Aus der

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

Langfristige Auswirkungen bei AAV transduzierten Otoferlin-Knock-Out Mäusen

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Haas, Sophia Johanna, geb. Schweickhardt

2025

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professorin Dr. E. Reisinger
2. Berichterstatter:	Professor Dr. F. Paquet-Durand
Tag der Disputation:	25.08.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 9

1.1. Anatomie und Histologie des Ohres 9

1.2. Äußere Haarsinneszellen 12

1.3. Innere Haarsinneszellen 14

1.4. Audiometrie 17

1.4.1. Otoakustische Emissionen 17

1.4.2. Akustisch evozierte Potenziale 18

1.5. Otoferlin 20

1.6. DFNB9- Auditorische Synaptopathie 23

1.7. Cochlea-Implantate 25

1.8. Gentherapie 27

1.9. Fragestellung und Zielsetzung 31

2. Material und Methoden 33

2.1. Versuchstiere 33

2.2. Herstellung der AAV-Vektoren 33

2.3. Dual-AAV-Injektion 34

2.4. Audiologische Untersuchungen 35

2.5. Immunhistochemie 37

2.6. Bilderfassung und -analyse 40

2.7. Statistische Auswertung 42

3. Ergebnisse **43**

3.1. Haarzelldichte 43

3.2. Transduktionsrate 48

3.3. Synapsen 50

4. Diskussion **56**

4.1. Haarzelldichte 56

4.2. Transduktionsrate 60

4.3. Synapsen 64

4.4. Auswirkungen auf die Hörleistung 67

4.5. Limitationen 72

4.5.1. Quantität und Qualität der Präparate 72

4.5.2. Qualitative Einschränkungen der Immunfluoreszenz 74

4.6. Ausblick 76

5. Zusammenfassung **79**

6. Literaturverzeichnis **81**

7. Erklärung zum Eigenanteil **91**

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der aktiven Zone der Inneren Haarsinneszellen 15

Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer ABR-Messung. 19

Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Otoferlin..... 20

Abbildung 4: Herstellung eines rekombinanten AAV-Vektors (rAAV2) 28

Abbildung 5: Darstellung der verwendeten Maus-Modelle 35

Abbildung 6: Präparierte Cochlea-Abschnitte während der Antikörperapplikation. 40

Abbildung 7: Cochlea-Abschnitte einer nicht transduzierten Otof-KO-Maus..... 43

Abbildung 8: Anzahl aller gezählten ÄHZ [/100µm] und IHZ [/100µm]. 44

Abbildung 9: Konfokalaufnahmen einer nicht-transduzierten Otof-KO-Maus.. 46

Abbildung 10: Konfokalaufnahmen einer Otof-WT-Maus.. 47

Abbildung 11: Konfokalaufnahmen einer transduzierten Otof-KO-Maus..... 47

Abbildung 12: Seitenvergleich der HZ bei transduzierten Otof-KO-Mäusen. 48

Abbildung 13: Epifluoreszenzaufnahmen der Otoferlin positiven IHZ, aufgeteilt nach den Cochlea-Abschnitten apikal, midbasal, basal. 49

Abbildung 14: Transduktionsrate aller transduzierten Mäuse in Bezug zu den Cochlea-Abschnitten. 50

Abbildung 15: Konfokalaufnahmen des Haarzellverbundes der Inneren Haarsinneszellen..... 51

Abbildung 16: Konfokalaufnahmen der synaptischen Verbindungen von Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. 52

Abbildung 17: Konfokalaufnahmen der synaptischen Verbindungen von Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. 52

Abbildung 18: Konfokalaufnahmen der synaptischen Verbindungen von Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. 53

Abbildung 19: Graphische Darstellung der Synapsenanzahl von Otoferlin-positiven und Otoferlin-negativen IHZ. 55

Abbildung 20: Epifluoreszenzaufnahme der altersbedingten Degeneration des Haarzellverbundes. 58

Abbildung 21: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr. 1 68

Abbildung 22: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr. 2 68

Abbildung 23: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr.3 70

Abbildung 24: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr.4 71

Abbildung 25: Epfiluoreszenzaufnahmen von zwei nicht ausgewerteten Cochlea-Präparaten. 73

Abbildung 26: Epiflouoreszenzaufnahme eines nicht ausgewerteten Cochlea-Präparates. 74

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ABR	Auditory brainstem response
ÄHZ	Äußere Haarsinneszelle
AZ	Aktive Zonen
BERA	Brainstem evoked response audiometry
DFNB9	*Otof*-bedingte Taubheit
DPOAE	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
FAEP	Frühe Akustisch Evozierte Potenziale
Hyb	Hybrid
HZ	Haarsinneszelle
IHZ	Innere Haarsinneszelle
MET	Mechano-elektrischer Transduktionskanal
OAE	Otoakustische Emissionen
Otof-KO	Otoferlin-Knock-out
Otof$^{Pga/Pga}$	Pachanga-Mäuse
RPP	Readily-Releasable-Pool
SGN	Spiralganglienneurone
SV	Synaptische Vesikel
Syt1	Synaptotagmin 1
TS	Trans-Splicing
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Histologie des Ohres

Das Ohr *(Auris)* ist Teil des Hörorgans zur Wahrnehmung von Schall. Es kann in drei Abschnitte unterteilt werden. Man unterscheidet das äußere Ohr *(Auris externa)*, das Mittelohr *(Auris media)* und das Innenohr *(Auris interna)*.

Das äußere Ohr besteht aus der Ohrmuschel *(Auricula auris)* und dem äußeren Gehörgang *(Meatus acusticus externus)*. Die beidseitig angelegten Ohrmuscheln dienen dem Auffangen von Schallwellen und ermöglichen durch ihre trichterartige Form ein Richtungshören. Die aufgefangenen Schallwellen werden über den äußeren Gehörgang *(Meatus acusticus externus)* zum Trommelfell *(Membrana tympanica)* weitergeleitet und versetzen die Membran in Schwingung. Das Trommelfell trennt das äußere Ohr zum Mittelohr.

Das angrenzende Mittelohr ist ein mit Schleimhaut ausgekleideter pneumatisierter Raum im Inneren des Schläfenbeins *(Os temporale)*. Im Mittelohr befindet sich die Paukenhöhle *(Cavitas tympani)* mit der Gehörknöchelchenkette. Diese besteht aus Hammer *(Malleus)*, Amboss *(Incus)* und Steigbügel *(Stapes).* Die Funktion der Gehörknöchelchenkette besteht in der Weitergabe und Verstärkung der Auslenkungen des Trommelfells auf das ovale Fenster, welches das Mittelohr zum Innenohr trennt. Die Verstärkung (Impedanzanpassung) setzt sich aus der Hebelwirkung der Gehörknöchelchenkette und der Änderung des Flächenverhältnisses zwischen Trommelfell und ovalem Fenster zusammen. Sie ist notwendig, da sich im Innenohr das schallleitende Medium von Luft (niedriger Schallwellenwiderstand) zu Flüssigkeit (hoher Schallwellenwiderstand) ändert. Bei zu hohen Schalldrücken findet im Mittelohr zum Schutz des Innenohres auch eine Schallabschwächungen statt. Durch die Kontraktion des Mittelohrmuskels *(M. stapedius)* versteift die Gehörknöchelchenkette und führt zu einer Schwingungsabschwächung am ovalen Fenster. Hierbei handelt es sich um den Stapediusreflex, der reflektorisch ab Schallpegeln zwischen 75dB und 100dB

ausgelöst wird. Die Kontraktion des zweiten Mittelohrmuskels *(M. tensor tympani)* führt zu einer Spannungserhöhung am Trommelfell.

Das Innenohr *(Auris interna)* befindet sich im Felsenbein *(Pars petrosa ossis temporalis)* und setzt sich aus der Hörschnecke *(Cochlea)* und dem Gleichgewichtsorgan *(Organon vestibulare)* zusammen. Während die Hörschnecke Teil des auditiven Systems ist, liefert das Gleichgewichtsorgan durch zwei Makulaorgane (*Sacculus, Utriculus*) und drei Bogengängen (*Canales semicirculares ossei mit den Christae ampullares*) Informationen über Position und Bewegung des Körpers im Raum.

Die Cochlea besteht aus drei flüssigkeitsgefüllten Kanälen, den Scalae, welche sich schneckenhausartig um den knöchernen Modiolus winden. Der Modiolus stellt das knöcherne Grundgerüst dar, in dem sich das Ganglion spirale cochlea mit den ersten Neuronen der Hörbahn, befindet. Die mit natriumreicher Perilymphe befüllte Scala vestibuli beginnt am ovalen Fenster und geht an der Spitze der Cochlea, dem Helicotrema, in die Scala tympani über. Letztere endet an der Basis der Cochlea am runden Fenster *(Fenestra cochleae)*. Das runde Fenster liegt unterhalb des ovalen Fensters und dient dem Schwingungsausgleich: Ankommende Schwingungswellen, die durch den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell treffen und von dort über die Gehörknöchelchen auf die Cochlea übertragen werden, können so wieder an das Mittelohr abgegeben werden.

Die sich in der Mitte befindliche Scala media ist mit kaliumreicher Endolymphe gefüllt und wird zur Scala vestibuli durch die Reissner- Membran und zur Scala tympani durch die Basilarmembran abgegrenzt. Die Breite und Dicke der Basilarmembran verändert sich Richtung Helicotrema, sodass jeder Bereich der Basilarmembran eine charakteristische Frequenz besitzt, bei der es zu einer maximalen Auslenkung der wandernden Schallwelle kommt (Dallos, 1992, v. Békésy, 1960). Das menschliche Ohr kann Frequenzen von 20kHz an der Basis bis zu 20Hz am Apex abbilden. Durch die frequenzabhängigen maximalen

Auslenkungen können die Hörsignale ortsspezifisch weitergeleitet und ausgewertet werden. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer tonotopen Ordnung, die von der Cochlea über die Hörbahn bis zum auditiven Kortex beibehalten wird und damit eine wichtige Rolle für die Erkennung der Frequenz („Tonhöhe“) der auditiven Informationen spielt (Spoendlin, 1985, Lauter et al., 1985).

Die Scala media beherbergt das Corti-Organ. Hierbei handelt es sich um ein komplexes System aus Stützzellen und Sinneszellen, welches der Basilarmembran aufsitzt. Apikal wird das Corti-Organ durch die azelluläre Tektorialmembran begrenzt und lateral durch die Stria vascularis. Die Stria vascularis ist ein epitheliales Organ, das die Ionenkonzentration der kaliumreichen Endolymphe reguliert (Wangemann, 2002, v. Békésy, 1951, Davis, 1953). Die Endolymphe besitzt gegenüber der Perilymphe ein positives Potenzial von +85mV (endocochläres Potenzial) (Fettiplace, 2017). Sie stellt einen essentiellen Antrieb für den mechano-elektrischen Transduktionsstrom dar (Fettiplace, 2017). Für die präzise Regulierung des Perilymph- und Endolymphvolumens sind Wasserkanalproteine oder Aquaporine zuständig (Eckhard et al., 2012).

Das Corti-Organ kann als das eigentliche Hörorgan betrachtet werden, da es die mechanosensorische Haarsinneszellen (HZ) enthält, die die Schallwellen in ein elektrisches Signal für die afferenten Spiralganglienneurone (SGN) umkodieren. Unterschiedliche Arten von Stützzellen umgeben die mechanosensorischen Haarsinneszellen, die abhängig von ihrer Lage und Funktion im Corti-Organ in Äußere Haarzellen (ÄHZ) und Innere Haarzellen (IHZ) unterteilt werden. Namensgebend für die Haarzellen sind die Haarzellbündel aus 50-100 Stereozilien, die sich am apikalen Pol der Zellen befinden. Die einzelnen Stereozilien sind unter anderem durch Tip-Links miteinander verbunden. Hierbei handelt es sich um dünne Proteinfäden aus Cadherin 23 und Protocadherin 15 (Kazmierczak et al., 2007), die über weitere Proteine wie Harmonin an der Stereozilien verankert sind (Grillet et al., 2009). ÄHZ und IHZ weisen ein

Ruhemembranpotenzial von -70mV bzw. -55mV auf. Die Potenzialdifferenz zur +85mV positiven Endolymphe beträgt damit 140-155mV und stellt einen essentiellen Bestandteil für den mechano-elektrischen Transduktionsstrom dar (Fettiplace, 2017). Die afferente Innervation der IHZ erfolgt über bipolare Spiralganglienneurone, deren Perikaryen als Ganglion spirale im Rosenthal-Kanal *(Canalis spiralis modiolus)* der Cochlea liegen. Ihre Axone vereinigen sich als Radix cochlearis mit der Radix vestibularis des Gleichgewichtorgans zum VIII. Hirnnerv, dem N. vestibulocochlearis. Die SGN können aufgrund ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften in die Typ-I-SGN und die Typ-II-SGN eingeteilt werden, die jeweils hauptsächlich einen HZ-Typ innervieren (Spoendlin, 1972).

1.2. Äußere Haarsinneszellen

Äußere Haarsinneszellen (ÄHZ) ordnen sich parallel in drei Reihen an der lateralen Seite des Corti-Organs an. Sie besitzen einen zylindrischen Zellkörper mit einem runden, basal gelegenen Zellkern (Raphael und Altschuler, 2003). Die Stereozilien, die sich am apikalen Pol der Zelle befinden, sind der Länge nach in drei V-förmigen Reihen angeordnet. Die distalen Spitzen der Stereozilien sind in der Tektorialmembran verankert (Lim, 1986).

ÄHZ dienen der Signalverstärkung. Dieser Prozess erfolgt durch Elektromotilität, bei der die frequenzspezifische Auslenkung der Basilarmembran verstärkt wird. Durch die ankommende Druckwelle im Innenohr, die sich in Form einer Wanderwelle der Basilarmembran ausbreitet, kommt es zu einer relativen Verschiebung der Basilarmembran gegen die Tektorialmembran des Corti-Organs (Fettiplace, 2017). Aufgrund der Verbindung der distalen Spitzen der Stereozilien mit der Tektorialmembran kommt es zur Deflektion des HZ-Bündels. Die Deflektion in Richtung der längeren Stereozilien resultiert in der Öffnung von mechano-elektrischen Transduktionkanälen (MET) und in einer daraus folgenden

Depolarisation der ÄHZ (Fettiplace, 2017). Durch die Verschiebung von Chloridionen im Motorprotein Prestin kommt es zu einer spannungsabhängigen Konformationsänderung, die sich in einer Kontraktion der Zellen äußert (Zheng et al., 2000, Oliver et al., 2001). Durch die apikale und basale Verankerung der ÄHZ an der Tektorialmembran bzw. der Basalmembran führt die Kontraktion der ÄHZ zu einer Verstärkung der Auslenkung der Basilarmembran (Fettiplace, 2017). Die Signalverstärkung durch die ÄHZ ist erforderlich, da die Haarbündel der IHZ nicht mit der Tektorialmembran verbunden sind und es bei einem schwachen Stimulus nicht zu einer Ablenkung der HZ-Bündel der IHZ kommen würde. Die indirekte Stimulation des IHZ-Bündels durch die Elektromotilität der ÄHZ ist damit maßgebend für die hohe Frequenzselektivität, den breiten Dynamikbereich und der niedrigen Hörschwelle des menschlichen Hörsystems (Zelle et al., 2016).

Die efferente Innervation der ÄHZ erfolgt über Axone aus dem medialen Anteil des oberen Olivenkerns (Raphael und Altschuler, 2003). Durch die Freisetzung von Acetylcholin an den cholinergen Synapsen wird die axiale Beweglichkeit der ÄHZ reduziert und damit die cochleäre Verstärkerfunktion der ÄHZ abgeschwächt (Fuchs und Lauer, 2019). Somit schützt das olivocochleäre System vor zu hohen Schallintensitäten und verbessert durch die Diskrimination von zu lauten und störenden Hintergrundgeräuschen das Hörvermögen (Fuchs und Lauer, 2019).

Die afferente Innervation der ÄHZ erfolgt über die Typ-II-SGN. Hierbei handelt es sich um unipolare, unmyelinisierte Neurone, die im Gegensatz zu den Typ-I-SGN nur ein kleines Soma besitzen (Spoendlin, 1972). Insgesamt machen die Typ-II-SGN 5-10% der Gesamtpopulation der SGN aus (Spoendlin, 1972). Ein einzelnes Typ-II-SGN stellt in seinem Verlauf bis zu 30 synaptische Verbindungen zu den ÄHZ her (Spoendlin, 1972). Dabei wird eine ÄHZ jeweils von nur einem Typ-II-SGN innerviert (Spoendlin, 1972).

1.3. Innere Haarsinneszellen

Die Inneren Haarsinneszellen (IHZ) liegen den ÄHZ einreihig gegenüber. Sie besitzen einen birnenförmigen Zellkörper mit einem runden, zentral gelegenen Zellkern (Raphael und Altschuler, 2003). Apikal besitzen sie ein Haarzellbündel aus Stereozilien, der nicht mit der Tektorialmembran verbunden ist (Fettiplace, 2017).

Die Funktion der IHZ besteht in einer mechano-elektrischen Transduktion, also in einer Umwandlung der ankommenden Schallwellen in ein elektrisches Signal. Dies ist notwendig, da die Weiterleitung des Hörsignals von den afferenten SGN über die verschiedenen Stationen der Hörbahn bis zum auditiven Kortex nur in Form von elektrischen Signalen funktioniert.

Die mechano-elektrische Transduktion in den IHZ wird durch schallinduzierte Bewegungen der Endolymphe hervorgerufen, die eine synchrone Auslenkung der HZ-Bündel der IHZ induziert. Auslenkungen der IHZ-Bündel führen über die Tip-Links zur Öffnung der mechano-elektrischen Transduktionskanäle (Sakaguchi et al., 2009). Durch die hohe Potenzialdifferenz von +85mV in der Scala media und -70mV in der IHZ kommt es entlang der Spannungsdifferenz zu einem Einstrom von Ka^{+} und anderen Kationen, wie Na^{+} und Ca^{2+}, der die IHZ depolarisiert (Fettiplace, 2017). Es öffnen sich spannungsempfindliche Cav1.3 L-Typ Ca^{2+}-Kanäle, die sich an den präsynaptischen Freisetzungsstellen, den aktiven Zonen (AZ), befinden (Brandt et al., 2003). Jede IHZ besitzt, abhängig des Basalmembranabschnittes, zwischen 5-20 präsynaptische AZ (Meyer et al., 2009). Charakteristisch für die IHZ-Synapse sind die Bändersynapsen, die sich auf der basolateralen Plasmamembran der IHZ, in der Nähe der AZ befinden (Abbildung 1). Bändersynapsen sind für die andauernde und präzise Exozytose der mit Vglut3 gefüllten Vesikeln (SV) verantwortlich (Chakrabarti et al., 2018, Jean et al., 2018). Die höchste Dichte an Bändersynapsen wurde im midbasalen Bereich der Cochlea nachgewiesen, wo das Hören am empfindlichsten ist (Meyer und Moser, 2010).

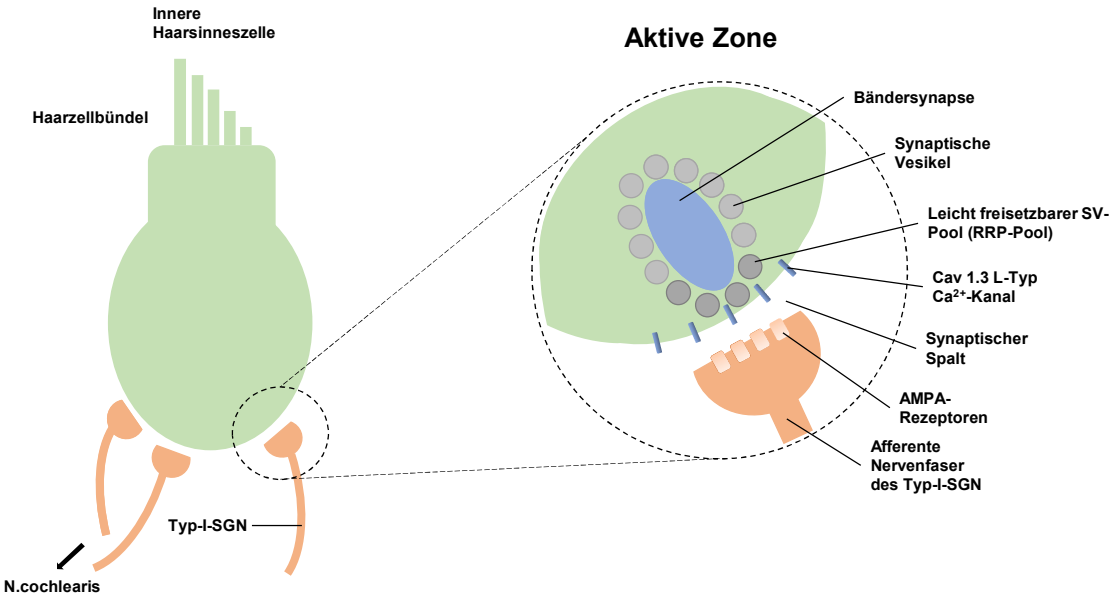

Abbildung 1: Schematische Darstellung der aktiven Zone der Inneren Haarsinneszellen (eigene Darstellung, angelehnt an (Parsons, 2006))

Die SV können nach ihrer Freisetzungskinetik in drei unterschiedlich funktionelle SV-Pools eingeteilt werden (Denker und Rizzoli, 2010, Rizzoli und Betz, 2005). Bei kurzer Depolarisation (bis zu 20ms) kommt es zu einer sofortigen Exozytose des leicht freisetzbaren SV-Pools (RRP), der sich in direkter Nähe zur AZ-Membran befindet (Rizzoli und Betz, 2005). Bei anhaltender Depolarisation (20-100ms) kommen nacheinander die SV des Recyling- und des Reserve-SV-Pool zum Einsatz, die durch filamentöse Strukturen der synaptischen Bänder in einer Art „Förderband"-Modell Richtung RRP befördert werden (Chakrabarti et al., 2018). Die Bändersynapsen der IHZ können durch Anpassung der SV-Freisetzungsrate die Intensität des Reizes modulieren (Glowatzki und Fuchs, 2002). Der dabei in den synaptischen Spalt ausgeschüttete Neurotransmitter Glutamat aktiviert AMPA- (α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure) Rezeptoren, die sich an den afferenten Dendriten der SGNs befinden (Glowatzki und Fuchs, 2002). Bereits kleine postsynaptische Potenziale können die SGN depolarisieren und ein Aktionspotenzial hervorrufen (Rutherford und Pangršič, 2012).

Jede AZ wird von einer einzelnen afferenten Faser der Typ-I-SGN innerviert, sodass eine einzelne IHZ mit ungefähr 5-20 afferenten Typ-I-Dendriten in Kontakt steht (Meyer et al., 2009). Bei den Typ-I-SGN handelt es sich um bipolare Neurone, die ein großes Soma besitzen, myelinisiert sind und insgesamt 90-95% der Gesamtpopulation der SGN ausmachen (Spoendlin, 1972). SGN vom Typ I sind verantwortlich für die Verarbeitung und Weiterleitung der Frequenz-, Zeit- und Intensitätsinformationen des ankommenden Schallreizes. Dies erklärt die große Bandbreite an unterschiedlichen Erregungscharakteristiken und Morphologien der Typ-I-SGN (Liberman, 2017). Typ-I-SGN können nach ihrer Spontanentladungsrate in drei Subpopulationen eingeteilt werden (Liberman, 1978). Man unterscheidet SGN mit hoher, mittlerer und niedriger Spontanentladungsrate (Liberman, 1978). Jede IHZ steht in Kontakt zu allen drei Subpopulationen, jedoch finden sich die SGN mit niedrigem Spontanentladungsraten und hohen Schwellenwerten tendenziell auf der Seite der IHZ, die dem Rosenthal-Kanal zugewandt ist (Liberman, 1982, Liberman und Oliver, 1984). Der Faserquerschnitt ist bei dieser Subpopulation dünn (Liberman, 1982, Liberman und Oliver, 1984) und sie besitzen ihren dynamischen Bereich für mittellaute und laute Töne (Niwa et al., 2021). Im Vergleich dazu finden sich die SGN mit einer hohen Spontanentladungsrate und niedrigen Schwellenwerten tendenziell auf der Seite der IHZ, die dem Rosenthal-Kanal abgewandt ist (Liberman, 1982, Liberman und Oliver, 1984). Der Faserquerschnitt ist bei dieser Subpopulation relativ dick (Liberman, 1982, Liberman und Oliver, 1984) und sie besitzen ihren dynamischen Bereich für sehr leise und leise Töne (Niwa et al., 2021). SGN mit hohen Spontanentladungsraten und niedrigen Schwellenwerten sind hauptsächlich in den midbasalen Abschnitten der Cochlea zu finden. Dieser Abschnitt korreliert mit dem am besten wahrgenommenen Frequenzbereich (Liu und Davis, 2007, Davis und Crozier, 2015). Dieser liegt beim Menschen zwischen 3500Hz und 4000Hz. Bislang konnte noch nicht geklärt werden, wie genau die SGN zu einer weiteren Verarbeitung des Hörsignals beitragen. Mehrere elektrophysiologische Studien zeigen die hohe Variabilität und Komplexität der Reizweiterleitung von Typ-I-SGN auf (Liu und Davis, 2007, Davis und Crozier, 2015). Liu, Davis, et al. konnten bei Untersuchungen zur Verteilung der SGN in

der Cochlea feststellen, dass hochfrequente SGN vermehrt in den basalen Cochlea-Abschnitten und die niederfrequenten SGN vermehrt in den apikalen Abschnitten der Cochlea zu finden sind (Liu und Davis, 2007). Es ist daher anzunehmen, dass diese Verteilung für die frequenzabhängige akustische Verarbeitung einen wichtigen Beitrag leistet (Liu und Davis, 2007).

1.4. Audiometrie

Die audiometrischen Messverfahren dienen der Funktionsüberprüfung des Hörorgans. Auf diese Weise lassen sich Aussagen über die Hörleistung treffen sowie Diagnosen zu pathologischen Prozessen im Bereich des Ohres und der Hörbahn stellen. In der Audiometrie wird zwischen subjektiven und objektiven Messverfahren unterschieden. Objektive Verfahren sind nicht auf die Compliance der Patienten angewiesen und finden daher unter anderem beim Neugeborenen-Hörscreening sowie in der Forschung mit Labortieren Anwendung. Im Folgenden werden zwei objektive Messverfahren vorgestellt, die für die Funktionsüberprüfung der Hörbahn und der ÄHZ von Relevanz sind.

1.4.1. Otoakustische Emissionen

Otoakustische Emissionen (OAE) sind retrograd erzeugte Schallaussendungen, die durch die Elektromotilität der ÄHZ entstehen und mittels Messmikrophon im äußeren Gehörgang gemessen werden können (Kemp, 1978). Man unterscheidet zwei Arten von OAE: Die spontanen OAE, die ohne zuvor erfolgten Stimulus im äußeren Gehörgang gemessen werden können (Zurek, 1981) und die evozierten OAE. Letztere werden im klinischen Alltag entweder durch breitfrequente Klickreize (transitorisch evozierten OAE) oder durch zwei Sinustöne f_1 und f_2 unterschiedlicher Intensitäten ($f_1<f_2$) gemessen (Distortionsprodukt otoakustischer Emissionen, DPOAE) (Zelle et al., 2016). Die zwei Sinustöne f_1 und f_2 unterschiedlicher Intensitäten ($f_1<f_2$) werden ihrer Frequenz entsprechend durch ÄHZ amplifiziert (Zelle et al., 2016). Durch die

Elektromotilität verursachen die ÄHZ neue Schwingungen der Basilarmembran, die retrograd fortgeleitet werden und über das Mittelohr und das Trommelfell einen im Gehörgang messbaren Ton erzeugen (Zelle et al., 2016). Beim Menschen kann eine maximal große Schalldruckamplitude durch Distorsionsproduktemissionen mit der Frequenz $2f_1$-f_2 hervorgerufen werden (Gorga et al., 1997). Fehlende DPOAE weisen auf Pathologien im Mittel- und auch Innenohr hin, jedoch besitzen sie keinen diagnostischen Wert über die Integrität der IHZ und der Hörbahn.

