

Universitätsspital Zürich  
ORL-Klinik  
Direktor: Prof. Dr. med. Rudolf Probst

---

Arbeit unter Betreuung Dr. med. A. Monge Naldi und Leitung Prof. Dr. med. R. Probst

# **Altersbedingte Schwerhörigkeit in Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von  
Celina Ida Maria Belfrage  
aus Schweden

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. R. Probst  
Zürich 2014

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>0</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
2.1. Presbyakusis	4
2.2. Erythropoietin	5
2.3. Erythropoietin in der Cochlea	5
2.4. Tiermodell: Erythropoietin-überexprimierende Mäuse	6
2.5. Zielsetzung	7
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>8</b>
3.1. Tiere	8
3.2. Verhaltensaudiometrie	9
3.3. Statistikverfahren	14
<b>4. Resultate .....</b>	<b>15</b>
4.1. Gehör WT vs. TG21 Mäuse im Alter von 5 Monaten	15
4.2. Gehör WT vs. TG21 Mäuse im Alter von 11 Monaten	17
4.3. Gehör WT und TG21 Mäuse im Alter von 5 Monaten vs. 11 Monaten	19
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>22</b>
<b>6. Abbildungsnachweis.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>26</b>
<b>8. Verdankungen .....</b>	<b>33</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>34</b>
<b>10. Curriculum Vitae.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# 1. Zusammenfassung

**Einleitung.** Altersbedingte Schwerhörigkeit, auch Presbyakusis genannt, ist eine der häufigsten sensorineuralen Funktionseinschränkungen. Trotz der Häufigkeit dieses Leidens ist keine ursächliche Therapie vorhanden. Bisherige Studien konnten mehrfach einen neuroprotektiven Effekt von Erythropoietin nachweisen, der sich auch positiv auf das Gehör auszuwirken scheint. Wir haben eine transgene Mauslinie (TG21) untersucht, welche bei normalem Hämatokrit konstitutionell erhöhte Epo-Spiegel im Gehirn aufweist. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war der Effekt einer konstanten Epo-Überexpression auf das alternde Gehör von Mäusen.

**Material und Methoden.** Für die Analyse wurden Daten von Hörschwellen von Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen (TG21) und Kontrollmäusen (Wildtyp, WT) im Alter von 5 Monate vor Eintreten einer erwarteten Gehörverschlechterung und ein halbes Jahr später, mit 11 Monate, mittels operanter Konditionierung nach der Vorlage von Henry E. Heffner et al. (Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice Conditioned Suppression. Current Protocols in Neuroscience. 8.21D.1–8.21D.15) untersucht. Es wurden sieben männliche TG21 Mäuse und sechs männliche WT Mäuse eingesetzt. Die Versuche fanden in einer schallisolierten Box statt, diese war ausgestattet mit einer Lautsprecheranlage für Töne von 1 bis 100 kHz und einem Testkäfig mit einem Wasserspender, in dem die Maus platziert wurde. In einem ersten Schritt wurde die Maus auf die Vertrautheit mit der Versuchsanlage sowie das Trinken aus dem Wasserspender trainiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Konditionierung auf die tonbedingte Trinkunterbrechung. Wurde dies gut beherrscht, konnte mit dem Versuch gestartet werden. Dabei wurde im Versuch die Lautstärke des Tons in 5 dB Schritten verändert. Konnte das Tier den Ton nicht hören, wurde das Trinken nicht unterbrochen und dies als Fehler vermerkt. Die Hörschwelle des Tieres wurde anhand eines Programms ermittelt, welche die Fehler in Bezug zur generellen Leistung des Tieres während dem Versuch auswertete. Die Hörschwellen der Mäuse wurden für die Frequenzen 1,4, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 50, 64 und 80 kHz ermittelt.

**Resultate.** Die Hörschwellen der 5 Monate alten Mäuse waren mit geringfügigen Abweichungen zweier Frequenzen in beiden Gruppen weitgehend gleich. Messungen ein halbes Jahr später zeigten in beiden Gruppen im Durchschnitt schlechtere Hörschwellen. Die absolute Verschlechterung der Hörschwellenwerte der gealterten WT Mäusen betrug dabei bis zu 35dB mehr gegenüber der Hörschwellenverschlechterung der TG21 Mäusen. Es konnte statistisch aufgezeigt werden, dass die WT Mäuse mit deutlich schlechteren Hörschwellen in allen Frequenzen ein signifikant schlechteres Gehör als die TG21 Mäuse zeigten.

