M., Feil, R., Engel, J., Paquet-Durand, F., Kuhn, M., Knipper, M., & Rüttiger, L. (2020). Guanylyl Cyclase A/cGMP Signaling Slows Hidden, Age- and Acoustic Trauma-Induced Hearing Loss. *Frontiers in aging neuroscience*, *12*, 83.
- Marchetta, P., Savitska, D., Kübler, A., Asola, G., Manthey, M., Möhrle, D., Schimmang, T., Rüttiger, L., Knipper, M., & Singer, W. (2020). Age-Dependent Auditory Processing Deficits after Cochlear Synaptopathy Depend on Auditory Nerve Latency and the Ability of the Brain to Recruit LTP/BDNF. *Brain sciences*, *10*(10), 710.
- Marchetta, P., Eckert, P., Lukowski, R., Ruth, P., Singer, W., Rüttiger, L., & Knipper, M. (2022). Loss of central mineralocorticoid or glucocorticoid receptors impacts auditory nerve processing in the cochlea. *iScience*, *25*(3), 103981.
- Meltser I, Canlon B. Protecting the auditory system with glucocorticoids. *Hear Res.* 2011 Nov;*281*(1-2):47-55.
- Møller, A. R. (2006). *Hearing: Anatomy, Physiology and Disorders of the Auditory Systems*. (2nd Ed). London, UK: Academic Press.

Muchnik, C., Sahartov, E., Peleg, E., & Hildesheimer, M. (1992). Temporary threshold shift due to noise exposure in guinea pigs under emotional stress. *Hearing research*, 58(1), 101–106.

Nicoll R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290.

Ogrizek, M., Grgurevič, N., Snoj, T., & Majdič, G. (2018). Injections to pregnant mice produce prenatal stress that affects aggressive behavior in their adult male offspring. *Hormones and behavior*, 106, 35–43.

Omata, Y., Tharasegaran, S., Lim, Y. M., Yamasaki, Y., Ishigaki, Y., Tatsuno, T., Maruyama, M., & Tsuda, L. (2016). Expression of amyloid- β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception. *Aging*, 8(3), 427–439.

Ordiway, G., McDonnell, M., Mohan, S., & Sanchez, J. T. (2022). Evaluation of Auditory Brainstem Response in Chicken Hatchlings. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (182), 10.3791/63477.

Orhan, I. E., Rauf, A., Saleem, M., & Khalil, A. A. (2022). Natural Molecules as Talented Inhibitors of Nucleotide Pyrophosphatases/ Phosphodiesterases (PDEs). *Current topics in medicinal chemistry*, 22(3), 209–228.

Oshri, A., Cui, Z., Owens, M., Carvalho, C., & Sweet, L. (2022). Low-to-moderate level of perceived stress strengthens working memory: Testing the hormesis hypothesis through neural activation. *Neuropsychologia*, 108354.

Paz, Z., Freeman, S., Horowitz, M., & Sohmer, H. (2004). Prior heat acclimation confers protection against noise-induced hearing loss. *Audiology & neuro-otology*, 9(6), 363–369.

Pérez-González, D., Schreiner, T. G., Llano, D. A., & Malmierca, M. S. (2022). Alzheimer's Disease, Hearing Loss, and Deviance Detection. *Frontiers in neuroscience*, 16, 879480.

Pré, D., Wooten, A. T., Biesmans, S., Hinckley, S., Zhou, H., Sherman, S. P., Kakad, P., Gearhart, J., & Bang, A. G. (2022). Development of a platform to investigate long-term potentiation in human iPSC-derived neuronal networks. *Stem cell reports*, S2213-6711(22)00372-1.

Race, N., Lai, J., Shi, R., & Bartlett, E. L. (2017). Differences in postinjury auditory system pathophysiology after mild blast and nonblast acute acoustic trauma. *Journal of neurophysiology*, 118(2), 782–799.

Rana, M. N., Lu, J., Xue, E., Ruan, J., Liu, Y., Zhang, L., Dhar, R., Li, Y., Hu, Z., Zhou, J., Ma, W., & Tang, H. (2021). PDE9 Inhibitor PF-04447943 Attenuates

DSS-Induced Colitis by Suppressing Oxidative Stress, Inflammation, and Regulating T-Cell Polarization. *Frontiers in pharmacology*, 12, 643215.

Rasetshwane, D. M., Argenyi, M., Neely, S. T., Kopun, J. G., & Gorga, M. P. (2013). Latency of tone-burst-evoked auditory brain stem responses and otoacoustic emissions: level, frequency, and rise-time effects. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 133(5), 2803–2817.

Reetz, G., & Ehret, G. (1999). Inputs from three brainstem sources to identified neurons of the mouse inferior colliculus slice. *Brain research*, 816(2), 527–543.
Robles, L., & Ruggero, M. A. (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiological reviews*, 81(3), 1305-1352.

Ruan, L., Du, K., Tao, M., Shan, C., Ye, R., Tang, Y., Pan, H., Lv, J., Zhang, M., & Pan, J. (2019). Phosphodiesterase-2 Inhibitor Bay 60-7550 Ameliorates A β -Induced Cognitive and Memory Impairment via Regulation of the HPA Axis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 432.