1.4.2. Akustisch evozierte Potenziale

Ab der mechanoelektrischen Transduktion in den IHZ erfolgt die Reizweiterleitung des Hörsignales über Nervenzellen, die in Form von Aktionspotenzialen miteinander kommunizieren. Ein Aktionspotential äußert sich durch eine Veränderung des elektrischen Membranpotenzials, welches bei den SGN-Typ-I bereits am ersten halben Ranvier-Schnürring im Dendriten entsteht und sich anschließend Richtung Axon ausbreitet (Liu et al., 2021). Gleichzeitig auftretende Aktionspotenziale mehrerer Nervenzellen können über den gesamten Verlauf der Hörbahn durch am Kopf angebrachte Elektroden als Summenpotenziale in Form von 25-30 charakteristische Wellen registriert werden. Nach ihrem zeitlichen Auftreten werden die Wellen in frühe Potenziale (10ms nach dem Reiz), mittlere Potenziale (zwischen 10-50ms nach dem Reiz) und späte Potenziale (zwischen 50-300ms nach dem Reiz) eingeteilt. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die frühen akustisch evozierten Potenziale (FAEP, engl. Auditory brainstem response (ABR)) von Relevanz für die Bestimmung von Hörschwellen sowie die Topodiagnostik patologischer Prozesse entlang des N.cochlearis und des Hirnstammes. Entsprechend der Erstbeschreibung durch Jewett und Williston 1971 werden die Wellen der FAEP der Reihenfolge nach mit den römischen Ziffern I-VII benannt (Jewett und Williston, 1971). Bei der diagnostischen Auswertung erfolgt eine Zuordnung der Wellen entsprechend ihres anatomischen Entstehungsortes (Abbildung 2). Die

Welle I tritt aufgrund der synaptischen Übertragung zwischen IHZ und SGN mit einer Latenzzeit von 1-2ms auf. Da sich die Zellkörper der SGN im Rosenthalkanal der Cochlea befinden, kann dort das Summenpotenzial als Welle I registriert werden (Buchner, 2005). Somit wird die Welle I dem Nervus cochlearis zugeordnet (Buchner, 2005). Die zweite synaptische Übertragung erfolgt im Nucleus cochlearis. Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung von Nervenzellkörpern im Hirnstamm, die aufgrund des ankommenden elektrischen Signals depolarisieren. In den ABR-Messungen können die einzelnen Aktionspotenziale der Nervenzellkörper des Nucleus cochlearis als Summenpotenzial der Welle II zugeordnet werden (Buchner, 2005). Die im Anschluss auftretende Welle III ist dem Nucleus olivaris superior und die Welle IV dem Leminiscus lateralis zuzuordnen (Buchner, 2005). Die Welle V wird dem Colliculus inferior zugeordnet (Buchner, 2005). Die anatomischen Entstehungsorte der Wellen VI und VII konnten bislang noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Man geht jedoch davon aus, dass sie in den Regionen des Corpus geniculatum laterale (Welle VI) und der Radiatio acustica (Welle VII) entstehen.

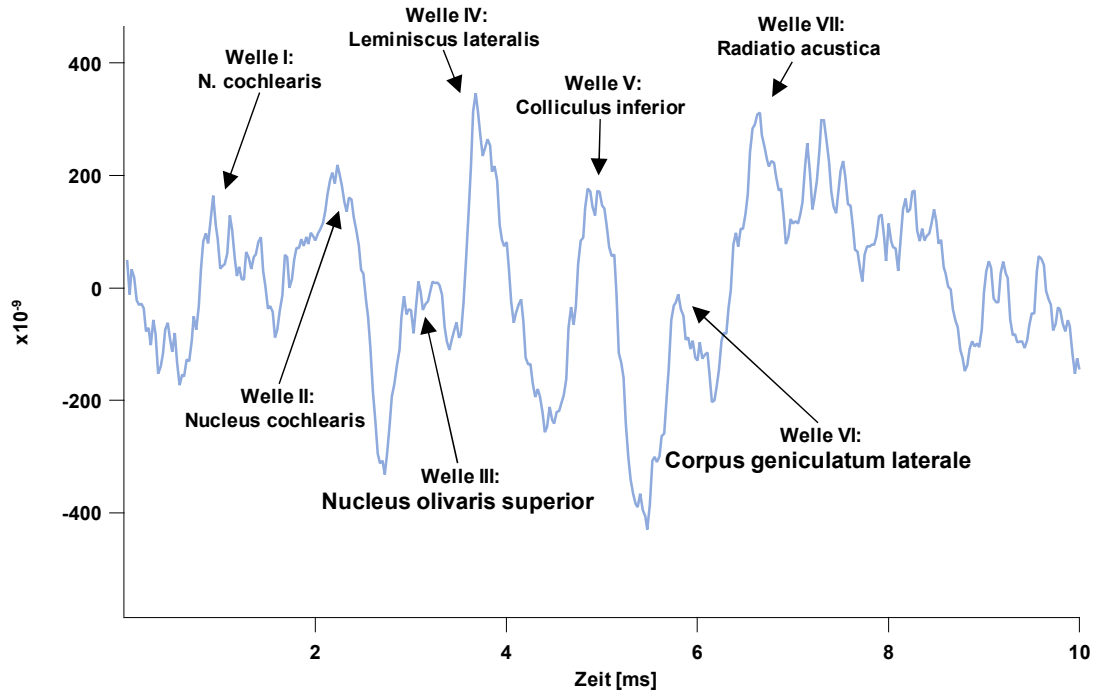

Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer ABR-Messung. Zu sehen sind die ABR-Wellen I-VII mit dem zugeordneten anatomischen Entstehungsort bei einer transduzierten Otoferlin-KO-Maus auf kurze Klickreize (20Hz).

1.5. Otoferlin

Otoferlin ist ein Protein, welches im Zytosol und an der Plasmamembran der IHZ exprimiert wird (Roux et al., 2006). Es gehört zur Familie der Ferline und wird durch das *OTOF*-Gen, welches sich auf dem Chromosom 2 an Position p23.1 befindet, kodiert (Yasunaga et al., 1999). Bislang konnten beim Menschen zwei lange und drei kurze Isoformen von Otoferlin identifiziert werden (Vona et al., 2020), wobei die lange Isoform für die normale Hörfunktion von entscheidender Bedeutung ist (Yasunaga et al., 2000). Es wurde einige Zeit davon ausgegangen, dass die lange Otoferlin Isoform sechs C2-Domänen (C2A-C2F) besitzt (Yasunaga et al., 1999, Yasunaga et al., 2000, Roux et al., 2006, Pangršič et al., 2012). Den jüngsten Strukturanalysen zufolge scheint sich die Otoferlin-Isoform jedoch aus acht C2-Domänen zusammenzusetzen (Dominguez et al., 2022). Vom Aminoterminus (N-Terminus) zum Carboxylterminus (C-Terminus) werden diese acht C2-Domänen als C2A bis C2G beziffert (Abbildung 3) (Dominguez et al., 2022). C2-Domänen sind charakteristische strukturelle Elemente der Ferline. Sie sind aufgrund der Protein-, Ca^{2+}- und Phospholipid-bindenden Wirkung essentiell für Zellmembraninteraktionen (Yasunaga et al., 1999, Johnson und Chapman, 2010, Pangršič et al., 2012).

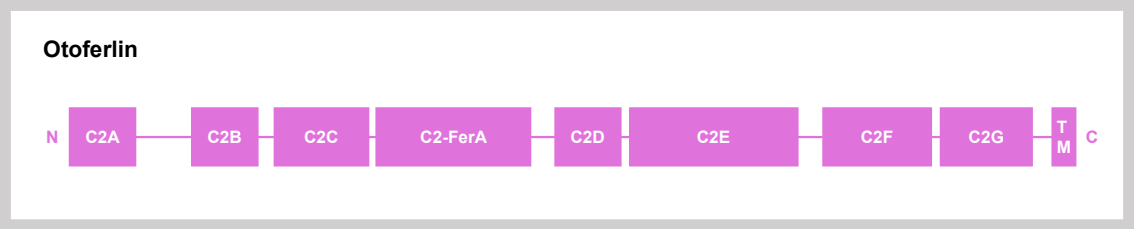

Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Otoferlin, adaptiert nach (Dominguez et al., 2022). Zu sehen sind die C2-Domänen, die vom N-Terminus zum C-Terminus als C2A-C2G beziffert werden. Die C2-FerA-Domäne befindet sich zwischen C2C und D2D. Die Transmembrandomäne ist am C-Terminus des Proteins zu finden.

Mit Hilfe der Analysen von Otoferlin-Knock-out-Mäusen (*Otof*-KO) konnte gezeigt werden, dass eine vollständig fehlende Otoferlin Expression im Innenohr zu hochgradiger Taubheit führt (Roux et al., 2006, Reisinger et al., 2011). Da sich der Defekt auf die Signalübertragung zwischen IHZ und SGN auswirkt, besitzen

diese Mäuse bei entsprechender Stimulation keine messbaren Hirnstammpotentiale (Roux et al., 2006, Reisinger et al., 2011). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *Otof*-KO-Mäuse eine normale Vesikelanzahl pro IHZ besitzen, die Vesikelexozytose aber verlangsamt und unabhängig der Depolarisation und des Ca^{2+}-Einstromes stattfindet (Roux et al., 2006). Deshalb wird angenommen, dass Otoferlin als Ca^{2+}-Sensor eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+}-abhängigen Vesikel-Exozytose, insbesondere dem Vesikel-Priming und der Vesikel-Fusion an der präsynaptischen Membran, spielt (Roux et al., 2006).

Studien am Mausmodell ergaben, dass Otoferlin auch Aufgaben im Bereich der Ca^{2+}-abhängigen Wiederauffüllung des RRP zu übernehmen scheint. Dies zeigten Pangrsic et al. 2010 an Pachanga-Mäusen *(Otof$^{Pga/Pga}$)*, die aufgrund einer N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff-vermittelten p.Asp1767Gly (D1767G) Fehlmutation ebenfalls hochgradig taub sind (Pangršič et al., 2010). Durch die Missense-Mutation sind nur circa 30% der normalen Otoferlin-Menge in den IHZ der *Otof$^{Pga/Pga}$*–Mäuse nachweisbar, was sich in einer verlangsamten RRP-Vesikelauffüllung und reduzierten SV-Exozytose bei längerer IHZ-Depolarisation bemerkbar macht (Pangršič et al., 2012). Die RRP-Vesikelexozytose bei Depolarisation der IHZ bis zu 10ms funktioniert trotz verringerter Otoferlin- Menge weiterhin (Pangršič et al., 2010). Auch das SV-Tethering und -Docking unterscheidet sich nicht von den Wildtyp-Mäusen (WT) (Chakrabarti et al., 2018).

Zusätzlich scheint die SV-Bindung im Zusammenhang mit einer korrekten Expression von Otoferlin zu stehen. *Otof$^{C2C/C2C}$*-Mäuse, eine Otoferlin Mausmutante, bei der die Ca^{2+}-Bindungsaffinität der C2C-Domäne aufgrund von zwei Missense-Mutationen verändert ist, weisen einen erhöhten Abstand zwischen bandassoziierten SV-Pool zur Bändersynapse auf (Michalski et al., 2017). Auch *Otof*-KO-Mäuse zeigen eine veränderte Länge der Filamente (Vogl et al., 2015).
Otoferlin kann jedoch nicht nur in Zusammenhang mit verschiedenen Schritten der Exozytose gebracht werden. 2014 konnten Revelo et al. nachweisen, dass die Otoferlin-Immunfluoreszenz mit den neu endozytierten Organellen korreliert,

sodass das Protein auch beim SV-Recycling eine Rolle zu spielen scheint (Revelo et al., 2014). Zusätzlich wird angenommen, dass Otoferlin unter anderem mit dem Adaptorptotein-Komplex AP-2 interagiert, der sowohl an der AZ-Clearance als auch an der SV-Neubildung beteiligt ist (Jung et al., 2015).

Es wird angenommen, dass Otoferlin für die Zellreifung, die regelrechte Anlage und Morphologie der IHZ nicht benötigt wird, da die Anzahl und Morphologie der IHZ bei *Otof*-KO-Mäusen nicht von den WT-Mäusen zu unterscheiden ist (Roux et al., 2006, Pangršič et al., 2010). Jedoch scheint Otoferlin wichtig für den Erhalt der Bandsynapsen zu sein. Stalmann et al. zeigten 2021, dass *Otof*-KO-Mäuse ab dem 14.postnatalen Tag (p14) eine Abnahme der IHZ-Bandsynapsen aufweisen, obwohl am ersten postnatalen Tag (p1) mehr Bandsynapsen vorhanden sind als bei den WT-Mäusen (Stalmann et al., 2021).

An den Synapsen des zentralen Nervensystems übernimmt das bereits gut charakterisierte Protein Synaptotagmin-1 (Syt1), ähnliche Aufgaben der Ca^{2+}-abhängigen Vesikel-Exozytose und -Wiederauffüllung des RRP. Deshalb versuchten Reisinger et al. 2011 Otoferlin durch Syt1 in den IHZ bei *Otof*-KO-Mäusen zu ersetzen (Reisinger et al., 2011). Trotz hoher viraler Transduktionsraten und einer korrekten Ausrichtung von Syt1, konnte keine Verbesserung hinsichtlich der Vesikel-Exozytose und der Hörleistungen erreicht werden (Roux et al., 2006, Reisinger et al., 2011). Es besteht demnach die Hypothese, dass Otoferlin in seiner Funktion nicht durch ein Protein substituiert werden kann, welches eine ähnliche Funktion in Bezug auf synaptische Verbindungen zu übernehmen scheint.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genaue Rolle von Otoferlin in den IHZ immer noch unbekannt ist, das Protein jedoch mit vielen verschiedenen zellulären Prozessen der SV-Exozytose und -Endozytose in den IHZ in Verbindung gebracht werden kann (Al-Moyed, 2019).

1.6. DFNB9- Auditorische Synaptopathie

Schwerhörigkeit stellt die häufigste sensorische Beeinträchtigung beim Menschen dar und tritt bei einem von 1000 Neugeborenen auf (Morton und Nance, 2006). In den Industrieländern ist ein großer Anteil der Schwerhörigkeit genetisch bedingt und manifestiert sich ohne das Vorliegen eines Syndroms (Morton und Nance, 2006). Mittlerweile konnten über 150 Gene identifiziert werden, die mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit assoziiert sind (Walls WD). Dazu gehört auch das *OTOF*-Gen, welches sich auf Chromosom 2p23.1 befindet und das Protein Otoferlin kodiert (Chaïb et al., 1996). Otoferlin wird für eine korrekte Signalübertragung zwischen IHZ und den SGN benötigt. Pathogene *OTOF*-Varianten führen beim Menschen zu DFNB9 (*Otof*-bedingte Taubheit) einem prälingualen autosomal- rezessiven nicht syndromalen Hörverlust (Yasunaga et al., 1999). Die Prävalenz von *OTOF*-bedingter Taubheit variiert je nach Bevölkerungshintergrund im einstelligen prozentualen Bereich. So konnte beispielsweise bei 3% der spanischen Bevölkerung Otoferlin als Ursache für eine Hörstörung identifiziert werden (Rodríguez-Ballesteros et al., 2008), während es in der türkischen Bevölkerung 5% waren (Duman et al., 2011). Weltweit sind ungefähr 200.000 Menschen von DFNB9 betroffen. Damit zählt DFNB9 zu den seltenen Erkrankungen.

Aufgrund der fehlenden synaptischen Übertragung zwischen den IHZ und den SGN wird DFNB9 auch als auditorische Synaptopathie bezeichnet (Moser und Starr, 2016). DFNB9 zeichnet sich klinisch durch fehlende ABR-Wellen bei vorhandenen otoakustischen Emissionen (OAE) aus (Roux et al., 2006, Varga et al., 2003). Es konnte jedoch bei den Patienten eine fortschreitende Verschlechterung der gemessenen OAE-Ergebnisse festgestellt werden, die bis zu einem vollständigen Ausbleiben innerhalb der ersten beiden Lebensjahre reichte. (Kitao et al., 2019). Es wird diskutiert, ob der Funktionsverlust der ÄHZ auf den Ausfall der IHZ-Synapsen und damit den Ausfall der afferenten Information zurückzuführen ist (Starr et al., 1996, Vona et al., 2020). Damit würde die efferente Inhibition, die eine Schutzwirkung für die ÄHZ darstellt, ausbleiben

und zu einem erhöhten Lärmtrauma an den ÄHZ führen (Vona et al., 2020, Starr et al., 1996).

Bislang konnten 219 pathogene und wahrscheinlich pathogene Varianten des *OTOF*-Gens identifiziert werden (Vona et al., 2020, Azaiez et al., 2018), bei denen häufig die C2-Domänen des Proteins betroffen sind (Rodríguez-Ballesteros et al., 2008). Abhängig von der pathogenen *OTOF*-Variante variiert der Schweregrad der Hörstörung und kann von mäßigem Hörverlust bis hin zu hochgradiger Taubheit (Hörschwelle >90dB) reichen. Vorzeitige Stop- und Frameshift-Varianten führen meistens zu einer ausgeprägten prälingualen Taubheit (Vona et al., 2020). Nicht trunkierende Varianten können sich je nach Lokalisation und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der veränderten oder gelöschten Aminosäureresten auf die Proteinstabilität und den Proteinabbau in den IHZ auswirken (Vona et al., 2020). Dies führt zu einem variablen Phäntotyp, der sich beispielsweise in einer progressiven oder temperaturempfindlichen Form der *OTOF*-Hörstörung äußert (Vona et al., 2020). Die erste entdeckte Variante, welche eine temperaturempfindliche auditorische Synaptopathie verursacht, konnte auf eine p.Ile515Thr-Mutation zurückgeführt werden (Varga et al., 2006). Menschen mit einer p.Ile515Thr-Mutation haben nahezu normale Reintonaudiogramme mit einem leichten Hörverlust im Tieffrequenzbereich (Varga et al., 2006). Bei Erhöhung der Körperkerntemperatur sinkt die Reintonschwelle bis zur völligen Taubheit (Varga et al., 2006). Bei dem entsprechend untersuchten Mausmodell von *Otof*$^{I515T/I515T}$-Mäusen konnten Patch-Clamp-Aufnahmen einen Rückgang der Exozytose bei erhöhter Temperatur zeigen, die den Hörverlust erklären (Strenzke et al., 2016). Zusätzlich zeigten *Otof*$^{I515T/I515T}$-IHZ einen um 65% verringerten Otoferlinspiegel mit einem Mangel an auffüllenden Vesikeln bei lang anhaltenden akustischen Reizen (Strenzke et al., 2016). Dies stellt das Korrelat der beim Menschen mit einer p.Ile515Thr-Mutation beobachteten Hörermüdung dar, die sich in einem verschlechterten Sprachverständnis bei Hintergrundgeräuschen zeigt (Varga et al., 2006).

In allen Fällen ist die rechtzeitige und frühe klinische Diagnostik von großer Bedeutung für die Patienten, da bei Kleinkindern bereits ein leichter Hörverlust zu Beeinträchtigungen der Entwicklung und des Spracherwerbes führen kann (Sininger et al., 1999). Im Rahmen des Neugeborenen-Hörscreenings werden audiometrische Messverfahren eingesetzt, um eine möglichst frühzeitige Feststellung einer Beeinträchtigung des Hörsinns zu ermöglichen und eine entsprechende Therapie zeitnah einzuleiten. Dies umfasst Messungen der DPOAE-Messungen zur Überprüfung der Funktion der ÄHZ sowie ABR-Messungen zur Überprüfung der IHZ, der synaptischen Übertragung und der Hörbahn. Therapie der Wahl bei Patienten mit DFNB9 sind Cochlea-Implantate. Eine Gentherapie könnte jedoch eine vielversprechende Therapiealternative darstellen, das Gehör wiederherzustellen (siehe Kapitel 1.8).

1.7. Cochlea-Implantate

Cochlea-Implantate (CI) sind elektronische Hörprothesen, deren Funktionsweise auf der direkten Stimulation der SGN durch elektrische Impulse beruht. Dies ermöglicht eine Umgehung der Signalübertragung bei defekten oder fehlenden Haarsinneszellen. Dadurch sind Cochlea-Implantate mittlerweile zu einer Standardbehandlung bei Erwachsenen und Kindern mit schwerem bis hochgradigem Hörverlust geworden (Shearer und Hansen, 2019).

Cochlea-Implantate bestehen aus einem extern getragenen Teil und dem eigentlichen Implantat, welches im Felsenbein *(Pars oetrosa ossis temporalis)* verankert wird und Zugang zur Hörschnecke besitzt. Der externe Teil wird wie ein Hörgerät hinter dem Ohr getragen und übernimmt die Schallaufnahme durch ein Mikrofon und die Schallverarbeitung durch einen Signalprozessor. Der Signalprozessor muss das Schallsignal in seine physikalischen Eigenschaften, wie Frequenz, Intensität und Zeitverlauf, kodieren. Über die Sendespule wird das verarbeitete Schallsignal durch die Kopfhaut an die darunterliegende Empfangsspule gesendet, die zusammen mit dem Elektrodenträger, der in die Hörschnecke eingeführt wird, das eigentliche Implantat darstellt. In Abhängigkeit

des Herstellers und des Implantattyps sind auf dem Elektrodenträger zwischen 12 und 22 Elektroden angebracht, welche die SGN entsprechend der tonotopen Organisation stimulieren (Mühler, 2010). Eine Studie aus dem Jahr 2021 verglich dazu die Tonhöhendiskrimination bei CI-Trägern mit Elektrodenarrays der MED-EL CIs (Innsbruck, Österreich), bestehend aus 12 Elektrodenkontakten mit den Elektrodenarrays der Culeus Cis (Cochlear Ltd., Sydney, Australien), bestehend aus 22 Elektrodenkontakten (Wagner et al., 2021). Die Studie zeigt, dass eine erhöhte Anzahl an Elektrodenkontakte und damit auch die Breite des Frequenzbandes nicht zu einer verbesserten Tonhöhendiskrimination führt (Wagner et al., 2021).

Das Outcome von Cochlea-Implantationen ist bei Menschen mit *OTOF*-Mutation umfassend erforscht (Zheng und Liu, 2020). Es konnte festgestellt werden, dass das CI-Ergebnis, unabhängig von der Art der *OTOF*-Mutation, durchgehend als gut bis ausgezeichnet bewertet wurde (Chen et al., 2018). Nach der CI-Implantation wurde neben einer optimierten Schallwahrnehmung auch eine deutliche Verbesserung der Sprachverständnisfähigkeit beobachtet (Rouillon et al., 2006, Zheng und Liu, 2020). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine frühe Implantation zu besseren Resultaten hinsichtlich des Hörens und des Sprachverständnisses führt (Zheng und Liu, 2020, McConkey Robbins et al., 2004). Dies ist bedingt durch ein Zeitfenster zwischen Geburt und dem dritten Lebensjahr, in dem das kindliche Gehirn aufgrund seiner Plastizität durch auditive Reize neue neuronale Bahnen entwickeln kann (Vincenti et al., 2014, Sharma et al., 2005). Spätere CI-Implantationen können sich aufgrund der vorangegangenen mangelnden auditiven Informationen negativ auf die normale Entwicklung des Hörsystems und der Sprachkenntnisse der hörbeeinträchtigten Kinder auswirken (Vincenti et al., 2014). Auch Kaltorp et al. (2017) stellten fest, dass früh (<12 Monate) implantierte Patienten deutlich bessere Ergebnisse, hinsichtlich der Sprachentwicklung erzielten als spät (>12 Monate) implantierte Patienten (Karltorp et al., 2020). Eine multizentrische Studie aus dem Jahr 2016 konnte zudem zeigen, dass eine Cochlea-Implantation vor dem ersten Lebensjahr zu einer verbesserten Sprachwahrnehmung und einem optimierten

Spracherwerb führt und darüber hinaus die Genauigkeit der Sprachproduktion erhöht. (Dettman et al., 2016).

Trotz der fortschreitenden technischen Entwicklungen sind das Sprachverständnis bei Lärm und die musikalische Klangwahrnehmung bei Patienten mit CI-Implantation noch eingeschränkt (Bruns et al., 2016, Dorman und Gifford, 2017). Dies ist einerseits bedingt durch den Informationsverlust, der durch die Umwandlung des akustischen Signals in ein elektrisches Signal einhergeht (Adunka und Kiefer, 2005). Ein weiterer Aspekt betrifft die begrenzte Frequenzauflösung, da im Vergleich zu den IHZ bei den Elektrodenkontakten größere Neuronenpopulationen stimuliert werden (Wagner et al., 2021).

1.8. Gentherapie

Die Gentherapie beruht auf dem Einbringen von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in Körperzellen, um dort ein defektes Gen durch eine funktionstüchtige Kopie zu ersetzen (Hallek et al., 2001). Für den Gentransfer werden Vektoren benötigt, die das genetische Material mit hoher Effizienz und Selektivität in die Zielzellen bringen, ohne dabei eine schädliche Langzeitwirkung hervorzurufen (Hallek et al., 2001). Es hat sich gezeigt, dass Adeno-assoziierte Viren (AAV) zu den sichersten und wirksamsten Vektoren gehören (Au et al., 2022). Aufgrund dieser Eigenschaften finden sie in der Gentherapie breite Anwendung (Au et al., 2022). Auch für die gentherapeutische Anwendung in der Cochlea werden AAV genutzt (Lee und Park, 2018).

AAV sind kleine, unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen DNA, bestehend aus den kodierenden Sequenzen Rep (Replikation) und Cap (Capsid) (Hermonat und Muzyczka, 1984). Flankiert wird das virale Genom von zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (engl. Inverted Terminal Repeats (ITR)) (Au et al., 2022). AAV sind für die Replikation ihres viralen Genoms auf Helferviren angewiesen (Au et al., 2022). Bei der Herstellung von rekombinanten

AAV für die Gentherapie bleiben die ITR in situ, während die kodierenden Sequenzen durch einen Promotor, das Transgen und einen Terminator (beispielsweise durch eine Polyadenylierungssequenz (polyA)) ersetzt werden (Au et al., 2022, Hermonat und Muzyczka, 1984). Die Rep- und Cap-Sequenzen und die Helfergene für die Replikation werden von separaten Plasmiden geliefert (Au et al., 2022, Aponte-Ubillus et al., 2018, Hermonat und Muzyczka, 1984). Da das Capsid für den Gewebetropismus des Virus verantwortlich ist, kann dieser durch eine Auswechslung des Capsids angepasst werden (Au et al., 2022). Bei der Erzeugung sogenannter pseudo-typisierter Vektoren (z.B. AAV2/6) wird das Genom des einen AAV-Serotyp genutzt (z. B. von AAV2), während die Cap-Gene durch einen anderen AAV-Serotyp (z.B. von AAV6) geliefert werden (Abbildung 4) (Au et al., 2022).

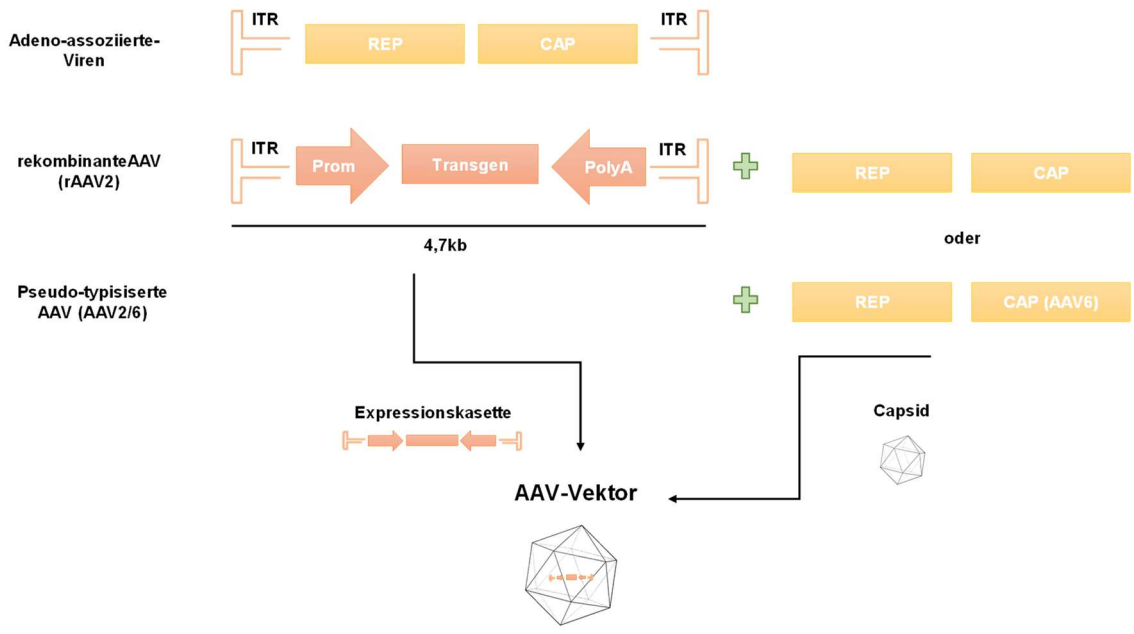

Abbildung 4: Herstellung eines rekombinanten AAV-Vektors (rAAV2) (eigene Grafik, angelehnt an (Adamson et al., 2002, Au et al., 2022). Die kodierenden Sequenzen des AAV2 werden durch einen Promotor, das Transgen und die PolyA-Sequenz ersetzt. Die Rep- und Cap-Sequenzen werden durch separate Plasmide geliefert. Für die Herstellung eines pseudo-typisierten AAV(2/6) werden die Cap-Gene durch das AVV6 geliefert.