**Schlussfolgerung.** Mäuse mit einer konstanten Erythropoietin-Überexpression zeigten einen deutlich milderen Verlauf der altersabhängigen Schwerhörigkeit als Kontrollmäuse. Unsere Untersuchungen legen nahe, dass eine konstante Epo-Überexpression einen positiven Effekt auf das alternde Gehör von Mäusen ausübt. In Anbetracht der bereits publizierten Arbeiten und Resultaten sowie unseren Erkenntnissen, gehen wir von einem positiven Effekt von Erythropoietin auf das Gehör aus und raten zu weiteren Studien.

## 2. Einleitung

### 2.1. Presbyakusis

Altersbedingte Schwerhörigkeit oder auch Presbyakusis ist eine der häufigsten sensorineuralen Funktionseinschränkungen. Betroffene zeigen dabei im Tonaudiogramm einen relevanten Hörverlust von 35dB oder mehr. In den Industrienationen leiden rund 35% der über 65-Jährigen daran. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen und gemäss Schätzungen zufolge, leiden 400 Millionen Menschen weltweit an dieser Einschränkung. Dabei können Störungen sowohl des peripheren wie auch zentralen auditiven Systems vorliegen (Probst et al. 2008, Reiss 2009). In der Regel handelt es sich um eine Kombination von beidem.

Die Presbyakusis weist typischerweise eine Schwerhörigkeit der Hochtonfrequenzen auf, welche mit der Zeit auch eine Progression zu den tieferen Frequenzen zeigt (Parham 1997). Typisch ist auch eine verminderte Sprachdiskrimination, da die Sprachverständlichkeit insbesondere bei Hintergrundgeräuschen stark herabgesetzt ist. Entsprechend ist die Abnahme des Sprachverständnis bei Hintergrundgeräuschen auch oft das erste subjektive Problem worüber erkrankte Personen klagen (Probst et al. 2008, Divenyi et al. 2005).

Altersschwerhörigkeit wirkt sich nachweislich negativ auf viele Aspekte des Lebens aus. So treten zum Beispiel vermehrt Depression, Angst und Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung mit erhöhter Sturzneigung auf (Chisolm et al. 2004). Infolge des erschwerten Sprachverständnisses, leiden Betroffene auch unter zunehmender Isolation, einhergehend mit der Abnahme von sozialen Beziehungen. Die Lebensqualität kann dabei empfindlich gestört werden. Ebenso gibt es Studien welche nahelegen, dass die altersbedingte Schwerhörigkeit die Entstehung einer Altersdemenz begünstigen (Lin et al. 2011, Albers 2012, National Council on Aging 2000). In Anbetracht der zunehmenden Überalterung der Bevölkerung kann davon ausgegangen werden, dass dieses Problem zukünftig vermehrt an Bedeutung gewinnt. Schätzungen zufolge werden im Jahre 2050 weltweit rund 900 Millionen Menschen betroffen sein (Ciorba et al. 2012, Reiss 2009).

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Entwicklung einer Presbyakusis. Nebst Einflüssen von genetischen Faktoren (DeStefano et al. 2003) sind auch metabolische Faktoren bedeutend. Unter anderem konnten negative Effekte von Lärmexposition, Schmerzmitteln, Übergewicht und Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf das Gehör gezeigt werden (Bauer et al. 2009).

Der Presbyakusis liegen histologische Pathologien der Haarzellen, der Stria vascularis und der Spiralganglienzellen sowie der zentralen Hörbahn zugrunde (Schuknecht et al. 1993 und Freigang et al. 2011). Viele Hinweise in Tierversuchen deuten darauf hin, dass die kumulative Wirkung von oxidativem Stress zu Schäden an Makromolekülen, wie der mitochondrialen DNA, und zur Induktion der Apoptose der Cochlea-Zellen führen könnte. Solche Ereignisse führen zum Untergang der Mitochondrien und spielen bei der Progression der Presbyakusis eine wichtige Rolle (Yamasoba et al. 2013).

Da bis heute noch keine ursächliche Therapie vorhanden ist, kann ein Fortschreiten der Schwerhörigkeit nicht verhindert werden. Eine Behandlung der Presbyakusis ist demnach rein symptomatisch. Diese besteht momentan aus dem frühzeitigen Erkennen und dem Einsatz von Hörgeräten und, bei Bedarf, aus einem Hör- und Kommunikationstraining (Reiss

2009). Bei weit fortgeschrittenem Funktionsverlust können Cochlea Implantate in Betracht gezogen werden (Sprinzl et Riechelmann 2010).