Russell, M. A., & Morgan, N. G. (2010). Expression and functional roles of guanylate cyclase isoforms in BRIN-BD11 β -cells. *Islets*, 2(6), 374–382.

Rüttiger, L., Zimmermann, U., & Knipper, M. (2017). Biomarkers for hearing dysfunction: facts and outlook. *ORL*, 79(1-2), 93-111.

Sapolsky R. M. (2003). Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochemical research*, 28(11), 1735–1742.

Sapolsky, R. M. (2015). Stress and the brain: individual variability and the inverted U. *Nature neuroscience*, 18(10), 1344-1346.

Schloesser, R. J., Martinowich, K., & Manji, H. K. (2012). Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends in neurosciences*, 35(1), 36-46.

Savitska, D., Hess, M., Calis, D., Marchetta, P., Harasztosi, C., Fink, S., Eckert, P., Ruth, P., Rüttiger, L., Knipper, M., & Singer, W. (2022). Stress Affects Central Compensation of Neural Responses to Cochlear Synaptopathy in a cGMP-Dependent Way. *Frontiers in neuroscience*, 16, 864706.

Shrivastava, K., Rosenberg, T., Meiri, N., & Maroun, M. (2021). Age-Specific Modulation of Prefrontal Cortex LTP by Glucocorticoid Receptors Following Brief Exposure to HFD. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 13, 722827.

Singer, W., Kasini, K., Manthey, M., Eckert, P., Armbruster, P., Vogt, M. A., ... & Zimmermann, U. (2018). The glucocorticoid antagonist mifepristone attenuates sound-induced long-term deficits in auditory nerve response and central auditory processing in female rats. *The FASEB Journal*, fj-201701041RRR.

- Speranza, L., di Porzio, U., Viggiano, D., de Donato, A., & Volpicelli, F. (2021). Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control. *Cells*, 10(4), 735.
- Starling, M. J., Branson, N., Cody, D., & McGreevy, P. D. (2013). Conceptualising the Impact of Arousal and Affective State on Training Outcomes of Operant Conditioning. *Animals: an open access journal from MDPI*, 3(2), 300–317.
- Steckler, T., Rammes, G., Sauvage, M., van Gaalen, M. M., Weis, C., Zieglgänsberger, W., & Holsboer, F. (2001). Effects of the monoamine oxidase A inhibitor moclobemide on hippocampal plasticity in GR-impaired transgenic mice. *Journal of psychiatric research*, 35(1), 29–42.
- Strouse, A. L., Hall, J. W., 3rd, & Burger, M. C. (1995). Central auditory processing in Alzheimer's disease. *Ear and hearing*, 16(2), 230–238.
- Swetha, R., Sharma, A., Singh, R., Ganeshpurkar, A., Kumar, D., Kumar, A., & Singh, S. K. (2022). Combined ligand-based and structure-based design of PDE 9A inhibitors against Alzheimer's disease. *Molecular diversity*, 10.1007/s11030-022-10504-7.
- Tahera, Y., Meltser, I., Johansson, P., Bian, Z., Stierna, P., Hansson, A. C., & Canlon, B. (2006). NF-kappaB mediated glucocorticoid response in the inner ear after acoustic trauma. *Journal of neuroscience research*, 83(6), 1066–1076.
- Tuohimaa, K., Loukusa, S., Löppönen, H., Välimaa, T., & Kunnari, S. (2022). Communication abilities in children with hearing loss - views of parents and daycare professionals. *Journal of communication disorders*, 99, 106256.
- van der Zwaluw, N. L., van de Rest, O., Kessels, R. P., & de Groot, L. C. (2015). Effects of glucose load on cognitive functions in elderly people. *Nutrition reviews*, 73(2), 92–105.
- van der Staay, F. J., Rutten, K., Bärfacker, L., Devry, J., Erb, C., Heckroth, H., Karthaus, D., Tersteegen, A., van Kampen, M., Blokland, A., Prickaerts, J., Reymann, K. G., Schröder, U. H., & Hendrix, M. (2008). The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. *Neuropharmacology*, 55(5), 908–918.
- Vandevyver, S., Dejager, L., & Libert, C. (2012). On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 13(3), 364–374.
- van Strien, N. M., Cappaert, N. L., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(4), 272–282.

Vazquez, A. L., Fukuda, M., & Kim, S. G. (2018). Inhibitory Neuron Activity Contributions to Hemodynamic Responses and Metabolic Load Examined Using an Inhibitory Optogenetic Mouse Model. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 28(11), 4105–4119.

Wang H, Xu J, Lazarovici P, Quirion R, Zheng W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2018 Aug 30;11:255.

Wang, X., Zhang, C., Sz'abo, G., & Sun, Q. Q. (2013). Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice. *Brain research*, 1518, 9-25.

Wang, Y., & Liberman, M. C. (2002). Restraint stress and protection from acoustic injury in mice. *Hearing research*, 165(1-2), 96–102.