Eine große Herausforderung bei der gentherapeutischen Nutzung von AAV ist ihre kleine Genomgröße von 4,7kb. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Transgen- Expressionskassette nicht größer als die Wildtyp-AAV-Genom Größe

sein sollte, da dies zu einer verminderten Transgen- Verpackungseffizienz und zur zufälligen Verkürzung des Transgens führt (McClements und MacLaren, 2017, Dong et al., 2010). Um die verminderte Verpackungseffizienz der AAV bei der Transduktion von größeren codierenden Sequenzen, zu denen mit 6kb auch das *OTOF*-Gen gehört, zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt. Dazu gehört neben der "Oversize/Overload"-Strategie, die jedoch zu verkürzten Fragmenten des Transgens führten, das erfolgreichere Split-AAV-System (Yan et al., 2000, Duan et al., 2001, Chamberlain et al., 2016, McClements und MacLaren, 2017).

Das Prinzip des Split-AAV-Systems beruht auf der Aufteilung der großen Transgen-Expressionskassette in zwei (oder drei) Fragmente, welche anschließend separat auf die AAV-Vektoren aufgeteilt werden (Chamberlain et al., 2016, McClements und MacLaren, 2017). Somit erhält der erste AAV-Vektor die erste Hälfte der kodierenden Sequenz mit dem Promotor (5`CDS), während auf den zweiten AAV-Vektor die zweite Hälfte der kodierenden Sequenz (3`CDS) mit der Polyadenylierungssequenz (polyA) an dem 5`-Ende übertragen wird (Chamberlain et al., 2016, McClements und MacLaren, 2017). Wie bei dem Wildtyp-AAV-Genom wird die Transgen-Expressionskassette von den ITR-Sequenzen flankiert (Chamberlain et al., 2016, McClements und MacLaren, 2017). Drei verschiedene Techniken sorgen bei dem Split-AAV-System für den richtigen intrazellulären Zusammenbau des Transgens. Dazu gehört die Überlappungs-Strategie, die Trans-Splicing-Strategie und die Hybrid-Strategie.
Bei der Überlappungs-Strategie wird der Zusammenbau durch überlappende homologe Transgen-cDNA-Regionen vermittelt. Diese befinden sich auf den 5`CDS-Fragmenten stromabwärts und auf den 3`CDS-Fragmenten stromaufwärts (Chamberlain et al., 2016, McClements und MacLaren, 2017). Studien konnten zeigen, dass die rekombinanten Eigenschaften der überlappenden Sequenzen entscheidend für den Erfolg der richtigen Zusammensetzung des Transgens sind (Lostal et al., 2014, McClements und MacLaren, 2017).

Bei der Trans-Splicing-Strategie (TS) wird die Konkatemerisation der AAV genutzt (Yan et al., 2000). Hierbei handelt es sich um eine Eigenschaft der AAV, durch nicht homologes Endjoining ihrer ITRs, mehrere Transgenkopien zu einer stabilen zirkulären Kopf-Schwanz-Episomstruktur zu verbinden (Yan et al., 2000). Für die Entfernung der ITRs aus den Episomen sorgen bei der Transkription Spleiß-Donor-Stellen (SD) an den 3‘-Enden der 5‘-AAV-Halbvektoren und Spleiß-Akzeptor-Stellen (SA) an den 5‘-Enden der 3‘-AAV-Halbvektoren (Yan et al., 2000, Chamberlain et al., 2016, McClements und MacLaren, 2017).

Die Hybrid-Strategie (Hyb) nutzt bei der Zusammensetzung des Transgens sowohl die homologe Rekombination der Overlapping-Strategie, als auch die Konkatemerisierung der Trans-Splicing-Strategie (McClements und MacLaren, 2017). Bei den überlappenden Sequenzen handelt es sich um genetisch fremde, hoch rekombinante Sequenzen, wie beispielsweise Regionen aus den Sequenzen der alkalischen Phosphatase (AP) oder der F1-Phagen (AK) (McClements und MacLaren, 2017).

Die Applikation des hergestellten Gentherapeutikums ist aufgrund der komplexen anatomischen Struktur und Funktion des Innenohres eine Herausforderung bei der gentherapeutischen Anwendung in der Cochlea (Lee und Park, 2018). Für eine Minimierung der Schädigung des Innenohrgewebes wurden deswegen verschiedene Applikationswege getestet. Dazu gehört die Applikation durch die Membran des runden Fensters, bei der das zu transferierende Gen in die mit Perilymphe gefüllte Scala Tympani eingebracht wird (Lee und Park, 2018). Ein weiterer Applikationsweg stellt auch die Injektion in die Bogengänge des Vestibularorgans dar, bei der eine Öffnung per Canalostomie durchgeführt wird (Talaei et al., 2019). Das zu transferierende Gen diffundiert anschließend über die Bogengänge in die cochlären Strukturen (Talaei et al., 2019). Das Cochlea-Gewebe kann sehr empfindlich auf Veränderungen in der Zusammensetzung und Menge der Innenohrflüssigkeiten reagieren (Lee und Park, 2018, Al-Moyed, 2019). Somit können sich Veränderungen, die durch die Applikation der

therapeutischen Wirkstoffe in die Cochlea hervorgerufen werden, negativ auf den Hör- und Gleichgewichtssinn auswirken (Lee und Park, 2018).

Bislang zeigen mehrere Studien, dass die AAV-vermittelte Gentherapie in Mausmodellen das Gehör erfolgreich wiederherstellen kann (Akil et al., 2019, Al-Moyed et al., 2019). Zusätzlich zeigen auch aktuelle klinische Studien aus 2024 2024, dass die Umsetzung der AAV-vermittelten Gentherapie am Menschen ebenfalls Erfolge verzeichnet (Qi et al., 2024, Lv et al., 2024). Die Qi et al. Studie berichtet über die erfolgreiche AAV-Injektion an zwei Kinder im Alter von 5 und 8 Jahren, bei denen jeweils eine heterozygote *OTOF*-Mutation identifiziert werden konnte (Qi et al., 2024). Nach der AAV-vermittelten Gentherapie eine deutliche Hörverbesserung aufwiesen, die durch ABR- Messungen und Reintonaudiogrammen verifiziert wurden (Qi et al., 2024).

1.9. Fragestellung und Zielsetzung

Das Multi-C2-Domänen-Protein Otoferlin spielt eine essentielle Rolle beim Hörprozess und der synaptischen Übertragung in den Inneren Haarsinneszellen (Roux et al., 2006). Eine Mutation innerhalb des *OTOF*-Gens, welches für Otoferlin codiert, führt beim Menschen zur nicht-syndromalen rezessiven Schwerhörigkeit DFNB9 (Yasunaga et al., 1999). Der Schweregrad der Schwerhörigkeit variiert in Abhängigkeit von der vorliegenden pathologischen *OTOF*-Variante und reicht von mäßigem Hörverlust bis hin zu hochgradiger Taubheit (Vona et al., 2020). Gegenwärtig besteht die therapeutische Intervention bei den ausgeprägten Krankheitsbildern von DFNB9 in der Insertion eines Cochlea-Implantates (Zheng und Liu, 2020). Ein alternativer Therapieansatz, bei dem ein Gentransfer zum Einsatz kommt, um Patienten mit DFNB9 zu behandeln, könnte zu einer neuen Behandlungsmethode werden. Präklinische Studien, die an Mausmodellen durchgeführt wurden, konnten bereits zeigen, dass sich der Hörsinn mithilfe eines AAV-Gentransfers rehabilitieren lässt (Al-Moyed et al., 2019, Akil et al., 2019). Ebenfalls verzeichneten bereits mehrere

Studien Erfolge hinsichtlich der klinischen Umsetzung der AAV-vermittelten Gentherapie am Menschen (Lv et al., 2024, Qi et al., 2024).

In vorangehenden Arbeiten wurde der Fokus auf die unmittelbaren Erfolge eines gentherapeutischen Ansatzes bei DFNB9 gelegt. Daten zum langfristigen Therapieansprechen sowie zu Auswirkungen auf den Erhalt der synaptischen Verbindungen und den Erhalt der Zelldichte an Inneren und Äußeren Haarsinneszellen stehen bislang noch aus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die langfristigen Effekte eines gentherapeutischen Ansatzes zur Rehabilitation der Hörfunktion auf zellulärer Ebene an einem Mausmodell untersucht. Primäres Studienziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Transduktionsrate der 9-10 Monate alten gentherapeutisch behandelten *Otof*-KO-Mäusen. Es soll untersucht werden, ob eine einmalige postnatale Virustransduktion für den langfristigen Therapieerfolg durch eine anhaltende Otoferlin-Expression in den Inneren Haarsinneszellen ausreichend ist. Sekundäres Studienziel ist die Bestimmung der Synapsendichte bei Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. Es soll untersucht werden, ob der Gentransfer langfristig zum Erhalt der synaptischen Verbindungen beiträgt. Weiteres sekundäres Studienziel ist die Quantifizierung der Zelldichte von Äußeren und Inneren Haarsinneszellen, um degenerative Auswirkungen der Gentherapie auf die Haarzellen auszuschließen und zu demonstrieren, dass die ausgewerteten Cochlea-Präparate durch das Verhältnis ÄHZ zu IHZ intakt sind.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Genehmigung des Antrages für Tierversuche erteilte die Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen und das Niedersächsischen Landesamt für Tierschutz, Deutschland (Aktenzeichen 33.9-42502-04-16/2080, LAVES Hannover). Sowohl der Umgang als auch die Experimente entsprachen den deutschen (TierSchG) und europäischen (Richtlinie 2010/63/EU) Richtlinien zum Schutz von Versuchstieren (Al-Moyed et al., 2019). Für alle Experimente wurden Tiere beider Geschlechter verwendet (Al-Moyed et al., 2019). Die Mäuse wurden in sozialen Gruppen in individuell belüfteten Käfigen (IVC) in einer speziellen pathogenfreien Einrichtung mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und einem 12-Stunden-/12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus untergebracht (Al-Moyed et al., 2019).

Für die *Otof*-KO-Mäuse wurde eine CD1B6F1-Generation durch Kreuzung von männlichen *Otof*-KO-Mäuse mit C57BL/6N-Hintergrund mit weiblichen *Otof*-KO-Mäusen mit CD1-Hintergrund erzeugt (Al-Moyed et al., 2019). Die einzelnen Linien wurden über mindestens 5 Generationen rückgekreuzt (Al-Moyed et al., 2019).

Für unbehandelte Wildtyp-Kontrollen wurde eine CD1B6F1-Generation durch Kreuzung von männlichen *Otof*-WT-Mäusen mit C57BL/6N mit weiblichen *Otof*-WT-Mäusen mit CD1-Hintergrund verwendet (Al-Moyed et al., 2019).

2.2. Herstellung der AAV-Vektoren

Die Herstellung der *Otof*-Viren erfolgte durch Akouos Inc., Boston, USA (Al-Moyed, 2019). Die eGFP-Viren wurden im Center Nanoscale Microscopy and Physiology of the Brain (CNMPB, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Göttingen, Deutschland) hergestellt und aufgereinigt (Al-Moyed, 2019).

Plasmide, die für das Anc80L65-Kapsid kodieren, wurden von Addgene (Watertown, USA) bezogen (Al-Moyed, 2019).

Die Split-Otoferlin-Trans-Splicing-Expressionskassetten (5'-AAV-TS und 3'-AAV-TS) wurden in zwei getrennte Plasmide für die Herstellung der AAV2/Anc80L65 Viren (Dual-AAV2/Anc80TS) verpackt (Al-Moyed, 2019). Die eGFP-exprimierende Kontrollkassette diente zur Überprüfung der auditorische IHZ-Targeting-Effizienz des verwendeten AAV-Serotyps (Al-Moyed, 2019). Die korrekte Rekonstitution der mRNA in voller Länge in der Dual-AAV-TS-Strategie wurde durch nicht-homologes Endjoining der invertierten terminalen Repeats (ITRs) vermittelt (Al-Moyed, 2019). Durch die Spleiß-Donor- (SD) und Spleiß-Akzeptor-Stellen (SA) wurden die ITRs aus dem Transgen entfernt (Al-Moyed, 2019).

2.3. Dual-AAV-Injektion

Die Dual-AAV-Injektion wurde von Al-Moyed von 03/2018 bis 10/2018 an der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

Die Dual-AAV-Injektion erfolgte an insgesamt 8 CD1xC57BL/6N-F1 (CD1B6F1) *Otof*-KO-Mäusen an den postnatalen Tagen p7-8. Als Narkosemittel diente Isofluran (CONTRAfluran, ZeoSys, Luckenwalde, Deutschland) (Al-Moyed et al., 2019). Zusätzlich wurde Xylocain Pumpspray von AstraZeneca (Cambridge, Vereinigtes Königreich) zur lokalen retroaurikulären Betäubung verwendet (Al-Moyed et al., 2019). Wie von Jung et al. 2015 beschrieben, wurde die Viruslösung nach Betäubung und Narkotisierung aller Tiere durch die Membran des runden Fensters in die Scala tympani der linken Cochlea injiziert (Al-Moyed et al., 2019). Die Entscheidung, die Viruslösung in die linke Cochlea der Tiere zu injizieren, wurde aus sterischen Gründen getroffen, da dieses für Rechtshänder besser zugänglich ist. Es ist anzunehmen, dass sich das rechte und linke Ohr nicht in der Entwicklung und der Anzahl der IHZ und ÄHZ unterscheiden. Die Seitenwahl

des Ohres hat daher höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Es wurde eine Konzentration von 8 x 10^{12} Vektorgenomen (vg)/mL oder eine Konzentration von 1,6 x 10^{12} vg/mL injiziert.

23 CD1xC57BL/6N-F1 (CD1B6F1) *Otof*-KO-Mäuse dienten als Kontrolltiere und wurden nicht transduziert. Als gesunde Kontrolle dienten 3 *Otof*-WT-Mäuse, die mit dem eGFP kodierenden AAV2/Anc80-Virus nach oben beschriebener Vorgehensweise injiziert wurden (Abbildung 5) (Al-Moyed et al., 2019).

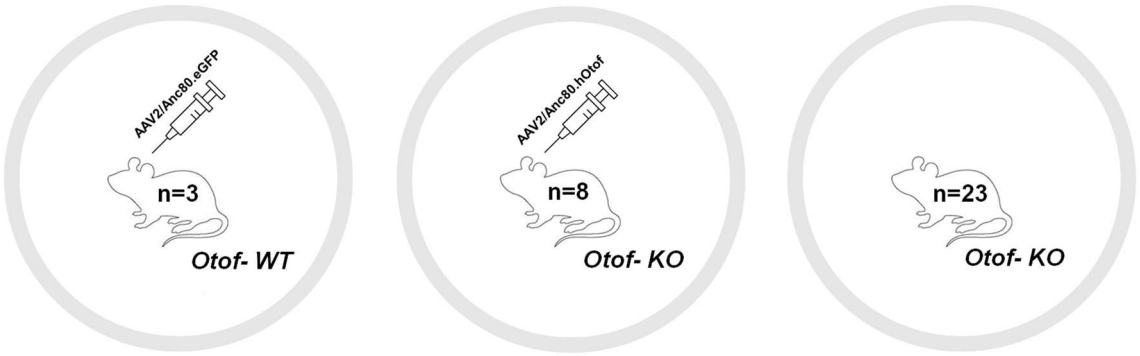

Abbildung 5: Darstellung der verwendeten Maus-Modelle. Links: Otof-WT-Mäuse (n=3), die mit einem AAV2/Anc80.eGFP-Virus transduziert wurden. Mitte: Otof-KO-Mäuse (n=8), die mit dem dualAAV/Anc80.hOtof transduziert wurden. Rechts: Otof-KO-Mäuse (n=23), die nicht transduziert wurden.

2.4. Audiologische Untersuchungen

Die audiologischen Untersuchungen wurden von Al-Moyed von 04/2018 bis 06/2019 an der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

ABR-Messungen erfolgten im Alter von 1 Monat, 7 Monaten und im Alter von 9 oder 10 Monaten. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin (125 mg/kg) und Xylazin (2,5mg/kg) betäubt und in eine schalldichte Box gelegt (Jing et al., 2013). Die ABR-Messung und Datenerfassung wurden mit einem Tucker-Davis Technologies System II (Alachua, FL, USA) durchgeführt (Al-Moyed et al., 2019). ABR-Klickschwellen (0,03ms) wurden als die niedrigsten Schalldruckpegel bestimmt, die erforderlich waren, um reproduzierbare ABR-Wellenantworten

hervorzurufen. Es wurde in 10dB SPL-Schritten von 30dB SPL bis 100dB SPL gemessen (Al-Moyed et al., 2019). Die Schwellenwerte für Tonbursts (12kHz, 10ms Plateau, 1ms cos2 Anstieg/Abfall) wurden in 10-dB-SPL-Schritten von 10dB SPL unterhalb des niedrigsten reproduzierbaren ABR-Wertes bis zu 90dB SPL gemessen (Al-Moyed et al., 2019). Die ABR-Welle I wurde definiert als die erste unterscheidbare Spitze zwischen dem summierenden Rezeptorpotenzial (SP) und der markanten Spitze der ABR-Welle II (Al-Moyed et al., 2019). Die Amplitude der einzelnen ABR-Wellen wurde berechnet als Differenz zwischen dem höchsten Punkt einer Welle und dem nachfolgenden lokalen Minimum (Al-Moyed et al., 2019). Die Amplitude der summierten ABR-Wellen I-V wurde durch Addition der einzelnen Amplitudenwerte der ABR-Wellen I-V berechnet (Al-Moyed et al., 2019). Die graphische Darstellung der ABR-Amplituden erfolgte durch Igor Pro-WaveMetrics (Version 9.02, Portland, USA)

DPOAE-Messungen erfolgten in einem Alter von 1 Monat und in einem Alter von 9 Monaten oder 10 Monaten. Dazu wurden die Tiere mit Ketamin (125 mg/kg) und Xylazin (2,5mg/kg) betäubt und in eine schalldichte Box gelegt (Jing et al., 2013). Die DPOAE-Messungen wurden mit einer speziell entwickelten Sonde durchgeführt, die aus einem Mikrofon (MKE-2, Sennheiser, Hannover, Deutschland) und zwei Lautsprechern (MF1-S, Tucker Davis Technologies, Ft Lauderdale, FL, USA) besteht (Jing et al., 2013). Die Sonde wurde in den äußeren Gehörgang der Mäuse eingeführt (Jing et al., 2013). Die primären Stimuli f1 und f2 wurden über 16 Sekunden mit einem Frequenzverhältnis f2=1,2xf1 und einem Intensitätsverhältnis f1=f2+10 mit f1-Frequenzen von 6-23kHz dargeboten, gesteuert durch eine benutzerdefinierte Matlab-Routine und TDT System III Hardware (Tucker Davis Technologies, Alachua, FL, USA) (Jing et al., 2013). Die aufgezeichneten Emissionen wurden Fast-Fourier-transformiert und die Amplituden der DPOAE bei 2xf1-f2 gemessen (Jing et al., 2013).

2.5. Immunhistochemie

Die folgenden Lösungen wurden verwendet:

- Phosphatpuffer (PB, 240mM)
  - 27,52 g Na_2HPO_4 (Endkonzentration 193,9mM)
  - 5,52 g NaH_2PO_4 (Endkonzentration 46 mM)
  - 1 L H_2O

- Waschpuffer
  - 83 ml 240 mM PB (Endkonzentration 20 mM)
  - 30 ml 10% Octoxinol 9 (Triton X-100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) (Endkonzentration 0,3%)
  - 112,5 ml 4 M NaCl (0,45 M)
  - 1 L H_2O

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
  - 8 g NaCl (Endkonzentration 137 mM)
  - 0,2 g KCl (Endkonzentration 2,7mM)
  - 1,15 g Na_2HPO_4 (Endkonzentration 8,1mM)
  - 0,2 g KH_2PO_4 (Endkonzentration 1,5mM)
  - 1 L H_2O

- Donkey Serum Dilution Buffer (DSDB)
  - 10 ml Eselsserum
  - 1,8 ml 10% Octoxinol 9 (Triton X-100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
  - 5 ml 240 mM PB
  - 6,75 ml 4M NaCl
  - 36,45 ml H_2O

- Einbettmittel
    - 6 g Glycerin
    - 2,4 g Polyvinylalkohol (Mowiol 4-88, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
    - 6 ml H_2O
    - 12 ml 0,2 M Tris-HCl
    - 0,72g 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan (DABCO)

Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet:

- Ziegen-Anti-Calretinin (CG1, Swant, Burgdorf, Schweiz, 1:300) zur Markierung von ÄHZ und IHZ (gCalret 405)
- Kaninchen-IgG-Anti-Otoferlin ([13A9] #ab53233, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, Sonderanfertigung; 1: 100- 1:200) zur Markierung des C-terminalen Teils von Otoferlin (Rb hOtof 647)
- Maus-Anti-CtBP2 (#612044, BD Biosciences, New Jersey, USA, 1:150) zur Markierung der synaptischen Bänder (mCtBP2 568)
- Kaninchen-IgG-anti-Shank1a [C-terminal] (#RA19016, Neuromics, Edina, USA, 1: 300) zur Markierung der postsynaptischen Dichte (rbShankI 647)
- Huhn-Anti-HomerI (#160006, Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland, 1:150) zur Markierung der Postsynapse (chHomer I 488)
- Huhn-IgY-Anti-GFP (#ab13970, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, 1:500) zur Markierung der postsynaptischen Dichte (chGFP 488)

Die folgenden sekundären Antikörper wurden verwendet:

- DyLight 405-konjugiertes Esel-Anti-Ziegen-IgG (#705-475-003, Jackson ImmunoResearch, Ely, Vereinigtes Königreich, 1:100)

- Alexa Fluor 647-konjugiertes Esel-Anti-Kaninchen-IgG (#A31573, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland, 1: 200)
- Alexa Fluor 568-konjugiertes Esel-Anti-Maus-IgG (#A10037, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland, 1:200)
- Alexa Fluor 488-konjugiertes Esel-Anti-Hühner-IgY (#703-545-155, Jackson ImmunoResearch, Ely, Vereinigtes Königreich, 1:200)

Die durchgeführte immunhistochemische Färbung basiert auf der Beschreibung von Khimich et al., 2005 (Khimich et al., 2005).

Für die histologische Untersuchung wurden die acht transduzierten Dual-AAV2/Anc80.hOTOF Mäuse in einem Alter von 9 Monaten (postnataler Tag p266- 270, n=5 Tiere) oder in einem Alter von 10 Monaten (p293-294, n=3 Tiere) getötet. Die injizierten Dual-AAV2/Anc80.eGFP Mäuse wurden in einem Alter von 15 Monaten (p468, n=3 Tiere) und die Wildtyp- Kontrollen in einem Alter von 8-10 Monaten (p244-300, n=23) getötet. Insgesamt wurden 145 Cochleapräparate imunhistochemisch gefärbt und analysiert.

Die Cochleae wurden perfundiert und mit 4% Formaldehyd für 45 Minuten bei 4°C fixiert (Al-Moyed et al., 2019). Da es sich um 8-15 Monate alte Tieren handelte, wurden die Präparate zusätzlich in Morse-Lösung (10% Natriumcitrat, 22,5% Ameisensäure) für 5 min oder in 0,12 M Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA-Lösung, pH 8,0) für 2-3 Tage entkalkt, bevor die Corti-Organe entnommen wurden (Al-Moyed et al., 2019). Es erfolgte die Blockierung und die Antikörperapplikation (Abbildung 6). Die Inkubationszeit der primären Antikörperapplikation erfolgte in 70-80µl der Antikörperverdünnung in DSDB über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Corti-Organe 3x10min in Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Es erfolgte die sekundäre Antikörperapplikation in 50µl Antikörperverdünnung in DSDB bei Raumtemperatur und unter lichtgeschützten Bedingungen. Nach 50-60 Minuten wurden die Corti-Organe 1x10 min in Waschpuffer bei Raumtemperatur, 2x10min in einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), 1x10min in 5mM Phosphatpuffer

gewaschen. Alle Waschungen erfolgten unter lichtgeschützten Bedingungen. Die Corti-Organe wurden in Einbettmittel (20µl Mowiol 4-88) auf dem Objektträger mit einem Deckglas montiert und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

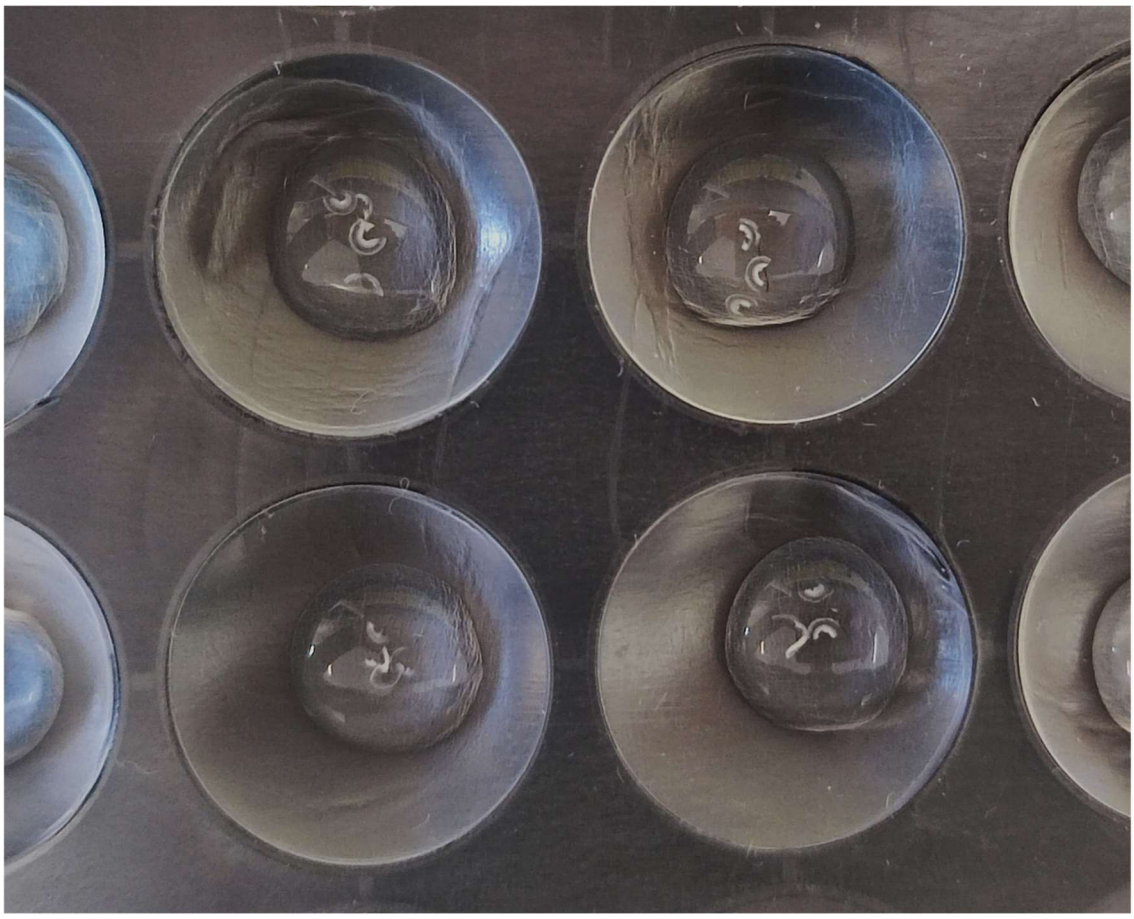

Abbildung 6: Präparierte Cochlea-Abschnitte während der Antikörperapplikation.