Ungeachtet des Nutzens, dass ein Hörgerät seinen Trägern bietet, ist die Akzeptanz dessen nicht immer gegeben. Zahlen aus den USA zeigen, dass nur ein kleiner Bruchteil (ca. 23%) der hörgeschädigten Erwachsenen tatsächlich Hörgeräte nutzen (Kochkin 2001). Diese Zahl hat sich in den letzten Jahrzehnten trotz technischer Weiterentwicklung kaum verändert. Hier zeigt sich, dass die Akzeptanz eines Hörgeräts bei älteren Menschen mit milder bis schwerer bilateraler sensorineuraler Schwerhörigkeit, nebst der physiologischen Beeinträchtigung, vor allem von der Persönlichkeit und der individuellen Reaktion auf die Beeinträchtigung im Alltag abhängt (Cox et al. 2005).

Pharmakologische und präventive Ansätze sind in Erforschung, haben sich aber bis anhin nicht entscheidend durchsetzen können. So sind beispielsweise die Verabreichung von Antioxidantien, eine Modulation der Superoxiddismutase 2 in der Cochlea, oder auch Therapien bezüglich der Haarzellregeneration im Innenohr erprobt worden (Mazurek et al. 2008). Eine Substanz, die in den letzten Jahren dennoch als erfolgsversprechend gilt, ist das Erythropoietin (Epo). Dieses wurde in vorliegender Arbeit genauer untersucht. In diesem Zusammenhang wurde bereits vor mehr als zehn Jahren eine interessante Arbeit publiziert, welche die Gabe von Epo auf das Gehör von Patienten mit chronischem Nierenversagen untersuchte (Markowski et al. 2003). Dabei erhielten Probanden während vier Monaten dreimal wöchentlich während der Dialyse humanes rekombinantes Epo intravenös, primär gegen die vorhandene Anämie. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass sich in der Epo-Gruppe nicht nur der Hämatokrit sondern auch das Hörvermögen signifikant verbessert hatte.

## **2.2. Erythropoietin**

Epo ist ein Glykoproteinormon, das vor allem in den renalen peritubulären Fibroblasten der Niere produziert wird. Epo ist der Hauptregulator der Proliferation und Differenzierung von Erythrozytenvorläuferzellen. Dabei erhöht Epo, ausgelöst durch die Bindung an den Erythropoietin-Rezeptor (Epo-R) durch antiapoptotische Signalkaskaden die Erythrozytenzahl (Jelkmann 2004). Mehrere Studien haben darauf hingewiesen, dass Epo und sein Rezeptor auch in vielen anderen Organen vorkommen, inklusive dem zentralen Nervensystem (Buemi et al. 2003, Marti et al. 1996, Masuda et al. 1994). Der Epo-R wurde im Entorhinalen Cortex, auf Endothelzellen, Neuronen, Astrozyten und weitere Zelltypen gefunden (Anagnostou et al. 1994, Genc et al. 2004, Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005). Ebenso konnte der Epo-R auch im peripheren Nervensystem auf den Myelinscheiden der Nervenwurzeln nachgewiesen werden (Hassan et al. 2004). Die positiven Effekte von Epo im zentralen Nervensystem sind auf dessen antiapoptotische, antioxidative, antiinflammatorische, angiogenetische, neuroprotektive und neurotrophe Wirkung zurückzuführen (Rabie und Marti 2008).

## **2.3. Erythropoietin in der Cochlea**

Studien zeigen, dass Epo und Epo-R auch im Innenohr von Säugetieren vorkommen (Cayé-Thomasen et al. 2005). In vitro Versuche an den Haarzellen des Corti'schen Organs zeigten einen partiell schützenden Effekt von Epo bei ischämisch (Andreeva et al. 2006) und Gentamycin induzierten Schäden (Monge et al. 2006).