Wangemann P. (2006). Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *The Journal of physiology*, 576(Pt 1), 11–21.

Wayne, R. V., & Johnsrude, I. S. (2015). A review of causal mechanisms underlying the link between age-related hearing loss and cognitive decline. *Ageing research reviews*, 23(Pt B), 154–166.

White, H. J., Helwany, M., & Peterson, D. C. (2022). Anatomy, Head and Neck, Ear Organ of Corti. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Willmore, B., & King, A. J. (2022). Adaptation in auditory processing. *Physiological reviews*, 10.1152/physrev.00011.2022.

Yao, B. C., Meng, L. B., Hao, M. L., Zhang, Y. M., Gong, T., & Guo, Z. G. (2019). Chronic stress: a critical risk factor for atherosclerosis. *The Journal of international medical research*, 47(4), 1429–1440.

Yoshida, N., Kristiansen, A., & Liberman, M. C. (1999). Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(22), 10116–10124.

Yu, M., Sun, C. W., Maier, K. G., Harder, D. R., & Roman, R. J. (2002). Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 282(5), H1724–H1731.

Zarnowska, E. D., Rodgers, F. C., Oh, I., Rau, V., Lor, C., Laha, K. T., Jurd, R., Rudolph, U., Eger, E. I., Nd, & Pearce, R. A. (2015). Etomidate blocks LTP and impairs learning but does not enhance tonic inhibition in mice carrying the N265M point mutation in the beta3 subunit of the GABA(A) receptor. *Neuropharmacology*, 93, 171–178.

Zenner, H. P. (2005). Die Kommunikation des Menschen: Hören und Sprechen. *Physiologie des Menschen*, Springer Berlin Heidelberg, 334-356.

Zenner H. P. (2011). Hearing--the gateway to speech and cognition. *Deutsches Arzteblatt international*, 108(25), 425.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Sektion „Molekulare Hörphysiologie und Neurosensorik“ des Hörforschungszentrums der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Lukas Rüttiger und Dr. Philine Marchetta durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Lukas Rüttiger und Dr. Philine Marchetta.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Lukas Rüttiger und Dr. Philine Marchetta von mir mit Unterstützung durch Dr. Lukas Rüttiger und Dr. Philine Marchetta durchgeführt, mit Ausnahme der LTP-Messungen an WT und GR cKO ohne Behandlung mit Vehikelsubstanz oder PDE9a-Hemmer, welche von Dila Calis (cand. rer. nat.) durchgeführt und ausgewertet wurden.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und Angewandte Biometrie Tübingen durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Lukas Rüttiger und Dr. Philine Marchetta verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Julian Modro

Tübingen, 19.03.2023

8 Veröffentlichungen

Calis D, Hess M, Marchetta P, Singer W, Modro J, Nelissen E, Prickaerts J, Sandner P, Lukowski R, Ruth P, Knipper M and Rüttiger L (2023) Acute deletion of the central MR/GR steroid receptor correlates with changes in LTP, auditory neural gain, and GC-A cGMP signaling. *Front. Mol. Neurosci.* 16:1017761.

Danksagung

Danken möchte ich allen direkt oder indirekt an dieser Arbeit beteiligten Personen.

Direkt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben alle Beschäftigten der Arbeitsgruppe „Molekulare Hörphysiologie“ des Tübinger Hörforschungszentrums unter der Leitung von Prof. Dr. Marlies Knipper. Angefangen bei der guten Betreuung durch Prof. Dr. Lukas Rüttiger im Rahmen eines kleineren Forschungsprojektes im fünften Fachsemester wurde ich bereits früh auf die Möglichkeit hingewiesen, in derselben Arbeitsgruppe eine experimentelle Dissertation anzufertigen, was ich ein Semester später auch begann. Unter der tagtäglichen direkten Betreuung durch Dr. Philine Marchetta konnte ich die Experimente bereits früh eigenständig durchführen und auswerten und mich bei Problemen oder Fragen jederzeit an sie wenden, weshalb ihr mein außerordentlicher Dank gilt. Neben dieser exzellenten Betreuung konnte ich mich aber auch jederzeit an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe, insbesondere meinen Doktorvater Prof. Dr. Lukas Rüttiger, Prof. Dr. Marlies Knipper und Dr. Wibke Singer mit jeglichen Fragen zum Forschungsprojekt wenden. Auch Kerstin Just, Jakob Wertz, Morgan Hess und Dila Calis danke ich für den täglichen wissenschaftlichen und zwischenmenschlichen Austausch, was mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ungemein erleichterte. Auch Karin Rohbock und Hyun-Soon Geisler halfen mir mit Fragen rund um die Nutzung der technischen Laborgeräte.

Indirekt zu dieser Arbeit beigetragen haben natürlich meine Familie und Freunde, die mir insbesondere während dieser schwierigen Pandemie-Zeiten die nötige Kraft und Wertschätzung spendeten, um meine Lebensprojekte zu verwirklichen und meinen eigenen Weg zu gehen.