2.6. Bilderfassung und -analyse

Um die Anzahl der ÄHZ und Otoferlin positiven und negativen IHZ pro 100 µm zu bestimmen, wurden Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt. Dazu diente das Zeiss ApoTome.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Tübingen (Seriennummer: 3525001625). Die Aufnahmen erfolgten mit einem 40× -Objektiv (Numerische Apertur = 0,8). Pro Präparat wurden 30-40 Z-Stacks mit einem Abstand von 0,5µm aufgenommen. Bei größeren Präparaten wurden die Anzahl

der Tiles in x- und y-Richtung erweitert. Nach der Bildaufnahme wurde mittels der ZEN 2.6 proSoftware (blue edition, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) das ApoTome-Bild erzeugt und über das Tool „Extended Depth of Focus“ ein erweitertes Tiefenschärfe- Bild aus dem Z-Stapel- Bild errechnet. Zum Zusammensetzen der einzelnen Tiles diente das Stitching-Tool. Die Länge der Basilarmembran wurde durch Einzeichnen einer Linie entlang der IHZ durch die ZEN Software ausgemessen (Software Handbuch Zen 2 (blue edition) V 1.0de). Die Auszählung der HZ erfolgte manuell mit der Hilfe des Cell Counters der Image J Software (NIH, http://imagej.net/). Es wurden nur die Zellkerne der ÄHZ und IHZ gezählt, die als deutlich abgrenzbare gCalret 405 Flächen sichtbar waren (Al-Moyed et al., 2019). Insgesamt konnten n=120 Cochleapräparate hinsichtlich ÄHZ und n=132 hinsichtlich IHZ immunhistochemisch analysiert und ausgewertet werden.

Für die Bestimmung der Synapsenanzahl wurden weitere Aufnahmen am Konfokalmikroskop durchgeführt. Dazu diente ein Laser-Scanning-Konfokalmikroskop (Leica Stellaris, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit einem 63×-Immersionsöl Objektiv (NA = 1,3). Die Aufnahmen besitzen eine Pixelgröße von 63 x 63nm und wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 400 Hz mit Mittelung über 3-4 Aufnahmen („frame averages“) gemacht. Für die Synapsenzählung wurde eine randomisierte Auswahl von vier der acht DualAAV/Anc80-TS transduzierten *Otof*-KO-Mäuse getroffen. Es wurden nur die Synapsen an den IHZ der linken, transduzierten Cochlea-Präparate gezählt. Vor der Durchführung der Aufnahmen wurden Bereiche der Cochlea-Abschnitte ausgewählt, die sowohl Otoferlin positive als auch Otoferlin negative IHZ darstellten. Für die Auswertung der Synapsen wurden die am Konfokalmikroskop aufgenommenen Detailaufnahmen mit Image J zu Maximalintensitätsprojektionen zusammengefügt. Um die synaptischen Verbindungen der IHZ eindeutig als Prä- und Postsynapse zu identifizieren, wurde mit dem On/Off Tool der Image J Software gearbeitet. Es wurden nur die synaptischen Verbindungen gezählt, bei denen klar abgrenzbare CtBP2-positive Punkte als Präsynapse und klar abgrenzbare HomerI-positive Punkte als

Postsynapse zu identifizieren waren. Insgesamt wurde die Synapsenzählung an n=158 Otoferlin positiven IHZ und an n=164 Otoferlin negativen IHZ durchgeführt.

2.7. Statistische Auswertung

Die Auszählungen der HZ und Synapsen wurden pro Maus-Präparat in Microsoft Excel (Version 2108, Redmond, USA) erfasst. Die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme und Graphen wurden mittels der Statistiksoftware JMP (Version 17.2.0, Cary NC, USA) durchgeführt. Bei multiplen Präparaten je Cochlea-Abschnitt wurde der gewichtete arithmetische Mittelwert gebildet. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Das Signifikanzniveau α wurde auf α = 0,05 festgelegt. Als parametrischer Test wurde bei zwei abhängigen Stichproben ein gepaarter t-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Stichproben wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als post-hoc Test wurde der Tukey-Kramer Test verwendet.

3. Ergebnisse

Um die Langzeiteffekte der gentherapeutischen Anwendung an der Cochlea zu analysieren, wurden 9-10 Monate alte *Otof*-KO-Mäuse, die postnatal durch eine Otoferlin-Transduktion mit einem DualAAV2/Anc80-TS-Virus behandelt worden sind, untersucht. Als Kontrolle dienten 8-9 Monate alte, nicht transduzierte *Otof*-KO-Mäuse und 15 Monate alte WT-Mäuse.

3.1. Haarzelldichte

Die Aufnahmen der Cochlea-Präparate zeigen eine typische Anordnung von IHZ und ÄHZ. Die ÄHZ liegen in drei Reihen geordnet den IHZ gegenüber. Zwischen IHZ und ÄHZ ist der Corti-Kanal zu erkennen (Abbildung 7).

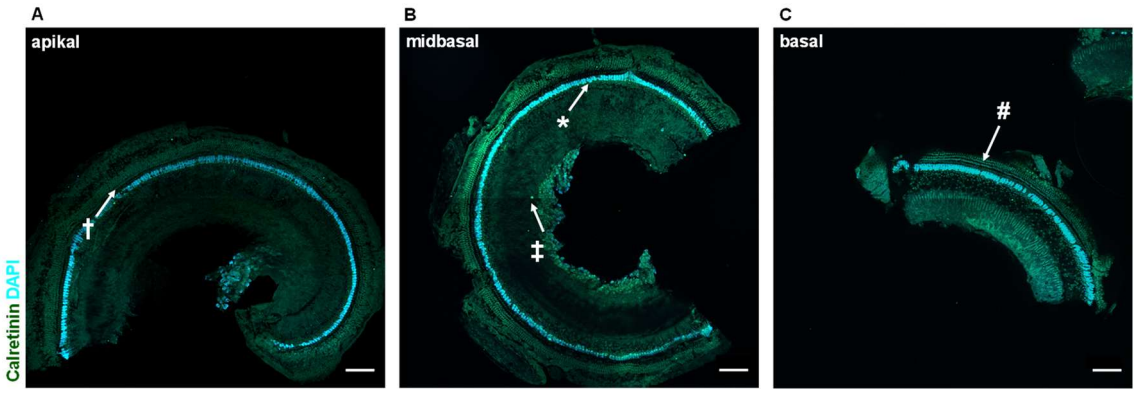

*Abbildung 7: Cochlea-Abschnitte einer nicht transduzierten Otof-KO-Maus, unterteilt in apikal (A), midbasal (B), basal (C). Zu sehen sind die IHZ (markiert mit *), die ÄHZ (markiert mit #), der Corti-Kanal (markiert mit †). Die Aufnahme in B wurde in mehreren Tiles aufgenommen und anschließend gestitcht (markiert mit ‡). Skalenbalken: 100µm.*

Die durchschnittliche Anzahl aller gezählten ÄHZ pro 100µm lag bei 28,0 ±9,2 (n=120 Cochlea-Präparate). Die durchschnittliche Anzahl aller gezählten IHZ pro 100µm lag bei 9,1 ±2,8 (n=132 Cochlea-Präparate). Es wurde nicht zwischen den transduzierten und nicht-transduzierten *Otof*-KO-Mäusen und WT-Mäusen unterschieden. Das mittlere intraindividuelle Verhältnis der ÄHZ [/100µm] zu IHZ [/100µm] betrug 3,1 : 1 (Abbildung 8).

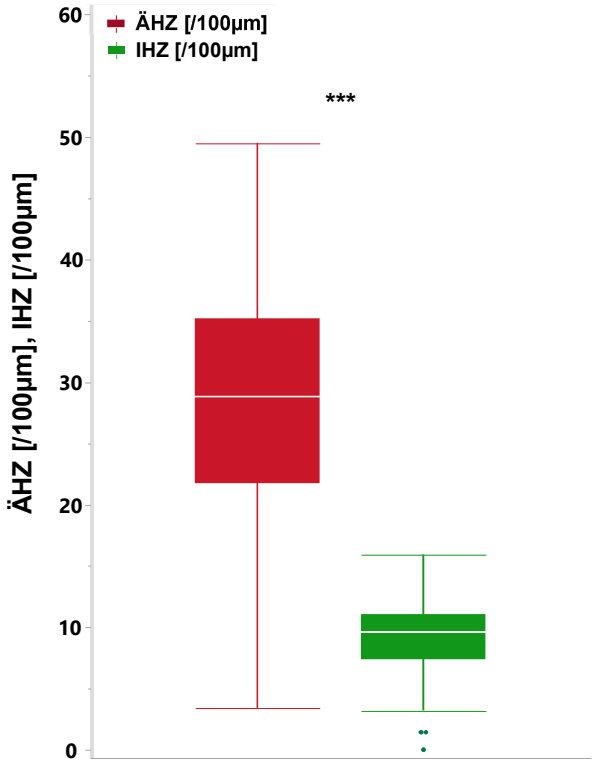

Abbildung 8: Anzahl aller gezählten ÄHZ [/100µm] und IHZ [/100µm]. Die Anzahl der ÄHZ [/100µm] (dargestellt in rot) liegt bei 28,0 ±9,2 (n=120 Cochlea-Präparate), die Anzahl der IHZ [/100µm] (dargestellt in grün) liegt bei 9,1 ±2,8 (n=132 Cochlea-Präparate), signifikant bei p=0,0002.

In einem weiteren Schritt wurde die Haarzelldichte pro 100µm der drei unterschiedlichen Mausmodelle miteinander verglichen. Zusätzlich wurde ein intraindividueller Seitenvergleich der Haarzelldichte bei *Otof*-KO-Mäusen zwischen der DualAAV2/Anc80-TS-Virus-transduzierten linken Cochlea und der nicht-transduzierten rechten Cochlea durchgeführt. Bei den Kontrollen des Wildtyps sowie den nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäusen erfolgte eine Auswertung sowohl der transduzierten als auch der nicht-transduzierten Cochlea. Des Weiteren wurde eine Differenzierung der Cochlea-Abschnitte in apikal, midbasal und basal vorgenommen (Tabelle 1).

Maus-Modell	Cochlea-Abschnitt	ÄHZ [/100µm]	IHZ [/100µm]
Nicht- transduzierte *Otof*-KO	Gesamt	29,6 ±9,1	9,5 ±2,6
	Apikal	32,2 ±6,7	10,5 ±2,0
	Midbasal	30,7 ±8,0	9,4 ±2,1
	Basal	25,2 ±11,5	8,3 ±3,3
Transduzierte *Otof*-KO (transduzierte Cochlea)	Gesamt	25,6 ±8,7	8,6 ±2,4
	Apikal	29,7 ±6,0	10,2 ±1,4
	Midbasal	27,8 ±11,8	8,7 ±2,9
	Basal	20,4 ±5,1	6,9 ±1,7
Transduzierte *Otof*-KO (nicht- transduzierte Cochlea)	Gesamt	25,0 ±9,9	8,4 ±2,5
	Apikal	31,4 ±9,5	10,3 ±1,9
	Midbasal	26,0 ±10,0	8,1 ±1,1
	Basal	17,7 ±5,7	6,6 ±3,0
Otof-WT	Gesamt	25,1 ±7,9	8,3 ±4,5
	Apikal	20,0 ±3,8	6,6 ±4,8
	Midbasal	28,6 ±9,2	10,6 ±2,3
	Basal	28,6†	6,8 ±6,8

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Anzahl von IHZ [/100µm] und ÄHZ [100µm] aufgeteilt nach Maus-Modell und Cochlea-Abschnitt. Für einen intraindividuellen Seitenvergleich wurde bei den transduzierten Otof-KO-Mäusen zwischen der linken, transduzierten Cochlea und der rechten nicht-transduzierten Cochlea unterschieden. † Bei Otof-WT-Mäusen war bei der ÄHZ-Auszählung basal nur ein Präparat auszuwerten.

Die Haarzelldichte der IHZ unterschied sich zwischen den drei Maus-Modellen und den verschiedenen Cochlea-Abschnitten nicht signifikant. Die Haarzelldichte der IHZ lag bei den transduzierten *Otof*-KO-Mäuse (linke, transduzierte Cochlea) apikal bei 10,2 ±1,4 IHZ/100µm (n=7 Cochlea-Präparate), midbasal bei 8,7 ±2,9 IHZ/100µm (n=6 Cochlea-Präparate) und basal bei 6,9 ±1,7 IHZ/100µm (n=7 Cochlea-Präparate). Im Vergleich dazu zeigten die nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäuse vergleichbare Werte mit apikal 10,5 ±2,0 IHZ/100µm (n=30 Cochlea-Präparate), midbasal 9,4 ±2,1 IHZ/100µm (n=29 Cochlea-Präparate) und basal 8,3 ±3,3 IHZ/100µm (n=23 Cochlea-Präparate). Auch die *Otof*-WT-Mäuse besaßen ähnliche Haarzelldichten der IHZ mit apikal 6,6 ±4,8 IHZ/100µm (n=5

Cochlea-Präparate), midbasal 10,6 ±2,3 IHZ/100µm (n=6 Cochlea-Präparate) und basal 6,8 ±6,8 IHZ/100µm (n=3 Cochlea-Präparate).

Die Haarzelldichte der ÄHZ in den apikalen Cochlea-Abschnitten war signifikant unterschiedlich (F(40)=5,63 , p=0,0072). Wildtyp-Mäuse besaßen mit 20,0 ±3,8 ÄHZ/100µm (n=4 Cochlea-Präparate) im Vergleich zu den nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäusen mit 32,2 ±6,7 ÄHZ/100µm (n=26 Cochlea Präparate) signifikant weniger ÄHZ (p=0,0050). Wildtyp-Mäuse besaßen auch zu den transduzierten *Otof*-KO-Mäusen (linke transduzierte Cochlea) mit 29,7 ±6,0 ÄHZ/100µm (n=6 Cochlea-Präparate) signifikant weniger ÄHZ (p=0,0302). Ein signifikanter Unterschied zwischen den transduzierten und den nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäusen bestand nicht.

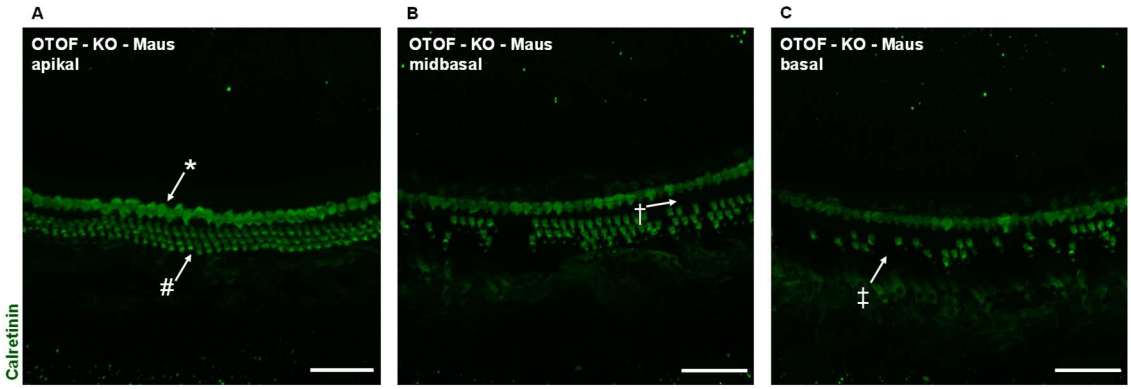

*Abbildung 9: Konfokalaufnahmen einer nicht-transduzierten Otof-KO-Maus. A=Apikal, B= Midbasal, C= Basal, markiert sind die IHZ mit * und die ÄHZ mit #. Während im apikalen Bereich ein lückenloser Zellverband der ÄHZ und IHZ zu sehen ist, kommt es im midbasalen und basalen Bereich aufgrund der Degeneration von HZ zu sichtbaren Lücken. Markiert ist der ÄHZ Verlust ‡. Der Abstand zwischen IHZ und ÄHZ ist markiert durch †, hier befindet sich der Corti-Kanal. Skalenbalken: 50µm.*

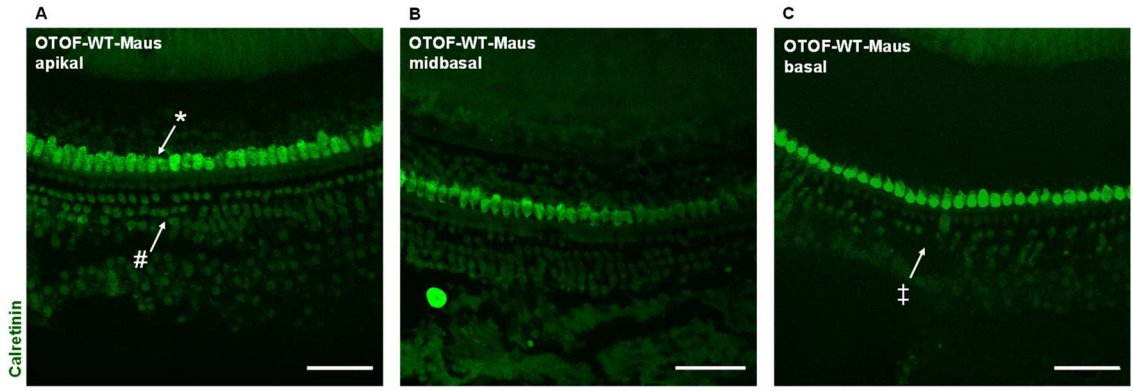

*Abbildung 10: Konfokalaufnahmen einer Otof-WT-Maus. A=Apikal, B= Midbasal, C= Basal, markiert sind die IHZ mit * und die ÄHZ mit #. Der ÄHZ Verlust ist markiert mit ‡. Skalenbalken: 50µm.*

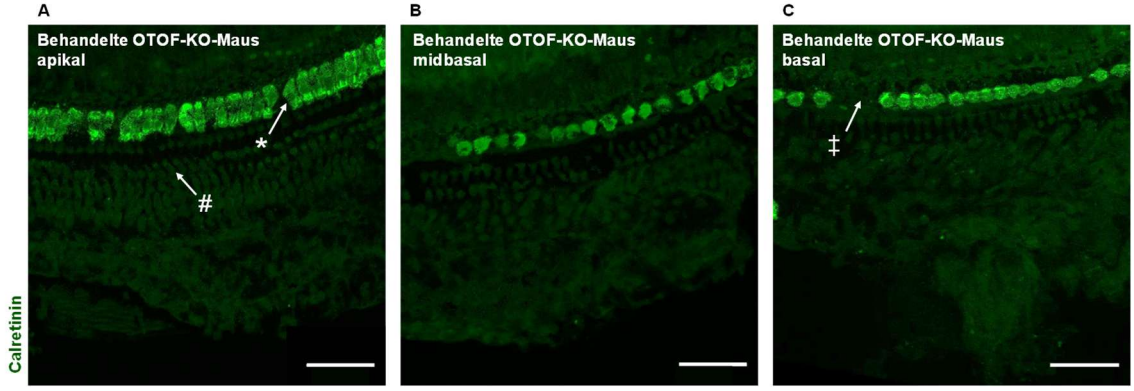

*Abbildung 11: Konfokalaufnahmen einer transduzierten Otof-KO-Maus. A=Apikal, B= Midbasal, C= Basal, markiert sind die IHZ mit * und die ÄHZ mit #. Der IHZ Verlust ist markiert mit ‡. Skalenbalken: 50µm.*

Im Seitenvergleich zwischen linker transduzierter und rechter nicht-transduzierter Cochlea zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der HZ-Anzahl (Abbildung 12). Die IHZ-Anzahl der transduzierten Cochlea betrug 8,6 ±2,4 IHZ/100µm, während die nicht-transduzierte Cochlea einen vergleichbaren Wert mit 8,4 ±2,5 IHZ/100µm aufwies. Die ÄHZ-Anzahl der transduzierten Cochlea lag bei durchschnittlich 25,6 ±8,7 ÄHZ/100µm. Ein signifikanter Unterschied zur nicht-transduzierten Cochlea (25,0 ±9,9 ÄHZ/100µm) bestand nicht. Aufgrund der geringen Fallzahl (n=8 transduzierte *Otof*-KO-Mäuse) wurde nicht zwischen apikal, midbasal und basal unterschieden.

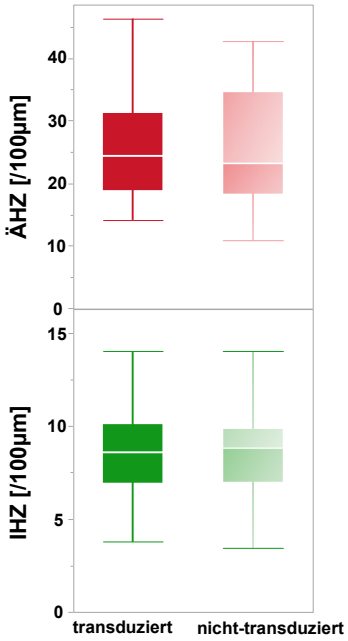

Abbildung 12: Seitenvergleich der HZ bei transduzierten Otof-KO-Mäusen. Transduzierte (linke) Cochlea: 25,6 ±8,7 ÄHZ [100µm] (n=19 Cochlea-Präparate, dargestellt in dunkelrot) und 8,6 ±2,4 IHZ [100µm] (n=20 Cochlea-Präparate, dargestellt in dunkelgrün). Nicht-transduzierte Cochlea: 25,0 ±9,9 ÄHZ [100µm] (n=15 Cochlea- Präparate, dargestellt in hellrot) und 8,4 ±2,5 IHZ [100µm] (n=16 Cochlea Präparate, dargestellt in hellgrün).

3.2. Transduktionsrate

Die Messung der Transduktionsrate wurde an 8 Cochleae von DualAAV2/Anc80-TS unilateral transduzierten *Otof*-KO-Mäusen durchgeführt. Otoferlin-positive IHZ stellten sich in den Aufnahmen des Epifluoreszenzmikroskops unterschiedlich dar: In einigen Fällen war das Protein in den IHZ vollständig präsent, während es in anderen Fällen randständig an der Plasmamembran zu finden war (Abbildung 13). In beiden Fällen wurde dies als Otoferlin positive IHZ gewertet.

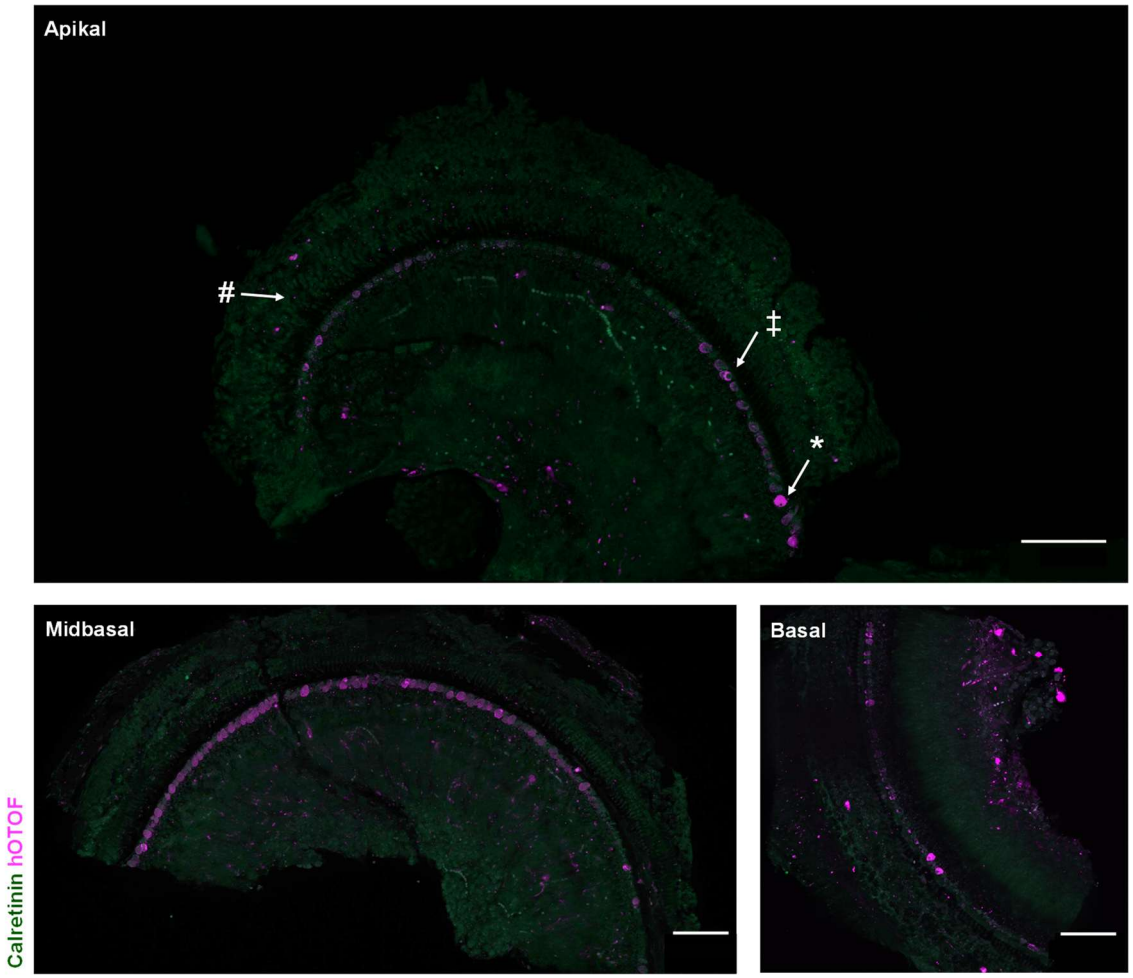

*Abbildung 13: Epifluoreszenzaufnahmen der Otoferlin positiven IHZ, aufgeteilt nach den Cochlea-Abschnitten apikal, midbasal, basal. Zu erkennen sind die magenta gefärbten Otoferlin positiven IHZ, die entweder vollständig mit dem Protein ausgefüllt sind (markiert mit *) oder die nur randständig mit dem Protein ausgefüllt sind (markiert mit ‡). Die ÄHZ (markiert mit #) liegen den IHZ gegenüber. Skalenbalken 100µm.*

Es wurde eine Transduktionsrate von 33,9% ±18,4 ermittelt. Eine signifikante Abweichung der Transduktionsrate in Bezug zu den Cochlea-Abschnitten war nicht festzustellen. Hier lagen die durchschnittlichen Werte apikal bei 30,9% ±17,7 (n=7 Cochlea-Präparate), midbasal bei 35% ±27,2 (n=6 Cochlea-Präparate) und basal bei 35,1% ±11,1 (n=7 Cochlea-Präparate).

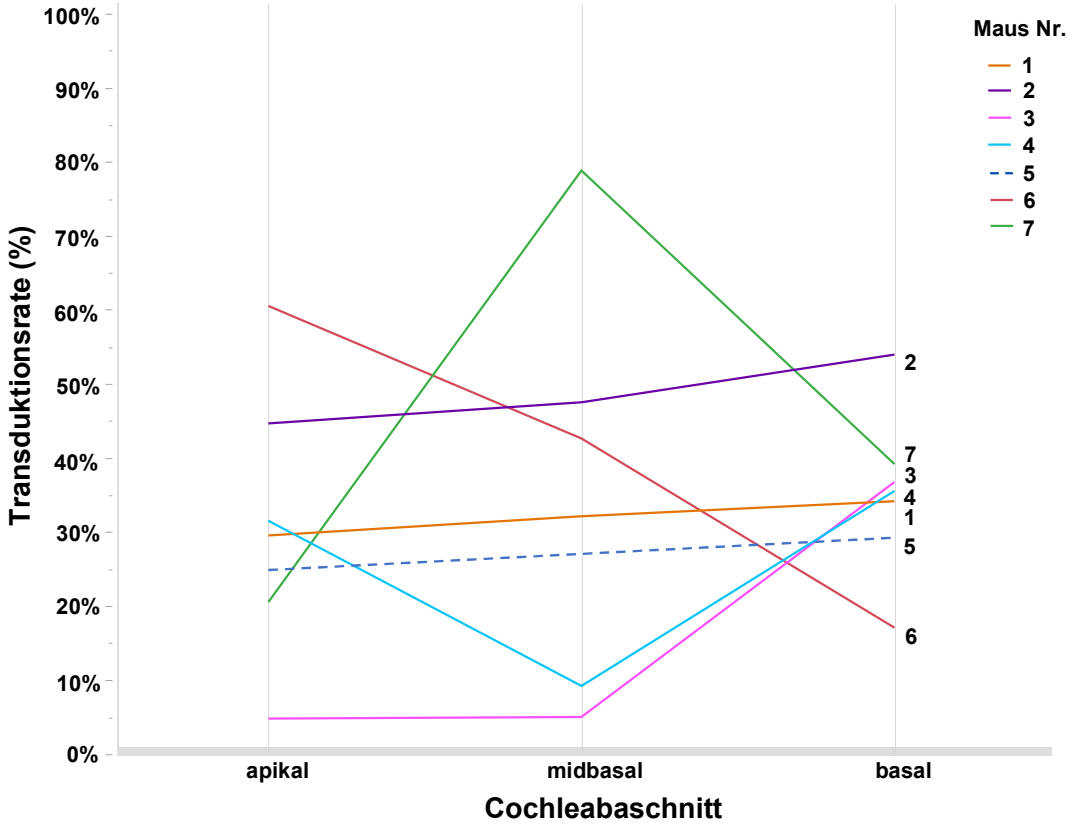

Abbildung 14: Transduktionsrate aller transduzierten Mäuse in Bezug zu den Cochlea-Abschnitten. Insgesamt wurden 8 Otof-KO-Mäuse mit dem OTOF-Virus transduziert (n=8). Maus 5 wird hier nur gestrichelt dargestellt, da das midbasale Präparat nicht auszuwerten war. Bei Maus Nr. 8 konnte kein Präparat ausgewertet werden (n=1 Drop-Out), daher nicht auf dem Diagramm dargestellt.

Als Kontrolle dienten 3 WT-Mäuse, die mit dem AAV2/Anc80-Viurs, der für eGFP kodiert, injiziert wurden. Die eGFP-Fluoreszenz zeigte sich nicht nur in den IHZ, sondern auch in den ÄHZ, Stützzellen und SGN.

3.3. Synapsen

Die Aufnahmen am Konfokalmikroskop zeigen die IHZ mit ihrem charakteristischen birnenförmigen Zellkörper und einem runden, zentral gelegenen Zellkern. Am apikalen Pol der Haarsinneszellen ist auf manchen Aufnahmen auch das Haarzellbündel aus Stereozilien gut sichtbar (Abbildung 15).

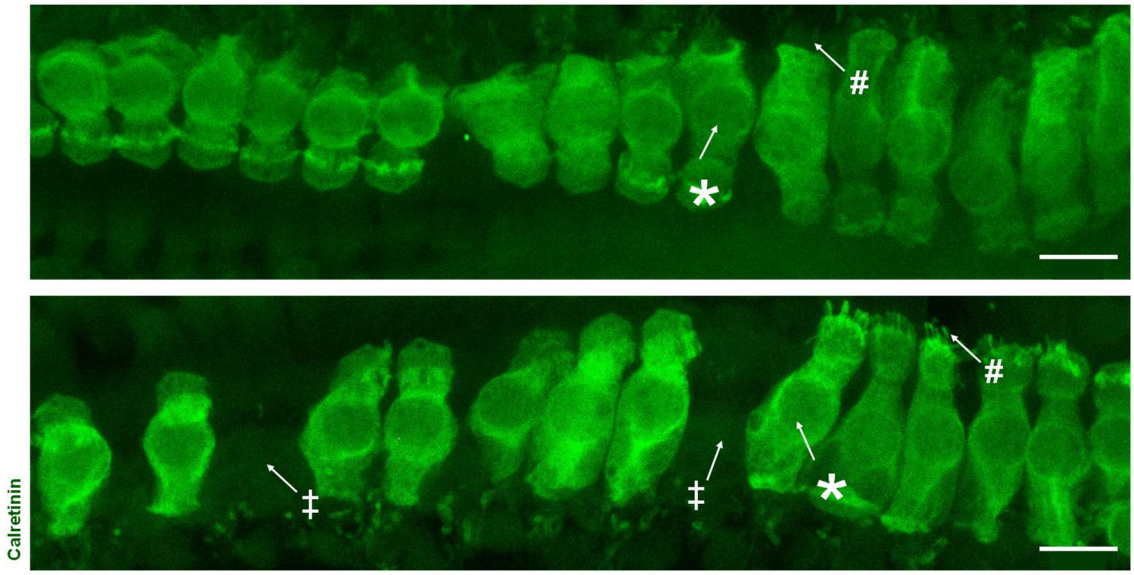

*Abbildung 15: Konfokalaufnahmen des Haarzellverbundes der Inneren Haarsinneszellen. Der zentral gelegene Zellkern ist mit einem Sternchen markiert *. Am apikalen Pol der Haarsinneszelle sind die Stereozilien gut sichtbar, siehe #. Der Haarzellverbund ist teilweise unterbrochen, markiert mit einem ‡. Skalenbalken 10µm.*

Die synaptischen Verbindungen sind am basalen Pol der IHZ vorzufinden. Die Präsynapsen zeigen sich in den mikroskopischen Aufnahmen als ovale Punkte, während die Postsynapsen in ihrem Erscheinungsbild flacher und leicht konkav erscheinen (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18).

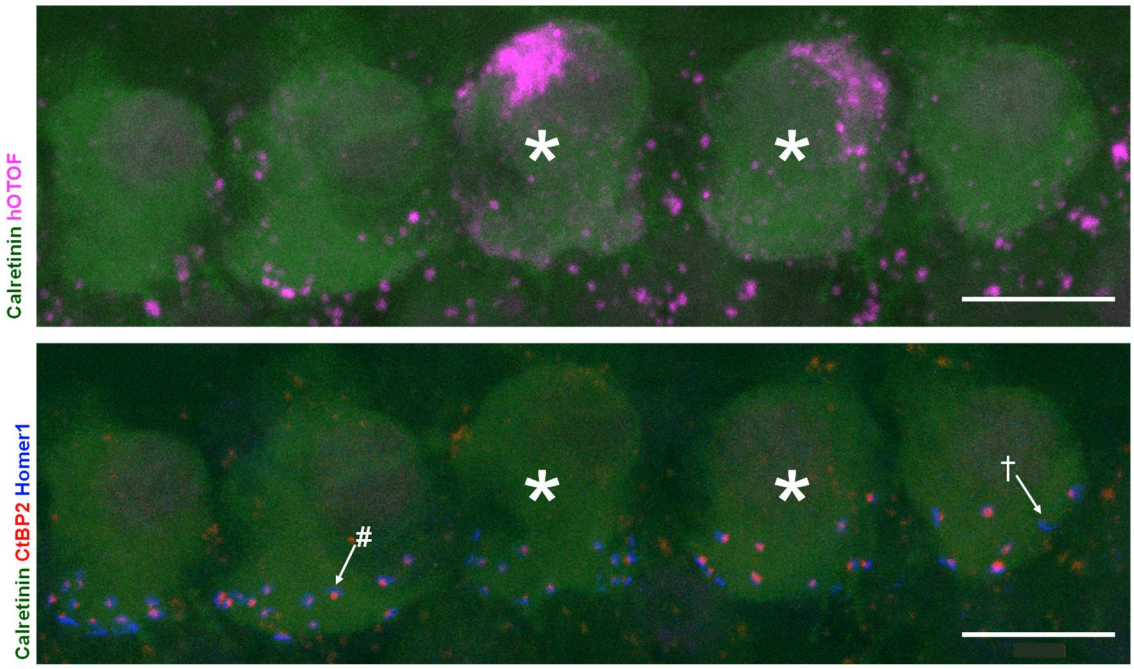

*Abbildung 16: Konfokalaufnahmen der synaptischen Verbindungen von Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. Oben: Otoferlin positive IHZ (siehe *) und negative IHZ. Unten: Synaptische Verbindungen (siehe #), mit Präsynapse (rot) und Postsynapse (blau). Die Markierung † zeigt auf eine solitäre Präsynapse. Skalenbalken 10µm.*

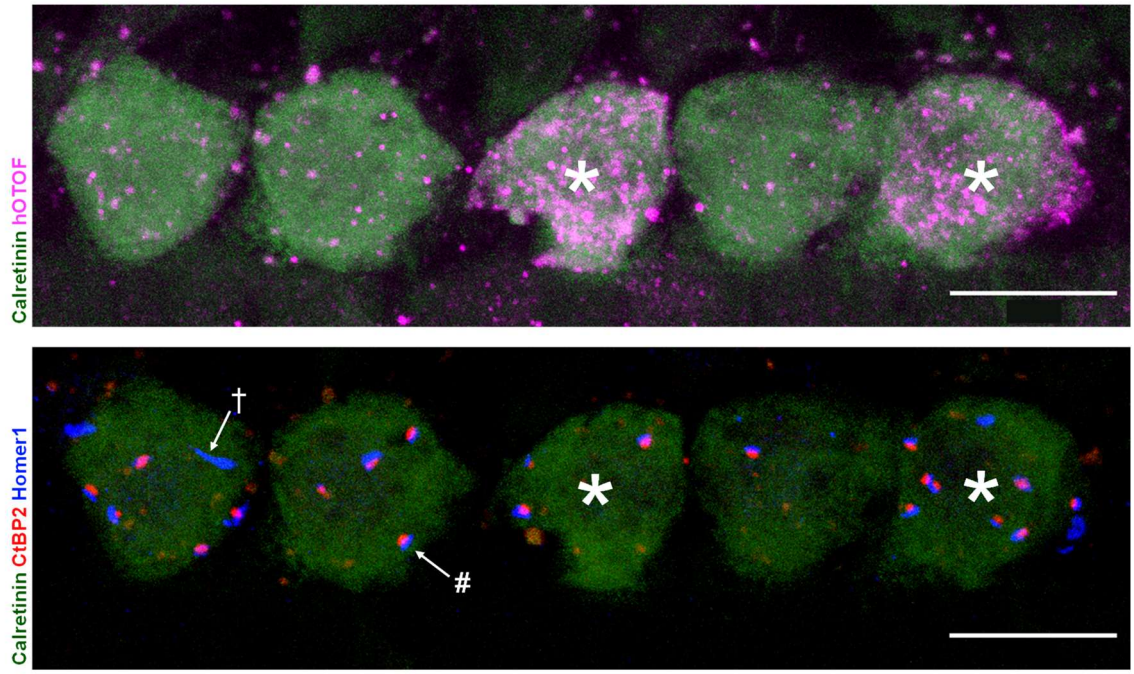

*Abbildung 17: Konfokalaufnahmen der synaptischen Verbindungen von Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. Oben: Otoferlin positive IHZ (siehe *) und negative IHZ. Unten: Synaptische Verbindungen (siehe #), mit Präsynapse (rot) und Postsynapse (blau). Die Markierung † zeigt auf eine solitäre Präsynapse. Skalenbalken 10µm.*

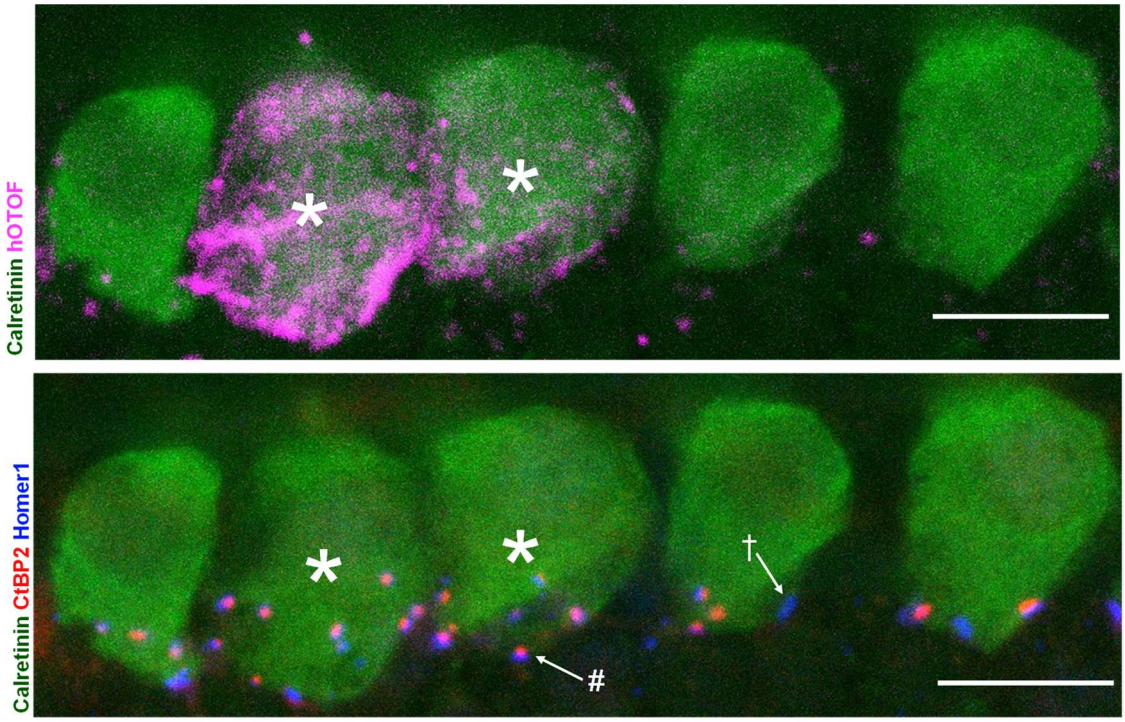

*Abbildung 18: Konfokalaufnahmen der synaptischen Verbindungen von Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen. Oben: Otoferlin positive IHZ (siehe *) und negative IHZ. Unten: Synaptische Verbindungen (siehe #), mit Präsynapse (rot) und Postsynapse (blau). Die Markierung † zeigt auf eine solitäre Präsynapse. Skalenbalken 10µm.*

Transduzierte *Otof*-KO-Maus	Cochlea-Abschnitt	ÄHZ [/100µm]	IHZ [/100µm]	Transduktions-rate [%]	Synapsen/Otof positive IHZ	Synapsen/Otof negative IHZ
1	apikal	23,3	10,2	29,5	6,3 ±2,2	4,2 ±1,3
	midbasal	36,9	9,8	32,1	7,0 ±2,0	5,3 ±1,4
	basal	16,5	7,7	34,2	5,0 ±2,6	3,9 ±1,9
2	apikal	31,3	11,6	44,6	8,4 ±2,7	4,7 ±2,8
	midbasal	19,1	5,9	47,5	5,3 ±2,1	5,7 ±2,0
	basal	27,1	6,3	54,0	7,3 ±2,5	7,3 ±0,9
3	apikal	38,6	12,1	4,8	7,8 ±1,3	6,7 ±1,3
	midbasal	46,3	6,7	5,0	6,3 ±3,0	4,5 ±2,9
	basal	16,2	3,8	36,7	8,2 ±2,3	6,6 ±2,2
4	apikal	23,0	9,4	31,5	7,6 ±1,6	5,6 ±2,5
	midbasal	14,1	14	9,2	11,0	7,3 ±1,2
	basal	15,9	6,9	35,5	9,1 ±2,7	4,7 ±1,9

Tabelle 2: Übersicht der vier randomisiert ausgewählten transduzierten Otof-KO-Mäuse. Unterteilt in die Cochlea-Abschnitte (apikal, midbasal, basal), Anzahl der Äußeren und Inneren Haarsinneszellen [/100mm], Transduktionsrate [%], Synapsenanzahl der Otoferlin-positiven und -negativen Inneren Haarsinneszellen.

Die mittlere Synapsenanzahl der Otoferlin positiven IHZ beträgt 7,4 ±1,7 Synapsen (n=158 ausgezählte Otoferlin positive IHZ). Die mittlere Synapsenanzahl der Otoferlin negativen IHZ beträgt 5,5 ±1,2 Synapsen (n=164 ausgezählte Otoferlin negative IHZ) (Abbildung 19). Damit unterscheidet sich die mittlere Synapsenanzahl der Otoferlin positiven IHZ hoch signifikant von der mittleren Synapsenanzahl der Otoferlin negativen IHZ ($t(11)=-4,54$, $p<0,001$).

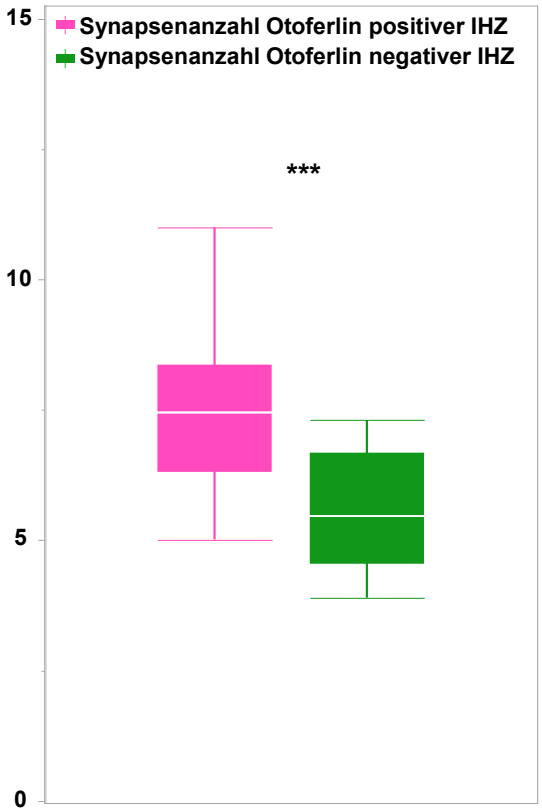

*Abbildung 19: Graphische Darstellung der Synapsenanzahl von Otoferlin-positiven und Otoferlin-negativen IHZ. Otoferlin-positive IHZ besitzen durchschnittlich 7,4 ±1,7 Synapsen/IHZ (n=158 ausgezählte Otoferlin-positive IHZ, dargestellt in pink), Otoferlin-negative IHZ besitzen durchschnittlich 5,5 ±1,2 Synapsen/IHZ (n=164 ausgezählte Otoferlin-negative IHZ, dargestellt in grün). Signifikant bei p<0,001, markiert mit ***.*

4. Diskussion

4.1. Haarzelldichte

Eine altersbedingte Schwerhörigkeit (Presbyakusis) manifestiert sich in Form einer altersabhängigen, beidseitig bestehenden Schallempfindungsstörung (Schuknecht, 1967). Die altersbedingten pathologischen Veränderungen können auf eine Degeneration von Haarzellen (sensorischer Typ), eine Degeneration von SGN (neuraler Typ), eine Atrophie der Stria vascularis (metabolischer Typ) und/oder auf eine Versteifung der Basilarmembran und des Ligamentum spirale (Innenohr-Schallleitungstyp) zurückzuführen sein (Schuknecht, 1967). Da die Hörminderung häufig die hohen Frequenzen betrifft, wird die primäre Ursache in dem Verlust der Haarzellen, insbesondere der ÄHZ im Bereich der basalen Windungen der Cochlea, gesehen. Sowohl exogene als auch endogene Faktoren haben Einfluss auf den Schweregrad und die Eintrittszeit der Altersschwerhörigkeit (Christensen et al., 2001). Dazu gehören Umweltfaktoren, wie Lärm und chemische Belastung, sowie Lebensstil- und Gesundheitsfaktoren, wie Nikotinabusus, Herz- Kreislauf- Erkrankungen und Diabetes (Christensen et al., 2001).

Eine Mauslinie, die dafür bekannt ist, von altersbedingter Schwerhörigkeit betroffen zu sein, ist die C57BL/6J-Mauslinie (Yasuda et al., 2020). Verschiedene Forschungsgruppen haben den altersbedingten Hörverlust bei dieser Mauslinie in einem spezifischen Verlust der ÄHZ beschrieben und auf das Cdh23ahl-Allel zurückgeführt (Yasuda et al., 2020, Johnson et al., 2006, Kikkawa und Miyasaka, 2016). Der Hörverlust bei dieser Mauslinie beschränkt sich anfangs nur auf den Hochfrequenzbereich, breitet sich im Alter jedoch in Richtung der niedrigen Frequenzen aus (Yasuda et al., 2020). Dies korreliert mit den quantitativen Messungen des Haarzellverlustes, die zeigen, dass bereits im Alter von 3 Monaten ein Haarzellverlust nachweisbar ist. Dieser betrifft vor allem die äußeren Haarzellen im Bereich der Basis der Cochlea (Spongr et al., 1997). Mit zunehmendem Alter nimmt der Haarzellverlust entlang der Basis zum Apex hin zu (Spongr et al., 1997).

Die Forschungsgruppe um Stalmann et al. analysierte *Otof*-KO-Mäuse und WT-Mäuse der C57BL/6-Mauslinie über einen Zeitraum von 48 Wochen (Stalmann et al., 2021). Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere *Otof*-KO-Mäuse ab einem Alter von 24 Wochen eine beschleunigte altersabhängige Degeneration aufweisen (Stalmann et al., 2021). Dabei waren sowohl die IHZ als auch die ÄHZ betroffen, wobei die Unterschiede nur bei den IHZ signifikant nachzuweisen waren (Stalmann et al., 2021). Der Haarzellverlust manifestierte sich insbesondere in den basalen Windungen der Cochlea und konnte zudem klinisch durch einen progressiven Abfall der DPOAE-Amplituden verifiziert werden (Stalmann et al., 2021). Die beschleunigte Degeneration von Haarzellen bei *Otof*-KO-Mäusen könnte durch das Fehlen des Mittelohrreflexes bedingt sein (Stalmann et al., 2021). Der Mittelohrreflex schützt zusammen mit der efferenten Inhibition des cochlären Verstärkers das Innenohr vor zu hohen Schallintensitäten. Dabei kontrahiert der M.stapedius und bewirkt somit eine Versteifung der Gehörknöchelchenkette. Ein fehlender Mittelohrrexflex und eine fehlende efferente Inhibition erhöht die Lärmschädigung im Innenohr und könnte damit bei *Otof*-KO-Mäusen zu einer beschleunigten Degeneration von Haarzellen führen (Stalmann et al., 2021).

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Cochlea-Präparate stammen von 8-15 Monate alten *Otof*-KO-Mäusen der CD1B6F1-Mauslinie, bei denen zu erwarten ist, dass der altersbedingte Hörverlust zu einem späteren Zeitpunkt als bei der C57BL/6J-Mauslinie auftritt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde auch die Frage untersucht, ob der altersbedingte Verlust von Haarzellen, ausgehend von der Basis nach apikal, zu beobachten ist. Es zeigte sich, dass die Haarzellanzahl zwischen den ausgewerteten basalen Cochlea- Abschnitten nicht signifikant von den midbasalen und apikalen Abschnitten abweicht. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die hier ausgewertete CD1B6F1-Mauslinie heterozygot für das Cdh23ahl-Allel ist, da sie durch Kreuzung von männlichen *Otof*-KO-Mäuse mit C57BL/6N-Hintergrund mit weiblichen *Otof*-KO-Mäusen mit CD1-Hintergrund erzeugt wurden. Bei einzelnen Präparaten war die

altersbedingte Haarzelldegeneration, deren Richtung basal zunimmt, dennoch gut sichtbar (Abbildung 20).

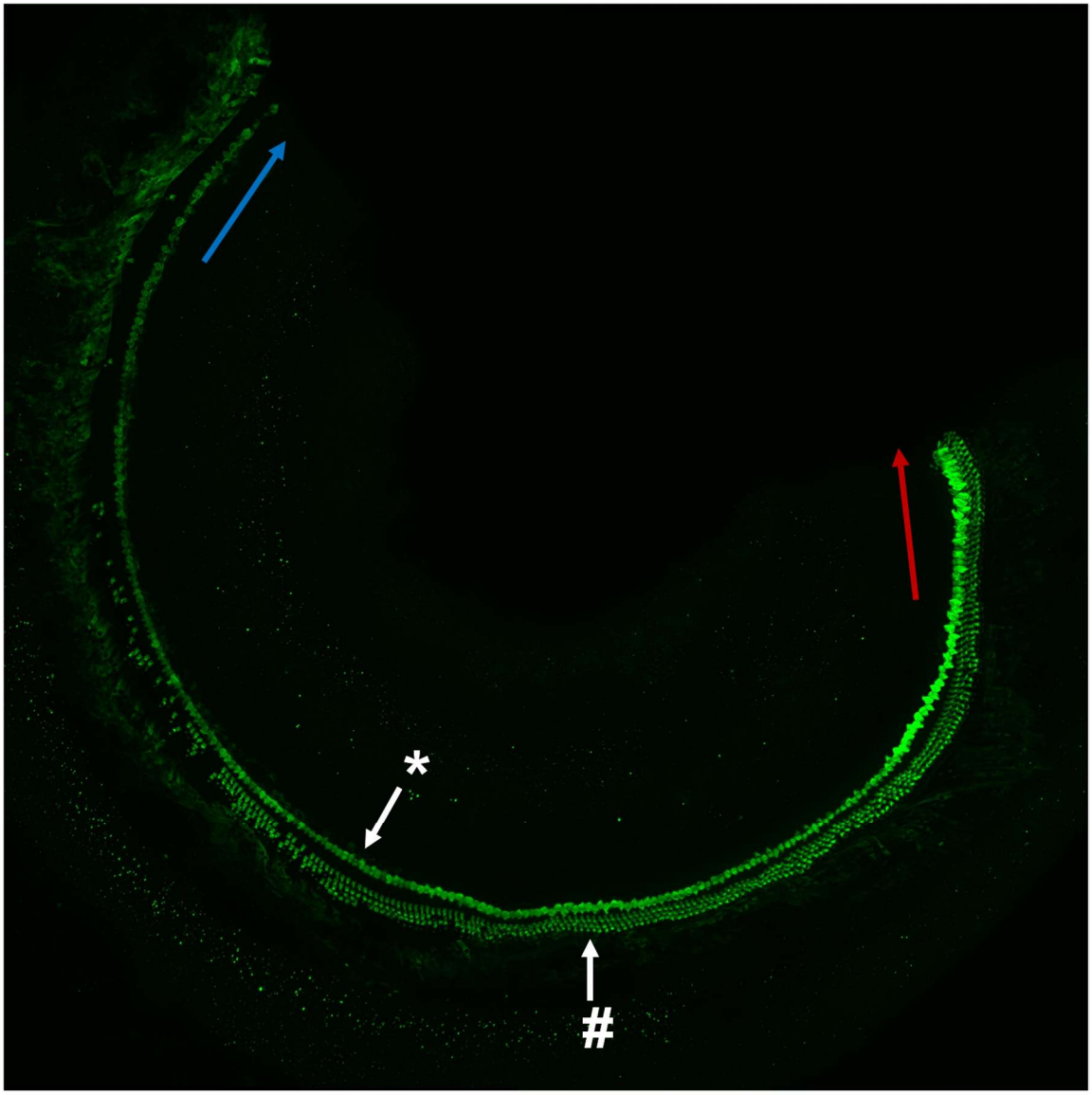

*Abbildung 20: Epifluoreszenzaufnahme der altersbedingten Degeneration des Haarzellverbundes. Zu sehen ist ein midbasaler Cochlea-Abschnitt einer nicht transduzierten Otof-KO-Maus der CD1B6F1- Mauslinie. Der blaue Pfeil zeigt Richtung basal, der rote Pfeil Richtung apikal. Zu sehen ist die altersbedingte Degeneration der ÄHZ (markiert mit #), die sich von basal Richtung apikal ausbreitet. Die IHZ (markiert mit *) sind in diesem Präparat nahezu vollständig erhalten.*

Des Weiteren war zu prüfen, ob die Otoferlin-Transduktion einen hemmenden Effekt auf den Haarzellverlust ausübt oder ob die Applikation des Gentherapeutikums und die damit einhergehende Volumenzunahme im Innenohr

zu einer erhöhten Degeneration an Haarsinnneszellen führt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der IHZ der transduzierten *Otof*-KO-Mäuse nicht signifikant von den Ergebnissen der nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäuse und WT-Mäuse abweicht. Bei der Haarzelldichte der ÄHZ war im midbasalen und basalen Cochlea-Abschnitten ebenfalls kein signifikanter Unterschied festzustellen. Jedoch zeigte sich bei der Haarzelldichte der ÄHZ im Bereich der apikalen Cochlea-Abschnitte, dass die WT-Mäuse im Vergleich zu den nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäusen durchschnittlich 12,2 weniger ÄHZ/100µm besitzen, bei einer Signifikanz von p=0,0050. Auch besaßen die WT-Mäuse im Vergleich zu den transduzierten 9,7 weniger ÄHZ/100µm, bei einer Signifikanz von p=0,0302. Ein signifikanter Unterschied zwischen den transduzierten und den nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäusen bestand nicht. Die Hypothese, dass *Otof*-KO-Mäusen tendenziell eine geringere Anzahl an Haarsinneszellen aufweisen, kann auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die geringe Anzahl an Präparaten, die ausgewertet werden konnte, die statistische Signifikanz beeinträchtigt hat. Die vorliegende Analyse legt nahe, dass eine Otoferlin-Transduktion keinen Einfluss auf die altersabhängige Haarzelldegeneration ausübt. Darüber hinaus ist die Hypothese aufzustellen, dass eine Otoferlin-Transduktion nicht zu einer erhöhten Degeneration an Haarzellen führt.

Aufgrund der unilateral erfolgten Injektion der Viren bei den transduzierten *Otof*-KO-Mäusen war ein intraindividueller Vergleich der beiden Cochleae möglich. Die Anzahl der IHZ und der ÄHZ unterschied sich zwischen der transduzierten, linken und der nicht-transduzierten, rechten Cochlea – unabhängig des Cochlea-Abschnittes– nicht signifikant. Durchschnittlich konnten 8,4 ±2,5 IHZ/100µm und 25,0 ±9,9 ÄHZ/100µm in den nicht-transduzierten Cochleae gezählt werden und 8,6 ±2,4 IHZ/100µm und 25,6 ±8,7 IHZ/100µm in transduzierten Cochleae. Die vorliegende Untersuchung stützt die oben genannte Hypothese, dass die Applikation von Otoferlin keinen Einfluss auf die altersbedingte Degeneration der Haarzellen zu haben scheint. Zudem scheint das Injektionsverfahren durch die runde Fenstermembran keine Schädigung der Haarsinneszellen zu verursachen.

Da sich die Anzahl der Haarzellen der transduzierten und nicht-transduzierten Cochleae nicht unterscheiden, kann auch ein protektiver Effekt auf das kontralaterale Ohr durch die Gentherapie diskutiert werden. Möglicherweise führt bereits eine unilaterale Virustransduktion zu einer bilateralen Wiederherstellung des Mittelohrreflexes und der efferenten Inhibition des cochleären Verstärkers.

4.2. Transduktionsrate

Eine hohe Transduktionsrate, die sich homogen über alle Bereiche der Cochlea verteilt, ist eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Innenohr-Gentherapie. Die Verteilung sowie die Höhe der Transduktionsrate wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beeinflusst.

Al-Moyed et al. zeigte 2019, dass die Auswahl des Split-AAV-Systems zu unterschiedlichen hohen Transduktionsraten führen kann (Al-Moyed et al., 2019). Dazu wurden Otoferlin-Dual-AAV-Hybrid und Otoferlin-Dual-AAV-Trans-Splicing-Halbvektoren in einen AAV2/6 Virus verpackt (Al-Moyed et al., 2019). Die Viren wurden durch die Membran des runden Fensters unilateral (in die linke Cochlea) am 6. bzw. 7. postnatalen Tag injiziert (p6-7) und die Corti-Organe wurden an p18-30 isoliert und immunmarkiert (Al-Moyed et al., 2019). Es zeigte sich, dass das Dual-AAV2/6-Hyb System mit 19% ±3 (n=9 Mäuse) eine geringere Transduktionsrate erreichte, als das Dual-AAV2/6-TS System mit durchschnittlich 30% ±4 (n=10 Mäuse) eine höhere Transduktionsrate erreichte (Al-Moyed et al., 2019). Anschließend durchgeführte Patch-Clamp-Messungen zeigten, dass die erreichte Transduktionsrate des Dual-AAV2/6-TS Systems bereits ausreichte, um die schnelle Exozytose wiederherzustellen und auch die anhaltende Exozytose einschließlich der Auffüllung des RRP in den IHZ zu verbessern (Al-Moyed et al., 2019).

Des Weiteren beeinflusst die Auswahl des AAV-Serotyps aufgrund seines Zelltropismus ebenfalls die Höhe der Transduktionsrate. Der in dieser Arbeit

verwendete AAV Serotyp Anc80L65 (AAV2/Anc80) konnte in den Forschungsarbeiten von Al-Moyed bereits eine ähnlich hohe Transduktionseffizienz aufweisen, wie der AAV2/6-Serotyp (Al-Moyed, 2019). Dazu wurde Otoferlin-Dual-AAV-Trans-Splicing-Halbvektoren an p5-6 in CD1B6F1-*Otof*-KO-Mäuse in die linke Cochlea injiziert. Die Corti-Organe wurden an p29-31 isoliert und immunmarkiert (Al-Moyed, 2019). Es konnte eine durchschnittliche Transduktionsrate des Proteins in voller Länge (C-terminales Otoferlin) von 15% ±5 (n=6 Mäuse) erreicht werden (Al-Moyed, 2019). Dabei zeigte die Quantifizierung, dass die Transduktionsrate in den apikalen Bereichen der Cochlea mit 19% ±5 höher war als in den midbasalen und basalen Bereichen mit 7% ±1 (Al-Moyed, 2019). In dieser Arbeit wurden Cochlea-Präparate von transduzierten *Otof*-KO-Mäusen der CD1B6F1-Mauslinie ausgewertet (n=8 Mäuse). Die Dual-AAV2/Anc80-TS-Injektion erfolgte an p7-8 durch die runde Fenstermembran der linken Cochlea. Die Corti-Organe wurden an p266-294, in einem Alter von ungefähr 9 Monaten, präpariert und immunhistochemisch markiert. Die Auswertungen ergaben eine Transduktionsrate von durchschnittlich 33,9% ±18,4, was mehr als doppelt so hoch ist, wie das Ergebnis von Al-Moyed. Die Auswertungen lassen vermuten, dass mit einer langfristigen Expression von Otoferlin in den IHZ nach einmaliger postnataler Virustransduktion zu rechnen ist. Die hohe Transduktionsrate des Anc80-Virus-Capsids lässt auf einen hohen Gewebetropismus schließen, sodass das Anc80-Virus-Capsid eine geeignete Wahl für weitere Studien zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit konnte der hohe Gewebetropismus des Anc80-Viurs-Capsids durch die eGFP-Fluoreszenz der drei analysierten immunhistochemisch markierten WT-Mäuse bestätigt werden. Dabei konnte dieselbe Beobachtung gemacht werden, wie sie bereits in Al-Moyed an AAV2/6-Viren beschrieben worden ist; die eGFP-Fluoreszenz zeigte sich nicht nur in den IHZ, sondern auch in den ÄHZ, Stützzellen und SGN. (Al-Moyed et al., 2019). Dies deutet daraufhin, dass auch der AAV2/Anc80-Virus keinen spezifischen IHZ- Tropismus aufweist. Interessanterweise beschränkt sich die Otoferlin- Immunfluoreszenz nach der Otoferlin-Injektion auf die IHZ, obwohl die Expression von eGFP und Otoferlin durch denselben Promotor angetrieben werden und von derselben mRNA übersetzt werden (Al-Moyed et

al., 2019). Al-Moyed et al. vermuteten bereits, dass eine post-transkriptionelle Regulation oder ein gezielter Proteinabbau die Expression von Otoferlin auf die IHZ beschränken könnten (Al-Moyed et al., 2019). Abgesehen von der Auswahl des AAV-Serotyps könnte eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der hohen Transduktionsrate auf einen Erhalt der Otoferlin-positiven IHZ bei gleichzeitiger Degeneration der Otoferlin-negativen IHZ zurückzuführen sein. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass sich der Effekt der progressiven, altersabhängigen Degeneration von Haarzellen bei *Otof*-KO-Mäusen, wie von Stalmann et al. festgestellt wurde, durch gentherapeutische Anwendungen verhindern oder aufheben lässt (Stalmann et al., 2021). Die Verifizierung der vorgebrachten These erfordert die Durchführung weiterer Studien. In diesen Studien sollte eine höhere Anzahl an Mäusen behandelt werden, um an verschiedenen Zeitpunkten morphologische Untersuchungen vorzunehmen.

Ein weiterer entscheidender Aspekt einer erfolgreichen Innenohr-Gentherapie ist die homogene Verteilung der Otoferlin-positiven IHZ. Dies steht in Korrelation zur frequenzspezifischen Abbildung des Hörens. Es wird diskutiert, dass die Wahl des Injektionsortes sowohl Einfluss auf die Transduktionsrate, als auch auf die Verteilung der Otoferlin positiven IHZ entlang der Cochlea hat (Talaei et al., 2019). Um virale Vektoren in das Innenohr zu injizieren, wird als Injektionsort häufig die Membran des runden Fensters oder der hintere Bogengang des Vestibularorgans genutzt (Talaei et al., 2019). Eine Studie aus 2019 verglich dazu die Injektion durch die Membran des runden Fensters und die Injektion in den hinteren Bogengang des Vestibularorgans (Talaei et al., 2019). Die Ergebnisse zeigten, dass die Farbintensität bei der Injektion durch das runde Fenster schwächer ausfiel und es zu einer Farbstoffakkumulation an der Cochlea- Basis kam (Talaei et al., 2019). Im Vergleich dazu war die Farbintensität bei der Injektion in den hinteren Bogengang stärker und verteilte sich gleichmäßig von der Basis bis zum Apex der Cochlea (Talaei et al., 2019). Weitere Studien, die statt des Farbstoffes virale Vektoren verwendeten und anschließend die Genexpression in den Zellen untersuchten, zeigten ebenfalls einen basal-apikalen Gradienten nach der Virusinjektion durch die runde Fenstermembran

(Chien et al., 2015, Yoshimura et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte ein basal-apikaler Gradient nicht festgestellt werden, obwohl das Virus ebenfalls durch die runde Fenstermembran injiziert worden ist. Die Transduktionsrate lag apikal bei 30,9% ±17,7, midbasal bei 35,9% ±27,2 und basal bei 35,1% ±11,1. Wahrscheinlich spielen weitere, noch unbekannte Faktoren eine Rolle bei der Verteilung der Transduktionsrate. Denkbar ist ein Einfluss des Alters der *Otof*-KO-Mäuse am Tag der Virustransduktion. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Mäuse wurden, im Gegensatz zu den jüngeren Vergleichstieren von Al-Moyed, ein bis zwei Tage später (p7-8) mit der Viruslösung injiziert. Dies könnte zu einer verbesserten Verteilung der Viruslösung geführt haben, sodass die IHZ anschließend gleichmäßiger Otoferlin exprimiert haben. Al-Moyed vermutete bereits, dass die IHZ in den apikalen Cochlea- Abschnitten aufgrund des weniger fortgeschrittenen Entwicklungsstadiums mehr Zelloberflächenrezeptoren exprimieren, die AAV für den Zelleintritt benötigen (Al-Moyed, 2019). Diese Überlegung lässt den Schluss zu, dass ein früherer Injektionszeitpunkt zu einer verbesserten Transduktionsrate führen könnte, wobei jedoch eine schlechtere Verteilung entlang der Cochlea-Windungen als möglicher Nachteil zu nennen ist. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass das Innenohr beim Menschen bei Geburt bereits vollständig ausgereift ist, während das Innenohr von Mäusen erst innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt vollständig ausreift (Yoshimura et al., 2018). Im Vergleich dazu reift das Innenohr ausgehend von den basalen Cochlea-Abschnitten erst innerhalb zwei Wochen nach Geburt vollständig aus (Yoshimura et al., 2018). Die Wahl eines noch früheren Zeitpunktes der Virustransduktion am Mausmodell würde demnach eine noch stärkere Diskrepanz zur klinischen Situation am Menschen zur Folge haben. Daher erscheint es sinnvoll, eine auf das reife Mausohr ausgerichtete Strategie für die Verabreichung von Gentherapien zu entwickeln, um die klinische Situation des Menschen besser abzubilden. Der in dieser Arbeit gewählte Injektionszeitpunkt an p7-8 stellt einen Kompromiss zwischen der Herstellung eines ähnlichen Entwicklungszeitpunkts des Innenohrs von Maus und Mensch und der Eliminierung von unnötigen Gewebeschäden dar (Al-Moyed, 2019). Zu diesem Zeitpunkt kann die Glaspipette für die Injektion noch durch die Bulla

auditiva, die die RWM bedeckt, eindringen (Al-Moyed, 2019). Die Höhe und Verteilung der Transduktionsrate unterliegt ebenfalls einer Limitation durch das Innenohr an sich. Zum einen ist das Injektionsvolumen durch das knöcherne Labyrinth begrenzt, zum anderen reagiert das mechanosensorische Cochlea-Gewebe hochsensibel auf Druck- und Volumenänderungen (Yoshimura et al., 2018). Dies kann eine Degeneration der Haarzellen zur Folge haben, wodurch lediglich eine relativ geringe Transgenexpression zu beobachten ist (Yoshimura et al., 2018). Des Weiteren wird eine Vergrößerung des Endolymphvolumens, auch als endolymphatischer Hydrops bezeichnet, mit der Ménière-Krankheit assoziiert, welche sich als Kombination von Hörverlust und Schwindel manifestiert und als unerwünschte Nebenwirkung der Innenohr-Gentherapie vermieden werden sollte (Merchant et al., 2005).

4.3. Synapsen

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Synapsen stammen von *Otof*-KO-Mäusen, die an p7-8 mit dem Dual-AAV2/Anc80-TS injiziert worden sind. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Otoferlin-positiven und Otoferlin-negativen IHZ bei den DualAAV2/Anc80-TS transduzierten *Otof*-KO-Mäusen festgestellt werden ($p<0,001$). Die mittlere Synapsenanzahl der Otoferlin-positiven IHZ lag bei 7,4 ±1,7. Die mittlere Synapsenanzahl der Otoferlin-negativen IHZ betrug 5,5 ±1,2. IHZ, die nach der Virus- Transduktion kein Otoferlin exprimieren, besitzen damit im Durchschnitt knapp 2 Synapsen weniger. Es ist anzunehmen, dass Otoferlin essentiell für den langfristigen Erhalt der Synapsen ist. Eine Gentherapie könnte daher positive Auswirkungen auf das Synapsenüberleben der IHZ haben. Da in dieser Arbeit nur die behandelte Cochlea der Maus hinsichtlich des Synapsenerhalts ausgewertet wurde, wären weitere Studien interessant, um zu überprüfen, ob eine unilaterale Otoferlin-Transduktion auch Auswirkungen auf die kontralaterale Seite hat.

Otoferlin wird während und nach der Zellreifung im Zytosol und an der Plasmamembran der IHZ exprimiert (Roux et al., 2006). Eine fehlende Expression von Otoferlin in den IHZ wurde mit einer Abnahme der IHZ-Bandsynapsen nach Hörbeginn in Verbindung gebracht (Roux et al., 2006). Eine Studie aus 2021 bestätigte diese Vermutung und zeigte über einen Zeitraum von 48 Wochen eine beschleunigte Degeneration der Synapsen bei *Otof*-KO-Mäusen (Stalmann et al., 2021). Während sowohl *Otof*-KO-Mäuse als auch Wildtyp-Kontrollen am 14. postnatalen Tag (p14) die gleiche Anzahl an Synapsen pro IHZ aufweisen, kommt es anschließend bei den *Otof*-KO-Mäusen zu einer beschleunigten Degeneration von durchschnittlich 7,0 ±0,8 Synapsen pro IHZ in der 8. postnatalen Woche (w8) auf 5,7 ±1,3 Synapsen pro IHZ in der 48. postnatalen Woche (w48) (Stalmann, 2015). Im Vergleich dazu besitzen die WT-Kontrollmäuse in der 8. postnatalen Woche (w8) noch 14,7 ±1,5 Synapsen pro IHZ und in der 48. Postnatalen Woche (w48) 8,9 ±1,6 Synapsen pro IHZ (Stalmann, 2015). Damit besaßen die *Otof*-KO-Mäuse in der 48. postnatalen Woche durchschnittlich 3 Synapsen weniger als die WT-Kontrollmäuse.

Da jede IHZ-Bandsynapse von einem SGN kontaktiert wird, ist zu erwarten, dass eine Verringerung der Anzahl der Bandsynapsen zu einem Rückgang der SGN führt (Reisinger, 2020). In der Studie von Stalmann et al. konnte dazu gezeigt werden, dass sich die Anzahl der SGN bei *Otof*-KO-Mäusen und WT-Kontrollmäusen im Alter von 8 Wochen nicht signifikant unterscheidet (Stalmann et al., 2021). Erst in einem Alter von 48 Wochen konnte ein SGN-Verlust der *Otof*-KO-Mäusen auf insgesamt 79% der WT-SGN-Zahlen festgestellt werden (Stalmann et al., 2021). Diese Zahlen zeigen, dass die SGN bei *Otof*-KO-Mäusen erst zu einem späteren Zeitpunkt abgebaut werden. Eine Hypothese hierfür könnte die langfristig ausbleibende akustische Stimulation sein. Es kann angenommen werden, dass eine rechtzeitig eingeleitete Therapie, beispielsweise durch die Implantation eines Cochlea-Implantats oder der Applikation eines Gentherapeutikums, zu einer langfristigen Erhaltung der SGN führt und zusätzlich einen Einfluss auf den Therapieerfolg hat. Aufgrund der Korrelation zwischen dem Erhalt der Synapsen und dem langfristigen Erhalt der

SGN durch die Anwesenheit von Otoferlin besteht die Notwendigkeit, die Frage zu klären, ob eine Virustransduktion die Degeneration aufhalten kann. Zu diesem Zweck hat Al-Moyed et al. apikale Cochlea-Ausschnitte von transduzierten und nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäusen verglichen (Al-Moyed et al., 2019). In Dual-AAV-TS transduzierten *Otof*-KO-IHZ, die an p6-7 transduziert wurden, konnten bei p26-29 durchschnittlich 10 ±0,2 Synapsen pro IHZ (n=59 IHZ) bestimmt werden. Dies ist vergleichbar mit Dual-AV-Hyb-transduzierten *Otof*-KO-Mäusen, die durchschnittlich 10 ±0,3 Synapsen pro IHZ (n=37 IHZ) aufwiesen (Al-Moyed et al., 2019). Auch an den kontralateralen, nicht injizierten Cochleae (10 ±0,3, n=46) und an den nicht transduzierten *Otof*-KO-Mäuse (9 ±0,3, n=65 IHZ) konnte eine ähnliche Synapsenanzahl ermittelt werden. Im Vergleich dazu besaßen die CD1B6F1- WT-Mäuse mit 15 ±0,3 Bändersynapsen pro IHZ (n=108 IHZ) und die B6-WT-Mäuse mit 15 ±0,5 Bändersynapsen pro IHZ (n=48) durchschnittlich 5 Synapsen mehr pro IHZ. Die Ergebnisse von Al-Moyed et al. legen nahe, dass eine vorzeitige Initiierung der Virustransduktion an p6-7 erforderlich wäre, um eine beschleunigte Degeneration der Synapsen vollständig zu unterbinden. Wie bereits dargelegt, ist das menschliche Innenohr bei der Geburt bereits vollständig ausgereift, während das Innenohr von Mäusen erst innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt die vollständige Ausreifung erreicht (Yoshimura et al., 2018). Die Wahl eines früheren Zeitpunkts für die Virustransduktion würde demnach eine größere Abweichung zur klinischen Situation zur Folge haben.

Bislang existieren keine Studien, die sich mit den langfristigen Auswirkungen der Virustransduktion auf die Bändersynapsen befassen. Die hier vorgestellten Ergebnisse basieren auf einem intraindividuellen Vergleich von Otoferlin-positiven und Otoferlin-negativen IHZ bei 9–10 Monate alten transduzierten *Otof*-KO-Mäusen (p266–294). Es ist zu vermuten, dass sich der Synapsenverlust durch die Otoferlin Transduktion stabilisiert und die Anwesenheit von Otoferlin in den IHZ dazu führt, dass signifikant mehr synaptische Verbindungen erhalten bleiben.

4.4. Auswirkungen auf die Hörleistung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung der langfristigen Effekte einer Genapplikation bei *Otof*-KO-Mäuse auf zellulärer Ebene. Das folgende Kapitel hat die Intention, einen kurzen Überblick über die Auswirkungen auf die Hörleistung der behandelten Mäuse zu geben und einen Zusammenhang zu der in dieser Arbeit ausgewerteten Haarzelldichte, Transduktionsrate und Synapsenanzahl herzustellen. Die audiologischen Untersuchungen von Al-Moyed wurden von April 2018 bis Juni 2019 an der Universität Göttingen durchgeführt (vgl. Kapitel 2.4).

Die transduzierten *Otof*-KO-Mäuse Nr.1 und Maus Nr.2 wiesen bei allen drei durchgeführten ABR-Messungen charakteristische ABR-Wellen als Reaktion auf kurze Klickreize (20 Hz) auf. Die ersten Messungen erfolgten im Alter von einem Monat, d.h. drei Wochen nach der Dual-AAV-Injektion. Bei beiden Tieren wurde ein Schwellenwert von 40 dB (Schalldruckpegel in SPL) ermittelt. Dieser Wert liegt damit etwas höher als bei den nicht injizierten Wildtyp-Kontrolltieren, die im Vergleich bereits auf Klickgeräusche von 30dB SPL reagierten. Die ABR-Schwellenwerte blieben bei Maus Nr.2 mit 40dB SPL über den getesteten Zeitraum stabil, wohingegen sich der Schwellenwert bei Maus Nr.1 bei der 7- und 10-Monatsmessung auf 30dB SPL verbesserte. Die Amplituden der ABR-Wellen sind bei beiden Mäusen deutlich erkennbar (Abbildung 21, Abbildung 22).

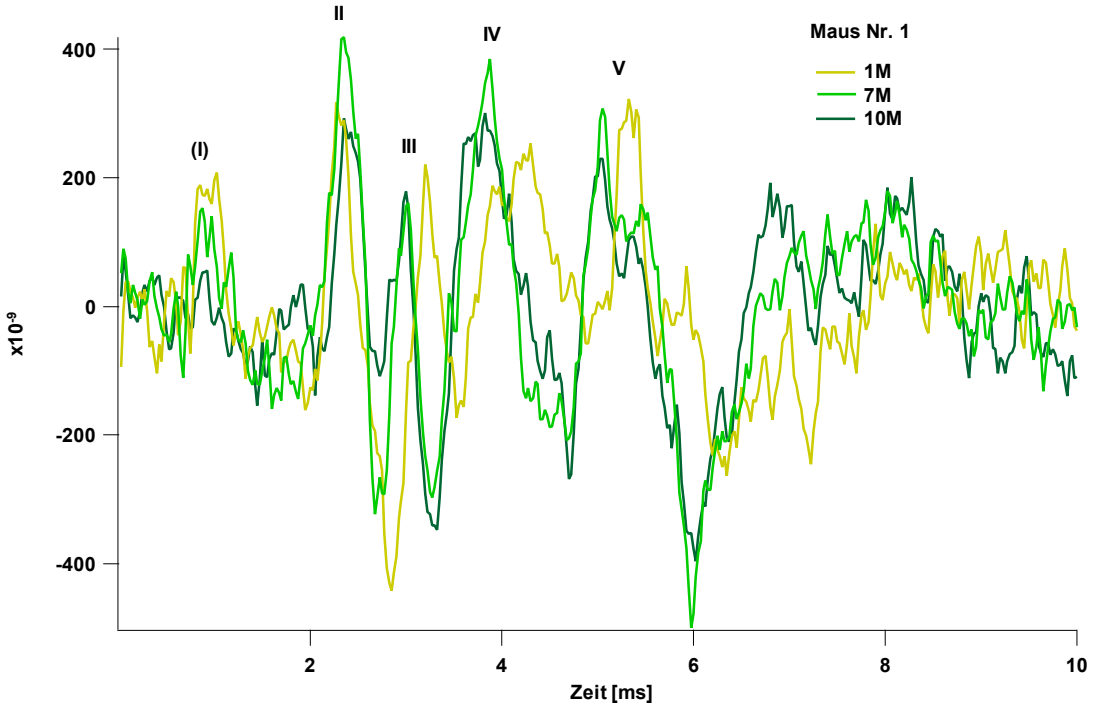

Abbildung 21: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr. 1, in gelb: ABR-Wellenkurve 1 Monat postnatal, in hellgrün: ABR-Wellenkurve 7 Monate postnatal, in dunkelgrün: 10 Monate postnatal. Die Amplituden der Wellen I-V sind gekennzeichnet.

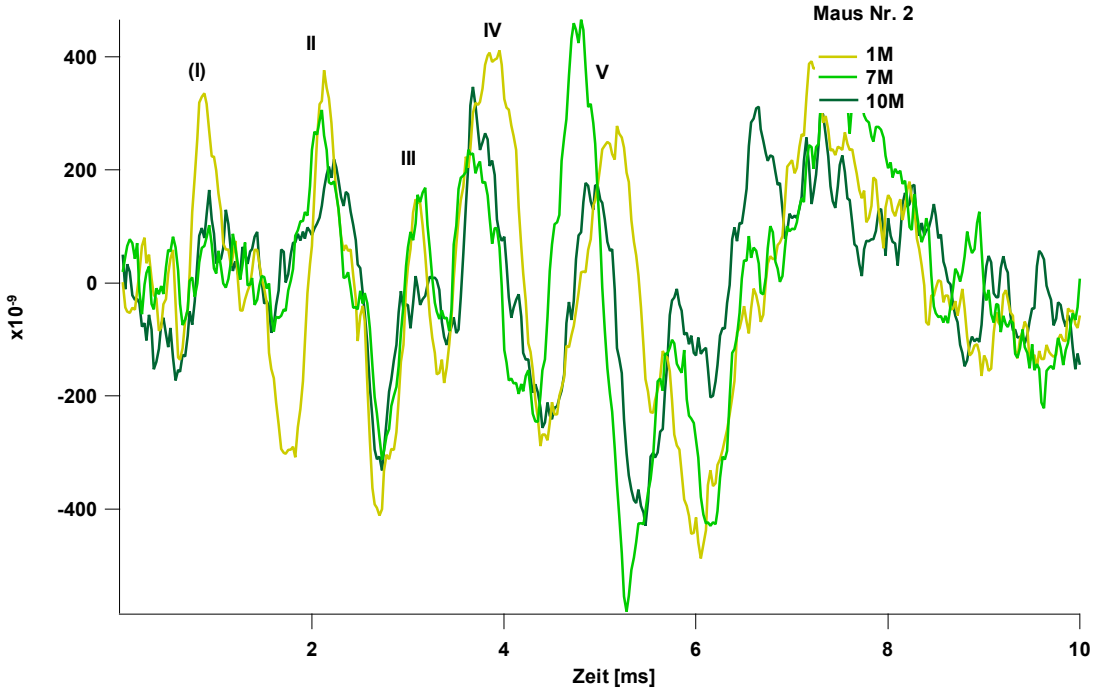

Abbildung 22: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr. 2, in gelb: ABR-Wellenkurve 1 Monat postnatal, in hellgrün: ABR-Wellenkurve 7 Monate postnatal, in dunkelgrün: 10 Monate postnatal. Die Amplituden der Wellen I-V sind gekennzeichnet.

Die erste sichtbare Amplitude in den Abbildungen 21 und 22 ist nicht eindeutig als Welle I zu identifizieren. Stattdessen handelt es sich hierbei um das Summationspotenzial, welches der Welle I vorausgeht. Auffallend ist im zeitlichen Verlauf die Abnahme des Summationspotentials. Die Messungen ergaben, dass das Summationspotential bei Maus Nr.1 im Alter von 1 Monat bei 200nV lag und im Alter von 7 bzw. 10 Monaten auf 100 bzw. 50nV sank. Bei Maus Nr.2 war ein ähnlicher Trend zu beobachten. Das hohe Summationspotential im Alter von einem Monat lässt sich vermutlich durch das Fehlen einer Rückkopplungsschleife des olivocochleären Systems erklären, welches bei lauten Geräuschen als Cochlea-Schutz fungiert. Das abnehmende Summationspotenzial im Alter von sieben bzw. zehn Monaten könnte auf eine Aktivierung des olivocochleären Systems im Laufe der Zeit hindeuten. Eine weitere mögliche Erklärung könnte in einer Degeneration der Haarzellen mit zunehmendem Alter der Mäuse liegen. Sowohl bei Maus Nr.1 als auch bei Maus Nr.2 ist die Welle I nicht eindeutig zu identifizieren. Dies ist vermutlich auf die nicht synchrone Reizweiterleitung der synaptischen Verbindungen in den depolarisierten IHZ zurückzuführen. Die zeitlich asynchrone Auslösung der Aktionspotenziale der im Rosenthalkanal liegenden Zellkörper der SGN führt zu einer Aufhebung der Summenpotentiale, sodass eine eindeutige Zuordnung der Welle I zu abgeleiteten Werten nicht möglich ist. Die Amplituden der der ABR-Wellen II bis V blieben bei beiden Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil. Vergleicht man die ABR-Amplituden der transduzierten *Otof*-KO-Mäuse mit den Wildtyp-Kontrollen, so fällt auf, dass die Amplituden der transduzierten *Otof*-KO-Mäuse kleiner sind. Diese Beobachtung lässt sich durch die geringere Anzahl an Otoferlin-positiven IHZ erklären und weist darauf hin, dass eine höhere Transduktionsrate mit einer Zunahme der ABR-Amplitude einhergeht. Es sei darauf hingewiesen, dass bei der Gegenüberstellung von Maus Nr.1 mit Maus Nr.2 eine Diskrepanz in Bezug auf die Transduktionsrate ersichtlich wird. Maus Nr.2 weist eine höhere Transduktionsrate von durchschnittlich 48,7% auf, während die Maus Nr.1 eine durchschnittliche Transduktionsrate von 31,9% aufweist. Dieser Unterschied von

nahezu 20% manifestiert sich jedoch nicht in eindeutiger Weise bei den ABR-Amplituden dieser beiden Mäuse. Bei beiden Mäusen fällt eine Linksverschiebung der Amplituden zwischen den Hörmessungen des 1.Lebensmonats und den Hörmessungen des 7. bzw. 10.Monats auf, wobei diese Verschiebung sowohl bei Maus Nr.1 als auch bei Maus Nr. 2 zu beobachten ist. Die verlängerte Latenzzeit in den ersten Monaten könnte darauf hindeuten, dass in diesem Zeitraum die Reifung der Hörbahn durch das anfangs fehlende Otoferlin verzögert ist.

Die ABR-Auswertungen der transduzierten *Otof*-KO-Mäuse Nr.3 und Nr.4 weisen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Mäusen eine geringere Aussagekraft auf. Maus Nr.3 zeigt charakteristische ABR-Wellen mit einer eindeutigen Linksverschiebung der Wellen im Verlauf des Alters, insbesondere der Wellen V-VIII (Abbildung 23).

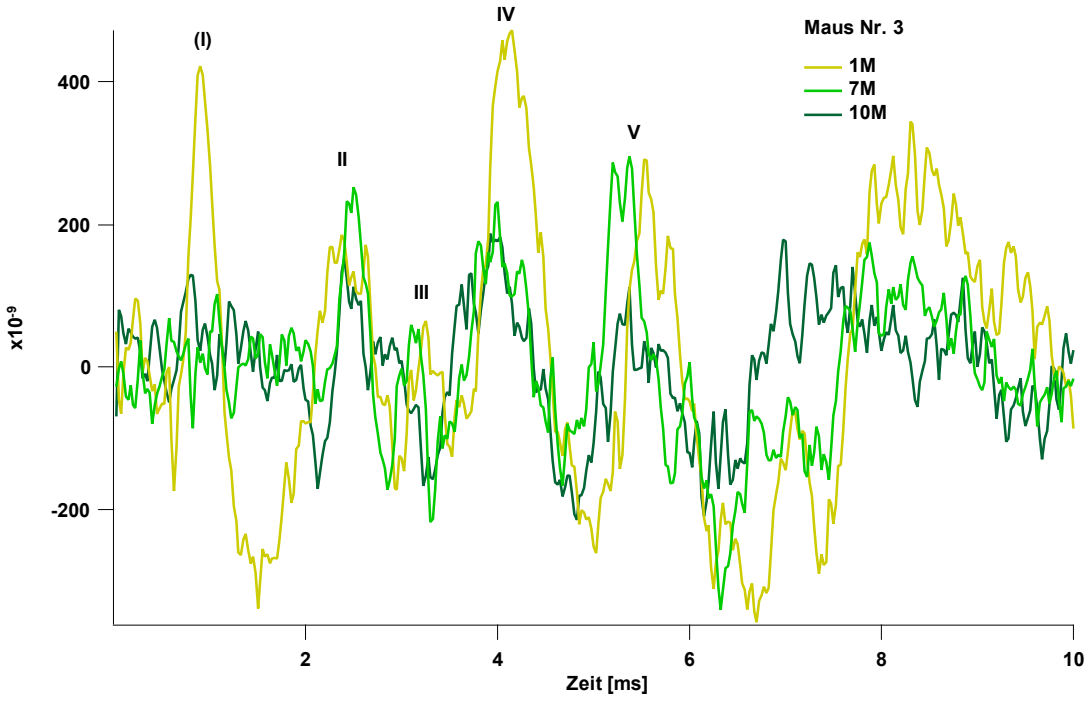

Abbildung 23: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr.3, in gelb: ABR-Wellenkurve 1 Monat postnatal, in hellgrün: ABR-Wellenkurve 7 Monate postnatal, in dunkelgrün: 10 Monate postnatal. Die Amplituden der Wellen I-V sind gekennzeichnet.

Der Schwellenwert dieser Maus betrug 40dB (Schalldruckpegel in dB SPL) und blieb auch im siebten Lebensmonat unverändert. Bei den Hörmessungen im Alter von zehn Monaten verbesserte sich der Schwellenwert sogar auf 30 dB und lag damit im Bereich der Wildtyp-Schwellenwerte. Auffallend ist, dass die Haarzelldichte der IHZ im Bereich des basalen Cochlea-Abschnittes mit 3,8 IHZ pro 100µm sehr gering ausfällt, die Transduktionsrate jedoch mit 36,7% sehr hoch ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Otoferlin die IHZ langfristig länger erhalten bleiben. Die Transduktionsrate im midbasalen und apikalen Cochlea-Abschnitt ist mit 4,8% bzw. 5% gering, was insbesondere im Alter von 7 und 10 Monaten Einfluss auf die geringere Amplitudengröße haben könnte.

Bei Maus Nr.4 konnten im ersten Lebensmonat noch relativ typische ABR-Wellen als Reaktion auf kurze Klickstimuli festgestellt werden. Im Alter von sieben und zehn Monaten zeigen die Aufnahmen dagegen keine Amplituden, die eindeutig einer ABR-Welle zugeordnet werden können (Abbildung 24).

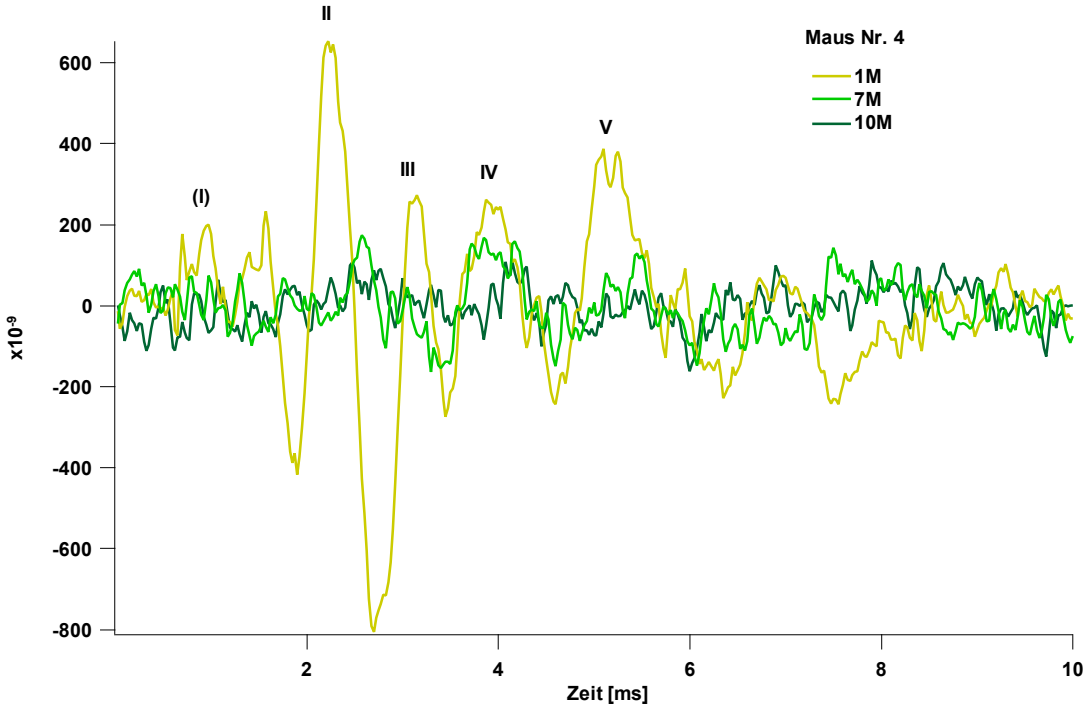

Abbildung 24: ABR-Wellenkurven als Reaktion auf kurze Klickreize (20Hz) der Dual-AAV-TS-injizierten Otof-KO-Maus Nr.4, in gelb: ABR-Wellenkurve 1 Monat postnatal, in hellgrün: ABR-Wellenkurve 7 Monate postnatal, in dunkelgrün: 10 Monate postnatal. Die Amplituden der Wellen I-V sind gekennzeichnet.

Der Schwellenwert der Maus Nr.4 lag im ersten Lebensmonat bei einem Schalldruckpegel von 40dB und verschlechterte sich im siebten und zehnten Lebensmonat auf 50dB. Die Auswertung der Haarzelldichte der IHZ dieser Maus ergibt, dass diese nur im basalen Bereich unter dem Durchschnitt liegt, während im midbasalen Bereich noch überdurchschnittlich viele IHZ erhalten sind. Da die Transduktionsrate im apikalen und basalen Bereich der Cochlea im Bereich des Mittelwertes liegt, scheint die Transduktionsrate bei dieser Maus nicht hoch genug zu sein, um charakteristische ABR-Wellen zu erzeugen. Es wird angenommen, dass eine durchschnittliche Transduktionsrate von 33,9% ±18,4 bei einigen Tieren ausreicht, während andere Tiere möglicherweise eine höhere Transduktionsrate benötigen. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Differenzierung hinsichtlich der Höhe des Otoferlin-Spiegels in einer einzelnen IHZ vorgenommen, wobei ein möglicher weiterer Erklärungsansatz für das Ausbleiben der ABR-Wellen in dem insgesamt niedrigen Otoferlin-Spiegel dieser Maus begründet liegen könnte. Ein Absinken des Otoferlin-Spiegels im Verlaufe des Alterungsprozesses könnte die Folge sein, da im ersten Lebensmonat noch ABR-Wellen induziert werden konnten. Es lässt sich ableiten, dass in weiteren Studien nicht nur die Transduktionsrate, sondern auch der Otoferlin-Spiegel bestimmt werden sollte.

4.5. Limitationen

4.5.1. Quantität und Qualität der Präparate

Aufgrund der technisch anspruchsvollen Präparation, waren einige basale Cochlea-Abschnitte abgerissen und konnten daher nur unvollständig evaluiert werden. Insbesondere bei den *Otof*-WT-Mäusen lag die Drop-out Rate bei 50%, da statt der 6 basalen Cochlea-Abschnitte nur 3 ausgewertet werden konnten. Dies ist unter anderem auf die technisch anspruchsvolle Präparation

zurückzuführen, die durch die zunehmende Verknöcherung der Cochlea bei älteren Tieren zusätzlich erschwert wird.

Des Weiteren könnte eine Limitation dieser Arbeit in der unterschiedlich hohen Anzahl der Versuchstiere gelegen haben. Hierbei betrug die Anzahl der transduzierten *Otof*-KO-Mäuse n=8, die Anzahl der nicht behandelten *Otof*-KO-Mäuse n=23 und die Anzahl der gesunden *Otof*-WT-Mäusen n=3. Die Auswertung der Cochlea-Präparate der acht transduzierten *Otof*-KO-Mäuse reduzierte sich aufgrund der unilateralen Virustransduktion um die Hälfte, die jedoch mit dem Vorteil eines möglichen intraindividuellen Vergleichs einherging.

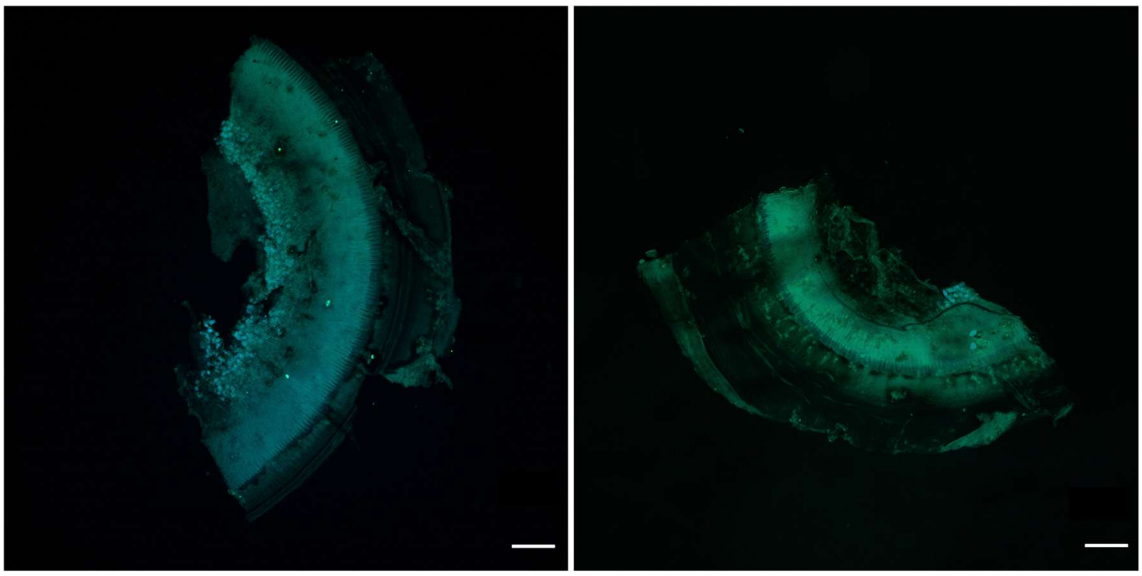

Abbildung 25: Epfiluoreszenzaufnahmen von zwei nicht ausgewerteten Cochlea-Präparaten. Links: Basaler Abschnitt einer präparierten Cochlea: Es sind weder Haarzellen, noch Stützzellen zu sehen. Zusätzlich ist es beim Präparieren zu einem Abriss gekommen. Rechts: Midbasaler Abschnitt einer präparierten Cochlea: Es sind weder Haarzellen und nur vereinzelte Stützzellen zu sehen. Es besteht der Verdacht, dass dieses Präparat falsch herum eingebettet worden ist. Skalenbalken: 100µm.

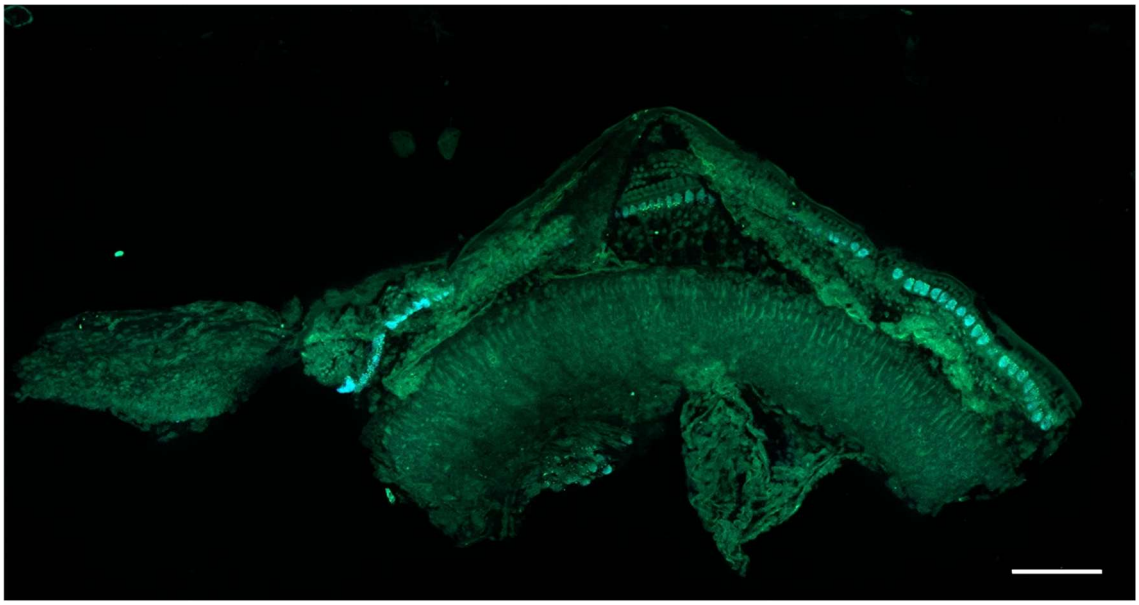

Abbildung 26: Epiflouoreszenzaufnahme eines nicht ausgewerteten Cochlea-Präparates. Zu sehen ist ein basaler Abschnitt der Cochlea. Es sind Haarzellen sichtbar, jedoch ist es beim Eindeckeln zu einem Abknicken des Gewebes gekommen. Skalenbalken: 100µm.

4.5.2. Qualitative Einschränkungen der Immunfluoreszenz

Da die Auswertung der Cochlea-Präparate auf dem Prinzip der Immunfluoreszenz basierte, sollten in diesem Zusammenhang einige Faktoren genannt werden, die die Qualität und Auswertung des Fluoreszenzbildes beeinflussen können:

Das Prinzip der Fluoreszenz beruht auf Molekülen, die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und anschließend mit Licht einer längeren Wellenlänge emittieren (Stokes-Verschiebung). Fluoreszierende Moleküle, die für die Anfärbung von Präparaten verwendet werden, bezeichnet man als Fluorochrome.

Die molekulare Grundlage besteht aus einem angeregten Elektron, welches durch Absorption eines Lichtteilchens (Photon) in einen energetisch höheren Zustand versetzt wird (von S_0 auf S_1). Da dieser Zustand instabil ist, fällt das Elektron in seinen Grundzustand S_0 zurück und gibt die überschüssige Energie in Form von Licht einer längeren Wellenlänge wieder ab. Der Wechsel zwischen Grund- und Anregungszustand ist in der Theorie unbegrenzt oft möglich, jedoch

in der Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie auf eine gewisse Anzahl begrenzt, da es aufgrund der Intensität und der Energie des einfallenden Anregungslichtes zu einer photochemischen Zerstörung des Fluorochroms kommen kann. Dies resultiert in einem Ausbleichen der Präparate. Um Ausbleichungsprozesse der in dieser Arbeit verwendeten Präparate zu vermeiden, wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt und nur für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop aus dem Kühlschrank genommen. Es wurde die geeignete Lichtintensität mittels des ZEN 2.6 proSoftware (blue edition) der Carl Zeiss Microscopy GmbH ausgewählt, um einer Zerstörung der Fluorchrome entgegenzuwirken. Zusätzlich wurde dem Einbettmedium Mowiol 4-88 nach Herstellerangaben das Antifade-Mittel DABCO hinzugegeben um ein Ausbleichen bei Licht zu verzögern.

Da in dieser Arbeit mehrere Strukturen in einem Präparat gleichzeitig dargestellt werden sollten, wurde bei der Auswahl der Antikörper auf unterschiedliche Anregungs- und Emissionsspektren geachtet.

Für ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis wurden mehrfach bewährte Antikörper mit hoher Qualität in der optimalen Konzentration ausgewählt. Dadurch war ein ausreichend hohes Signal- Hintergrund- Verhältnis bei den Präparataufnahmen vorhanden, was die Auswertung erleichterte. Nichtsdestotrotz gab es vereinzelte Präparate, in denen sich die Auszählung der Zellen als sehr schwierig erwies, da sich beispielsweise die einzelnen Zellen nicht eindeutig voneinander und von dem Hintergrund unterscheiden ließen.

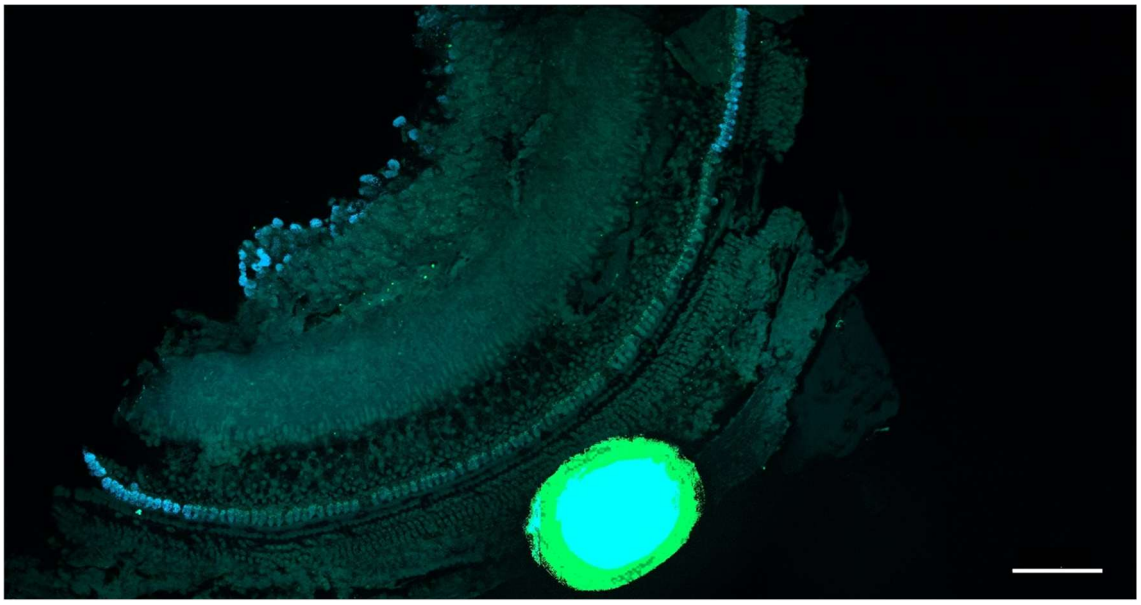

Abbildung 27: Epifluoreszenzaufnahme eines basalen Cochlea-Abschnittes mit einem fluoreszierenden Fleck. Der Fehler ist bei der Färbung entstanden, sodass ein Teil der ÄHZ nicht gezählt werden konnte. Skalenbalken: 100µm.

4.6. Ausblick

Mehrere Unternehmen und Forschungsgruppen haben sich bereits auf die Entwicklung und Forschung von Gentherapien bei Menschen mit Hörminderungen spezialisiert. Dazu gehört auch die Firma Akouos (Boston, USA), welche mittlerweile eine Tochterfirma von Eli Lilly (Indianapolis, USA) ist und Gentherapien auf der Basis von AAV-Vektoren entwickelt. Forschungsschwerpunkt ist dabei die Etablierung einer AAV-Gentherapie zur Rehabilitation des Hörvermögens bei Personen mit sensorineuralem Hörverlust aufgrund von Mutationen im Otoferlin-Gen. Die Ergebnisse der präklinischen Studien von Akouos, in deren Rahmen auch die Forschungsergebnisse von Al-Moyed Berücksichtigung fanden, konnten nachweisen, dass eine Otoferlin-Transduktion zu einer vollständigen Expression von Otoferlin in den IHZ sowie zu einer Wiederherstellung der ABR-Wellen führt. Infolgedessen wurde im September 2022 die Freigabe des gestellten IND-Antrags (Investigational New Drug) durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) erteilt. Dies ermöglicht die Einleitung einer Phase-1/2 Studie, bei der die Sicherheit und Wirksamkeit von

AK-*OTOF* am Menschen untersucht wird. Für diese Studie werden Patienten eingeschlossen, die eine nachgewiesene biallelische Mutation im Otoferlin-Gen tragen, die zu einer bilateralen hochgradigen Schallempfindungsschwerhörigkeit führt. Da bereits die präklinischen Studien zeigen konnten, dass eine rechtzeitige Intervention ausschlaggebend für das Hörergebnis ist, werden nur Patienten unter 18 Jahren in die Studie eingeschlossen. Anfang des Jahres 2024 berichtete die „New York Times“ über einen elfjährigen Patienten in Philadelphia, dessen Hörvermögen durch die Otoferlin-Transduktion wiederhergestellt wurde (Kolata, 2024).

Ebenfalls verzeichnete eine klinische Studie Anfang des Jahres 2024 Erfolge hinsichtlich der klinischen Umsetzung der AAV-vermittelten Gentherapie am Menschen (Qi et al., 2024). Die vorliegende Studie behandelte die AAV-Injektion bei zwei Kindern im Alter von fünf und acht Jahren, bei denen jeweils eine heterozygote *OTOF*-Mutation identifiziert werden konnte (Qi et al., 2024). Nach der AAV-vermittelten Gentherapie wurde bei beiden Kindern eine signifikante Hörverbesserung beobachtet (Qi et al., 2024). Dies konnte durch ABR-Messungen und Reintonaudiogrammen verifiziert werden (Qi et al., 2024). Auch eine weitere klinischen Studie aus 2024 berichtete über die Sicherheit und Wirksamkeit einer AAV-vermittelten Genapplikation bei Patienten mit DFNB9 (Lv et al., 2024). Zu diesem Zweck wurde bei sechs Kindern mit DFNB9 eine einmalige Injektion von AAV-*OTOF* durch das runde Fenster in die Cochlea verabreicht (Lv et al., 2024). Anschließend wurden die Kinder über einen Zeitraum von 26 Wochen beobachtet (Lv et al., 2024). Es konnten keine dosislimitierende Toxizität oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse festgestellt werden (Lv et al., 2024). Zudem konnte bei fünf von sechs Kindern eine Wiederherstellung des Hörvermögens 4-6 Wochen nach der Injektion beobachtet werden (Lv et al., 2024). Dies zeigte sich in einer Verringerung der durchschnittlichen Schwellenwerte der ABR-Messungen um 40-57dB bei 0,5-4,0kHz sowie in einer verbesserten Sprachwahrnehmung (Lv et al., 2024). Vier der sechs Kinder besaßen bereits vor der Virustransduktion ein einseitiges Cochlea-Implantat und wurden während des Beobachtungszeitraumes mit

ausgeschaltetem Cochlea-Implantat getestet (Lv et al., 2024). Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass drei Kinder, bei denen das Cochlea-Implantat deaktiviert war, eine kontinuierliche Verbesserung ihres Hörvermögens aufwiesen, insbesondere in Bezug auf die Spracherkennung in geräuschvollen Umgebungen (Lv et al., 2024). Das Hörvermögen der beiden Kinder ohne Cochlea-Implantat verbesserte sich nach der Injektion unterschiedlich stark, was auf Unterschiede in den individuellen Fähigkeiten der Teilnehmer oder auf eine unterschiedliche Sprachrehabilitationsausbildung zurückgeführt wurde (Lv et al., 2024). Da bei einem Studienteilnehmer keine Verbesserung der Hörfunktion beobachtet werden konnte, besteht nach wie vor die Forderung nach weiteren klinischen Studien (Lv et al., 2024). Idealerweise sollten diese mit größeren Stichprobengrößen und noch längeren Nachbeobachtungszeiten durchgeführt werden, um die Wirksamkeit der Gentherapie, auch im Vergleich zu Cochlea-Implantaten zu untersuchen (Lv et al., 2024).

Nichtsdestotrotz demonstrieren diese Ergebnisse die unmittelbaren Erfolge und Möglichkeiten der Otoferlin-Transduktion am menschlichen Innenohr, die potenziell auch auf andere Gendefekte im Innenohr übertragen werden könnten. Die Frage, ob sich der gentherapeutische Ansatz bei Patienten mit DFNB9 gegenüber der derzeitigen Therapieoption des Cochlea-Implantats durchsetzen wird, muss vorerst unbeantwortet bleiben und bedarf weiterer klinischer Studien, die sich auch auf die Langzeiteffekte der Gentherapie konzentrieren müssen. Des Weiteren werden klinische Langzeituntersuchungen ergeben, ob bislang unbekannte Nebenwirkungen auftreten, die sich von den bisherigen präklinischen Untersuchungen am Mausmodell unterscheiden. Langfristiges Ziel der AAV-vermittelten Gentherapie bei DFNB9-Patienten bleibt weiterhin, das Gehör vollständig zu rehabilitieren und eine Normakusis zu erreichen.

5. Zusammenfassung

Das Multi-C2-Domänen-Protein Otoferlin spielt eine essentielle Rolle beim Hörprozess und der synaptischen Übertragung in den Inneren Haarsinneszellen (Roux et al., 2006). Eine Mutation innerhalb des *OTOF*-Gens, welches für Otoferlin codiert, führt beim Menschen zur nicht-syndromalen rezessiven Schwerhörigkeit DFNB9 (Yasunaga et al., 1999). Der Schweregrad der Schwerhörigkeit variiert in Abhängigkeit von der vorliegenden pathologischen *OTOF*-Variante und reicht von mäßigem Hörverlust bis hin zu hochgradiger Taubheit (Vona et al., 2020). Gegenwärtig besteht die therapeutische Intervention bei den ausgeprägten Krankheitsbildern von DFNB9 in der Insertion eines Cochlea-Implantates (Zheng und Liu, 2020). Ein alternativer Therapieansatz, bei dem ein Gentransfer zum Einsatz kommt, um Patienten mit DFNB9 zu behandeln, könnte zu einer neuen Behandlungsmethode werden. Präklinische Studien, die an Mausmodellen durchgeführt wurden, konnten bereits zeigen, dass sich der Hörsinn mithilfe eines AAV-Gentransfers rehabilitieren lässt (Al-Moyed et al., 2019, Akil et al., 2019). Ebenfalls verzeichneten bereits mehrere Studien Erfolge hinsichtlich der klinischen Umsetzung der AAV-vermittelten Gentherapie am Menschen (Lv et al., 2024, Qi et al., 2024).

Da bislang der Fokus auf die unmittelbaren Erfolge eines gentherapeutischen Ansatzes bei DFNB9 gelegt worden ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die langfristigen Effekte eines gentherapeutischen Ansatzes zur Rehabilitation der Hörfunktion auf zellulärer Ebene an einem Mausmodell untersucht. Als Mausmodell wurden Otoferlin-Knock-out-Mäuse eingesetzt, die aufgrund der fehlenden Otoferlin-Expression hochgradig taub sind und eine gestörte synaptische Übertragung an den IHZ aufweisen. Der Gentransfer wurde postnatal mittels rekombinanter adeno-assoziierter Viren (AAV) vom Serotyp 2 mit Capsid-Proteinen des Serotyps Anc80L65 (AAV2/Anc80) durchgeführt. Die Untersuchung der Haarsinneszellen unter Anwendung immunhistochemischer Färbungen erfolgte in einem Alter von 9-10 Monaten. Insgesamt wurden 145 Cochleapräparate imunhistochemisch gefärbt und analysiert. Die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit legen nahe, dass nach einmalig postnatal durchgeführter Virustransduktion mit einer langfristigen Otoferlin-Persistenz in den IHZ zu rechnen ist. Zudem scheint das Vorhandensein von Otoferlin in den IHZ einen Beitrag zum Erhalt der synaptischen Verbindungen zwischen IHZ und SGN zu leisten. Die Anwesenheit von Otoferlin scheint auch langfristig den Erhalt der Äußeren und Inneren Haarsinneszellen zu sichern. Degenerative Auswirkungen auf die Haarsinneszellen und die Synapsen konnten nicht festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die untersuchten langfristigen Auswirkungen bei AAV-transduzierten Otoferlin-Knock-Out-Mäusen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der angestrebten Therapieoption einer AAV-vermittelten Gentherapie bei DFNB9-Patienten liefern. Es sei jedoch angemerkt, dass weitere umfassende präklinische und klinische Studien erforderlich sind, um die AAV-vermittelte Gentherapie bei DFNB9-Patienten zu optimieren und zu etablieren.

6. Literaturverzeichnis

Adamson, C. L., Reid, M. A., Mo, Z.-L., Bowne-English, J. & Davis, R. L. 2002. Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. Journal of Comparative Neurology, 447**,** 331-350.

Adunka, O. & Kiefer, J. 2005. [How does a cochlear implant speech processor work?]. Laryngorhinootologie, 84**,** 841-50; quiz 851-4.

Akil, O., Dyka, F., Calvet, C., Emptoz, A., Lahlou, G., Nouaille, S., Boutet de Monvel, J., Hardelin, J. P., Hauswirth, W. W., Avan, P., Petit, C., Safieddine, S. & Lustig, L. R. 2019. Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A, 116**,** 4496-4501.

Al-Moyed, H. 2019. Dual-AAV mediated transfer of full-length otoferlin cDNA into auditory inner hair cells and the effects of different mutations in the OTOF gene on the protein levels and cellular distribution of otoferlin in auditory inner hair cells, Göttingen.

Al-Moyed, H., Cepeda, A. P., Jung, S., Moser, T., Kügler, S. & Reisinger, E. 2019. A dual-AAV approach restores fast exocytosis and partially rescues auditory function in deaf otoferlin knock-out mice. EMBO Molecular Medicine, 11**,** e9396.

Aponte-Ubillus, J. J., Barajas, D., Peltier, J., Bardliving, C., Shamlou, P. & Gold, D. 2018. Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. Applied Microbiology and Biotechnology, 102**,** 1045-1054.

Au, H. K. E., Isalan, M. & Mielcarek, M. 2022. Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. Frontiers in Medicine, 8.

Azaiez, H., Booth, K. T., Ephraim, S. S., Crone, B., Black-Ziegelbein, E. A., Marini, R. J., Shearer, A. E., Sloan-Heggen, C. M., Kolbe, D., Casavant, T., Schnieders, M. J., Nishimura, C., Braun, T. & Smith, R. J. H. 2018. Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes. Am J Hum Genet, 103**,** 484-497.

Brandt, A., Striessnig, J. & Moser, T. 2003. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. J Neurosci, 23**,** 10832-40.

Bruns, L., Mürbe, D. & Hahne, A. 2016. Understanding music with cochlear implants. Sci Rep, 6**,** 32026.

Buchner, H. 2005. Evozierte Potenziale, neurovegetative Diagnostik, Okulographie: Methodik und klinische Anwendungen, Georg Thieme Verlag.

Chaïb, H., Place, C., Salem, N., Chardenoux, S., Vincent, C., Weissenbach, J., El-Zir, E., Loiselet, J. & Petit, C. 1996. A Gene Responsible for a Sensorineural Nonsyndromic Recessive Deafness Maps to Chromosome 2p22–23. Human Molecular Genetics, 5**,** 155-158.

Chakrabarti, R., Michanski, S. & Wichmann, C. 2018. Vesicle sub-pool organization at inner hair cell ribbon synapses. EMBO Rep, 19.

Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T. 2016. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. Hum Gene Ther Methods, 27**,** 1-12.

Chen, K., Liu, M., Wu, X., Zong, L. & Jiang, H. 2018. Targeted next generation sequencing reveals OTOF mutations in auditory neuropathy spectrum disorder. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 115**,** 19-23.

Chien, W. W., McDougald, D. S., Roy, S., Fitzgerald, T. S. & Cunningham, L. L. 2015. Cochlear gene transfer mediated by adeno-associated virus: Comparison of two surgical approaches. Laryngoscope, 125**,** 2557-64.

Christensen, K., Frederiksen, H. & Hoffman, H. J. 2001. Genetic and Environmental Influences on Self-Reported Reduced Hearing in the Old and Oldest Old. Journal of the American Geriatrics Society, 49**,** 1512-1517.

Dallos, P. 1992. The active cochlea. The Journal of Neuroscience, 12**,** 4575-4585.

Davis, H. 1953. Energy into nerve impulses: the inner ear. Adv. Sci, 9**,** 420-425.

Davis, R. L. & Crozier, R. A. 2015. Dynamic firing properties of type I spiral ganglion neurons. Cell and Tissue Research, 361**,** 115-127.

Denker, A. & Rizzoli, S. O. 2010. Synaptic vesicle pools: an update. Front Synaptic Neurosci, 2**,** 135.

Dettman, S. J., Dowell, R. C., Choo, D., Arnott, W., Abrahams, Y., Davis, A., Dornan, D., Leigh, J., Constantinescu, G., Cowan, R. & Briggs, R. J. 2016. Long-term Communication Outcomes for Children Receiving Cochlear Implants Younger Than 12 Months: A Multicenter Study. Otology & Neurotology, 37**,** e82-e95.

Dominguez, M. J., McCord, J. J. & Sutton, R. B. 2022. Redefining the architecture of ferlin proteins: Insights into multi-domain protein structure and function. PLoS One, 17**,** e0270188.

Dong, B., Nakai, H. & Xiao, W. 2010. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. Mol Ther, 18**,** 87-92.

Dorman, M. F. & Gifford, R. H. 2017. Speech Understanding in Complex Listening Environments by Listeners Fit With Cochlear Implants. J Speech Lang Hear Res, 60**,** 3019-3026.

Duan, D., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. 2001. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. Mol Ther, 4**,** 383-91.

Duman, D., Sirmaci, A., Cengiz, F. B., Ozdag, H. & Tekin, M. 2011. Screening of 38 Genes Identifies Mutations in 62% of Families with Nonsyndromic Deafness in Turkey. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 15**,** 29-33.

Eckhard, A., Gleiser, C., Arnold, H., Rask-Andersen, H., Kumagami, H., Müller, M., Hirt, B. & Löwenheim, H. 2012. Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. Molecular Aspects of Medicine, 33**,** 612-637.

Fettiplace, R. 2017. Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. Compr Physiol, 7**,** 1197-1227.

Fuchs, P. A. & Lauer, A. M. 2019. Efferent Inhibition of the Cochlea. Cold Spring Harb Perspect Med, 9.

Glowatzki, E. & Fuchs, P. A. 2002. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. Nature Neuroscience, 5**,** 147-154.

Gorga, M. P., Neely, S. T., Ohlrich, B., Hoover, B., Redner, J. & Peters, J. 1997. From laboratory to clinic: a large scale study of distortion product otoacoustic emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. Ear Hear, 18**,** 440-55.

Grillet, N., Xiong, W., Reynolds, A., Kazmierczak, P., Sato, T., Lillo, C., Dumont, R. A., Hintermann, E., Sczaniecka, A., Schwander, M., Williams, D., Kachar, B., Gillespie, P. G. & Müller, U. 2009. Harmonin mutations cause mechanotransduction defects in cochlear hair cells. Neuron, 62**,** 375-87.

Hallek, M., Buening, H., Ried, M., Hacker, U., Kurzeder, C. & Wendtner, C. M. 2001. Grundlagen der Gentherapie. Der Gynäkologe, 34**,** 1182-1188.

Hermonat, P. L. & Muzyczka, N. 1984. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 81**,** 6466-70.

Jean, P., Lopez de la Morena, D., Michanski, S., Jaime Tobón, L. M., Chakrabarti, R., Picher, M. M., Neef, J., Jung, S., Gültas, M., Maxeiner, S., Neef, A., Wichmann, C., Strenzke, N., Grabner, C. & Moser, T. 2018. The synaptic

ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision. Elife, 7.

Jewett, D. L. & Williston, J. S. 1971. Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. Brain, 94**,** 681-96.

Jing, Z., Rutherford, M. A., Takago, H., Frank, T., Fejtova, A., Khimich, D., Moser, T. & Strenzke, N. 2013. Disruption of the presynaptic cytomatrix protein bassoon degrades ribbon anchorage, multiquantal release, and sound encoding at the hair cell afferent synapse. J Neurosci, 33**,** 4456-67.

Johnson, C. P. & Chapman, E. R. 2010. Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. J Cell Biol, 191**,** 187-97.

Johnson, K. R., Zheng, Q. Y. & Noben-Trauth, K. 2006. Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice. Brain Research, 1091**,** 79-88.

Jung, S., Maritzen, T., Wichmann, C., Jing, Z., Neef, A., Revelo, N. H., Al-Moyed, H., Meese, S., Wojcik, S. M., Panou, I., Bulut, H., Schu, P., Ficner, R., Reisinger, E., Rizzoli, S. O., Neef, J., Strenzke, N., Haucke, V. & Moser, T. 2015. Disruption of adaptor protein 2μ (AP-2μ) in cochlear hair cells impairs vesicle reloading of synaptic release sites and hearing. Embo j, 34**,** 2686-702.

Karltorp, E., Eklöf, M., Östlund, E., Asp, F., Tideholm, B. & Löfkvist, U. 2020. Cochlear implants before 9 months of age led to more natural spoken language development without increased surgical risks. Acta Paediatrica, 109**,** 332-341.

Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E. M., Milligan, R. A., Müller, U. & Kachar, B. 2007. Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. Nature, 449**,** 87-91.

Kemp, D. T. 1978. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. J Acoust Soc Am, 64**,** 1386-91.

Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E. D. & Moser, T. 2005. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. Nature, 434**,** 889-894.

Kikkawa, Y. & Miyasaka, Y. 2016. Genetic Modifiers of Hearing Loss in Mice: The Case of Phenotypic Modification in Homozygous Cdh23ahl Age-Related Hearing Loss. In: Vona, B. & Haaf, T. (eds.) Genetics of Deafness. S.Karger AG.

Kitao, K., Mutai, H., Namba, K., Morimoto, N., Nakano, A., Arimoto, Y., Sugiuchi, T., Masuda, S., Okamoto, Y., Morita, N., Sakamoto, H., Shintani, T., Fukuda, S., Kaga, K. & Matsunaga, T. 2019. Deterioration in Distortion Product Otoacoustic Emissions in Auditory Neuropathy Patients With Distinct Clinical and Genetic Backgrounds. Ear and Hearing, 40**,** 184-191.

Kolata, G. 2024. Gene Therapy Allows an 11-Year-Old Boy to Hear for the First Time. The New York Times, 01/23/2024.

Lauter, J. L., Herscovitch, P., Formby, C. & Raichle, M. E. 1985. Tonotopic organization in human auditory cortex revealed by positron emission tomography. Hearing Research, 20**,** 199-205.

Lee, M. Y. & Park, Y. H. 2018. Potential of Gene and Cell Therapy for Inner Ear Hair Cells. Biomed Res Int, 2018**,** 8137614.

Liberman, M. C. 1978. Auditory-nerve response from cats raised in a low-noise chamber. J Acoust Soc Am, 63**,** 442-55.

Liberman, M. C. 1982. Single-Neuron Labeling in the Cat Auditory Nerve. Science, 216**,** 1239-1241.

Liberman, M. C. 2017. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. F1000Res, 6**,** 927.

Liberman, M. C. & Oliver, M. E. 1984. Morphometry of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: correlations with functional properties. J Comp Neurol, 223**,** 163-76.

Lim, D. J. 1986. Functional structure of the organ of Corti: a review. Hearing Research, 22**,** 117-146.

Liu, Q. & Davis, R. 2007. Regional Specification of Threshold Sensitivity and Response Time in CBA/CaJ Mouse Spiral Ganglion Neurons. Journal of neurophysiology, 98**,** 2215-22.

Liu, W., Liu, Q., Crozier, R. A. & Davis, R. L. 2021. Analog transmission of action potential fine structure in spiral ganglion axons. J Neurophysiol, 126**,** 888-905.

Lostal, W., Kodippili, K., Yue, Y. & Duan, D. 2014. Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors. Hum Gene Ther, 25**,** 552-62.

Lv, J., Wang, H., Cheng, X., Chen, Y., Wang, D., Zhang, L., Cao, Q., Tang, H., Hu, S., Gao, K., Xun, M., Wang, J., Wang, Z., Zhu, B., Cui, C., Gao, Z., Guo, L., Yu, S., Jiang, L., Yin, Y., Zhang, J., Chen, B., Wang, W., Chai, R., Chen, Z.-Y., Li, H. & Shu, Y. 2024. AAV1-hOTOF gene therapy for autosomal recessive deafness 9: a single-arm trial. The Lancet, 403**,** 2317-2325.

McClements, M. E. & MacLaren, R. E. 2017. Adeno-associated Virus (AAV) Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes. Yale J Biol Med, 90**,** 611-623.

McConkey Robbins, A., Koch, D. B., Osberger, M. J., Zimmerman-Phillips, S. & Kishon-Rabin, L. 2004. Effect of Age at Cochlear Implantation on Auditory Skill Development in Infants and Toddlers. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery, 130**,** 570-574.

Merchant, S. N., Adams, J. C. & Nadol, J. B., Jr. 2005. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? Otol Neurotol, 26**,** 74-81.

Meyer, A. C., Frank, T., Khimich, D., Hoch, G., Riedel, D., Chapochnikov, N. M., Yarin, Y. M., Harke, B., Hell, S. W., Egner, A. & Moser, T. 2009. Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. Nat Neurosci, 12**,** 444-53.

Meyer, A. C. & Moser, T. 2010. Structure and function of cochlear afferent innervation. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 18**,** 441-6.

Michalski, N., Goutman, J. D., Auclair, S. M., Boutet de Monvel, J., Tertrais, M., Emptoz, A., Parrin, A., Nouaille, S., Guillon, M., Sachse, M., Ciric, D., Bahloul, A., Hardelin, J. P., Sutton, R. B., Avan, P., Krishnakumar, S. S., Rothman, J. E., Dulon, D., Safieddine, S. & Petit, C. 2017. Otoferlin acts as a Ca(2+) sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. Elife, 6.

Morton, C. C. & Nance, W. E. 2006. Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. New England Journal of Medicine, 354**,** 2151-2164.

Moser, T. & Starr, A. 2016. Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms. Nat Rev Neurol, 12**,** 135-49.

Mühler, R. Z., M. 2010. Technischer Leitfaden Cochlea Implantat [Online]. Available: https://www.med.uni-magdeburg.de/unimagdeburg_mm/Bilder/Kliniken/KHNO/cochlear+implant/technik_leitfaden+cochlear+implant-p-8859.pdf [Accessed 02/20/2025].

Niwa, M., Young, E. D., Glowatzki, E. & Ricci, A. J. 2021. Functional subgroups of cochlear inner hair cell ribbon synapses differently modulate their EPSC properties in response to stimulation. J Neurophysiol, 125**,** 2461-2479.

Oliver, D., He, D. Z., Klöcker, N., Ludwig, J., Schulte, U., Waldegger, S., Ruppersberg, J. P., Dallos, P. & Fakler, B. 2001. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. Science, 292**,** 2340-3.

Pangršič, T., Lasarow, L., Reuter, K., Takago, H., Schwander, M., Riedel, D., Frank, T., Tarantino, L. M., Bailey, J. S., Strenzke, N., Brose, N., Müller, U., Reisinger, E. & Moser, T. 2010. Hearing requires otoferlin-dependent

efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. Nature Neuroscience, 13**,** 869-876.

Pangršič, T., Reisinger, E. & Moser, T. 2012. Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. Trends in Neurosciences, 35**,** 671-680.

Parsons, T. D. 2006. Auditory fidelity. Nature, 444**,** 1013-1014.

Qi, J., Tan, F., Zhang, L., Lu, L., Zhang, S., Zhai, Y., Lu, Y., Qian, X., Dong, W., Zhou, Y., Zhang, Z., Yang, X., Jiang, L., Yu, C., Liu, J., Chen, T., Wu, L., Tan, C., Sun, S., Song, H., Shu, Y., Xu, L., Gao, X., Li, H. & Chai, R. 2024. AAV-Mediated Gene Therapy Restores Hearing in Patients with DFNB9 Deafness. Adv Sci (Weinh), 11**,** e2306788.

Raphael, Y. & Altschuler, R. A. 2003. Structure and innervation of the cochlea. Brain Research Bulletin, 60**,** 397-422.

Reisinger, E. 2020. Dual-AAV delivery of large gene sequences to the inner ear. Hear Res, 394**,** 107857.

Reisinger, E., Bresee, C., Neef, J., Nair, R., Reuter, K., Bulankina, A., Nouvian, R., Koch, M., Bückers, J., Kastrup, L., Roux, I., Petit, C., Hell, S. W., Brose, N., Rhee, J. S., Kügler, S., Brigande, J. V. & Moser, T. 2011. Probing the functional equivalence of otoferlin and synaptotagmin 1 in exocytosis. J Neurosci, 31**,** 4886-95.

Revelo, N. H., Kamin, D., Truckenbrodt, S., Wong, A. B., Reuter-Jessen, K., Reisinger, E., Moser, T. & Rizzoli, S. O. 2014. A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways. J Cell Biol, 205**,** 591-606.

Rizzoli, S. O. & Betz, W. J. 2005. Synaptic vesicle pools. Nature Reviews Neuroscience, 6**,** 57-69.

Rodríguez-Ballesteros, M., Reynoso, R., Olarte, M., Villamar, M., Morera, C., Santarelli, R., Arslan, E., Medá, C., Curet, C., Völter, C., Sainz-Quevedo, M., Castorina, P., Ambrosetti, U., Berrettini, S., Frei, K., Tedín, S., Smith, J., Cruz Tapia, M., Cavallé, L., Gelvez, N., Primignani, P., Gómez-Rosas, E., Martín, M., Moreno-Pelayo, M. A., Tamayo, M., Moreno-Barral, J., Moreno, F. & del Castillo, I. 2008. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. Human Mutation, 29**,** 823-831.

Rouillon, I., Marcolla, A., Roux, I., Marlin, S., Feldmann, D., Couderc, R., Jonard, L., Petit, C., Denoyelle, F., Garabédian, E. N. & Loundon, N. 2006. Results of cochlear implantation in two children with mutations in the OTOF gene. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 70**,** 689-696.

Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M. C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., Triller, A., Avan, P., Moser, T. & Petit, C. 2006. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. Cell, 127**,** 277-89.

Rutherford, M. A. & Pangršič, T. 2012. Molecular anatomy and physiology of exocytosis in sensory hair cells. Cell Calcium, 52**,** 327-37.

Sakaguchi, H., Tokita, J., Müller, U. & Kachar, B. 2009. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 17**,** 388-93.

Schuknecht, H. F. 1967. The effect of aging on the cochlea. Little, Brown Boston, Mass.

Sharma, A., Dorman, M. F. & Kral, A. 2005. The influence of a sensitive period on central auditory development in children with unilateral and bilateral cochlear implants. Hearing Research, 203**,** 134-143.

Shearer, A. E. & Hansen, M. R. 2019. Auditory synaptopathy, auditory neuropathy, and cochlear implantation. Laryngoscope Investig Otolaryngol, 4**,** 429-440.

Sininger, Y. S., Doyle, K. J. & Moore, J. K. 1999. THE CASE FOR EARLY IDENTIFICATION OF HEARING LOSS IN CHILDREN: Auditory System Development, Experimental Auditory Deprivation, and Development of Speech Perception and Hearing. Pediatric Clinics of North America, 46**,** 1-14.

Spoendlin, H. 1972. Innervation Densities of the Cochlea. Acta Oto-Laryngologica, 73**,** 235-248.

Spoendlin, H. 1985. Anatomy of Cochlear Innervation. American Journal of Otolaryngology, 6**,** 453-467.

Spongr, V. P., Flood, D. G., Frisina, R. D. & Salvi, R. J. 1997. Quantitative measures of hair cell loss in CBA and C57BL/6 mice throughout their life spans. The Journal of the Acoustical Society of America, 101**,** 3546-3553.

Stalmann, U. 2015. Altersabhängige Degeneration und Lärmempfindlichkeit des Corti-Organs bei tauben (Otof)-Knockout-Mäusen.

Stalmann, U., Franke, A., Al-Moyed, H., Strenzke, N. & Reisinger, E. 2021. Otoferlin Is Required for Proper Synapse Maturation and for Maintenance of Inner and Outer Hair Cells in Mouse Models for DFNB9. Frontiers in Cellular Neuroscience, 15.

Starr, A., Picton, T. W., Sininger, Y., Hood, L. J. & Berlin, C. I. 1996. Auditory neuropathy. Brain, 119**,** 741-753.

Strenzke, N., Chakrabarti, R., Al-Moyed, H., Müller, A., Hoch, G., Pangrsic, T., Yamanbaeva, G., Lenz, C., Pan, K.-T., Auge, E., Geiss-Friedlander, R., Urlaub, H., Brose, N., Wichmann, C. & Reisinger, E. 2016. Hair cell synaptic dysfunction, auditory fatigue and thermal sensitivity in otoferlin Ile515Thr mutants. The EMBO Journal, 35**,** 2519-2535.

Talaei, S., Schnee, M. E., Aaron, K. A. & Ricci, A. J. 2019. Dye Tracking Following Posterior Semicircular Canal or Round Window Membrane Injections Suggests a Role for the Cochlea Aqueduct in Modulating Distribution. Front Cell Neurosci, 13**,** 471.

v. Békésy, G. 1951. DC potentials and energy balance of the cochlear partition. The Journal of the Acoustical Society of America, 23**,** 576-582.

v. Békésy, G. 1960. Experiments in hearing. McGraw-Hill New York.

Varga, R., Avenarius, M. R., Kelley, P. M., Keats, B. J., Berlin, C. I., Hood, L. J., Morlet, T. G., Brashears, S. M., Starr, A., Cohn, E. S., Smith, R. J. & Kimberling, W. J. 2006. OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. J Med Genet, 43**,** 576-81.

Varga, R., Kelley, P. M., Keats, B. J., Starr, A., Leal, S. M., Cohn, E. & Kimberling, W. J. 2003. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. J Med Genet, 40**,** 45-50.

Vincenti, V., Bacciu, A., Guida, M., Marra, F., Bertoldi, B., Bacciu, S. & Pasanisi, E. 2014. Pediatric cochlear implantation: an update. Italian Journal of Pediatrics, 40**,** 72.

Vogl, C., Cooper, B. H., Neef, J., Wojcik, S. M., Reim, K., Reisinger, E., Brose, N., Rhee, J.-S., Moser, T. & Wichmann, C. 2015. Unconventional molecular regulation of synaptic vesicle replenishment in cochlear inner hair cells. Journal of Cell Science, 128**,** 638-644.

Vona, B., Rad, A. & Reisinger, E. 2020. The Many Faces of DFNB9: Relating OTOF Variants to Hearing Impairment. Genes, 11**,** 1411.

Wagner, L., Altindal, R., Plontke, S. K. & Rahne, T. 2021. Pure tone discrimination with cochlear implants and filter-band spread. Sci Rep, 11**,** 20236.

Walls WD, A. H., Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage [Online]. Available: https://hereditaryhearingloss.org [Accessed 04/23/2024].

Wangemann, P. 2002. K+ cycling and the endocochlear potential. Hear Res, 165**,** 1-9.

Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D. & Engelhardt, J. F. 2000. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, 97**,** 6716-21.

Yasuda, S. P., Seki, Y., Suzuki, S., Ohshiba, Y., Hou, X., Matsuoka, K., Wada, K., Shitara, H., Miyasaka, Y. & Kikkawa, Y. 2020. c.753A>G genome editing of a Cdh23ahl allele delays age-related hearing loss and degeneration of cochlear hair cells in C57BL/6J mice. Hearing Research, 389**,** 107926.

Yasunaga, S., Grati, M., Chardenoux, S., Smith, T. N., Friedman, T. B., Lalwani, A. K., Wilcox, E. R. & Petit, C. 2000. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. American journal of human genetics, 67**,** 591-600.

Yasunaga, S. i., Grati, M. h., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J. & Petit, C. 1999. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. Nature Genetics, 21**,** 363-369.

Yoshimura, H., Shibata, S. B., Ranum, P. T. & Smith, R. J. H. 2018. Enhanced viral-mediated cochlear gene delivery in adult mice by combining canal fenestration with round window membrane inoculation. Sci Rep, 8**,** 2980.

Zelle, D., Dalhoff, E. & Gummer, A. W. 2016. Objektive Hördiagnostik mit DPOAE. HNO, 64**,** 822-830.

Zheng, D. & Liu, X. 2020. Cochlear Implantation Outcomes in Patients With OTOF Mutations. Front Neurosci, 14**,** 447.

Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D. & Dallos, P. 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. Nature, 405**,** 149-55.

Zurek, P. M. 1981. Spontaneous narrowband acoustic signals emitted by human ears. The Journal of the Acoustical Society of America, 69**,** 514-523.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Ellen Reisinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. rer. nat. Ellen Reisinger.

Die Injektionen des Virus, die audiometrischen Untersuchungen und die Herstellung der Präparate, die in dieser Arbeit ausgewertet wurden, erfolgte durch Hanan al-Moyed im Rahmen ihrer Doktorarbeit von 03/2018 bis 06/2019 an der Georg-August-Universität Göttingen. Die Graphen der ABR-Messungen wurden von Prof. Dr. rer. nat. Ellen Reisinger erstellt und mir zur Diskussion zur Verfügung gestellt.

8 Cochleae von *Otof*-KO-Mäusen, die zusätzlich in meinen Auswertungen mit einbezogen worden sind, habe ich mit Unterstützung von Franziska Becker immunhistochemisch markiert und eingebettet. Nach Einarbeitung durch das gesamte Team der AG Reisinger habe ich eigenständig am Epifluoreszenzmikroskop die Aufnahmen der Cochlea-Präparate aufgenommen. Die Synapsenaufnahmen am Konfokalmikroskop wurden inZusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Ellen Reisinger und André Deutschmann durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, der 03.03.2025