Weitere neuere in vitro Untersuchungen zeigten auch, dass Epo, kombiniert mit brain derived neurotrophic factor (BDNF) und activin aus der TGF- $\beta$  Familie, einen potenten Effekt auf das

Überleben von Spiralganglienzellen ausübte (Kaiser et al. 2013). Der Effekt von Epo an Ratten und Meerschweine mit Lärm bedingtem Hörverlust wurde in einer Studie von Fredriksen et al. (2007) getestet. Hier erwies sich Epo jedoch nicht als protektiv. Das Gehör der Epo-behandelten Tiere war sogar schlechter als dasjenige der Kontrolltiere, dies scheint im Widerspruch zu anderen Studien zu stehen.

Eine neuere Studie im Rahmen der hypoxisch, ischämisch induzierten Enzephalopathie (diese verursacht apoptotische Veränderungen in Hirnstammstrukturen, im Corti-Organ, Spiralganglienzellen und Neuronen des Temporallappens) zeigte indes in intraperitoneal mit rhEPO behandelten Ratten reduzierte apoptotische Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Olgun et al. 2013). Dass Epo otoprotektiv in einem DFNB12 Mausmodell mit progressivem Hörverlust wirkt, wurde in der Studie von Han et al. 2013 gezeigt. Dabei wurden CDH23 Mäuse sieben Wochen lang intraperitoneal mit Epo injiziert. In der Epo-behandelten Versuchsgruppe waren sowohl die BERA-Schwellen tiefer und DPOAE-Amplituden signifikant höher als die der unbehandelten Gruppe. Ebenso war der durchschnittliche prozentuale Verlust der äußeren Haarzellen in den mittleren bis basalen Windungen der Cochlea signifikant niedriger bei den behandelten Mäusen als in der Kontrollgruppe.

Die langfristige Wirkung eines konstant erhöhten Erythropoietinspiegels auf das Gehör von Mäusen wurde bis anhin noch nicht untersucht.

#### **2.4. Tiermodell: Erythropoietin-überexprimierende Mäuse**

Für die eigene Untersuchung wurden transgene (TG) Mäuse gewählt, die aufgrund der genetischen Veränderung eine konstante Epo-Überexpression zeigen. Es existieren zwei Mauslinien mit einer Epo-Überexpression: TG6 und TG21. Diese Tiere gehören zum C57BL6 Stamm. Mit den oben beschriebenen transgenen Mäusen sind bereits Studien durchgeführt worden. Eine der ersten Arbeiten entstand, um die Auswirkungen von Stickstoffmonoxid (NO) zur Verhinderung von Gefäßerkrankungen in vivo zu untersuchen. Dazu wurde eine transgene Mauslinie (TG6) kreiert, welche konstitutiv humanes Erythropoietin in einer sauerstoffunabhängigen Weise überexprimiert (Ruschitzka 2000).

Bei diesen Mäusen führen die konstitutive Erythropoietin-Überexpression und die damit verbundene Erhöhung des Hämatokrits jedoch auch zu einer vermehrten Vasokonstriktion. Des Weiteren kommt es durch einen erhöhten NO-Verbrauch mit anschließender Erschöpfung des NO-Gehalts sowie durch die Endothelin-Aktivierung zu einer kardialen Dysfunktion (Ruschitzka et al. 2000, Quaschnig et al. 2003).

Die konstitutive Epo-Überexpression führt zu einer Verdoppelung des Hämatokrits von 40% auf ungefähr 80% (Ruschitzka et al. 2000, Vogel et al. 2003). Die problematische Hämodynamik bei den TG6 Mäusen war der Hauptgrund für die Wahl von TG21 Mäusen für die eigene Arbeit.

Die TG21 Mäuse zeigen nur erhöhte Epo-Spiegel im Gehirn (4-facher Wert im Vergleich zu wildtyp Mäusen). Der Epo-Plasmaspiegel und auch der Hämatokrit liegen in einem normalen Bereich (Wiessner et al. 2001).

## **2.5. Zielsetzung**

Die langfristige Wirkung eines erhöhten Erythropoietinspiegels auf das Gehör von Mäusen wurde bis anhin noch nicht untersucht. Daher lautet die Fragestellung der eigenen Arbeit, ob bei Mäusen mit einer konstanten Epo-Überexpression das alternde Gehör von Mäusen verändert ist, und falls ja, wie. Diese Dissertation versteht sich als eine weiterführende Arbeit, welche auf die Masterarbeit *Wirkung von Erythropoietin auf das Gehör von adulten transgenen Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen* aufbaut. Die Masterarbeit befasste sich dabei mit der Etablierung der Verhaltensaudiometrie bei Mäusen am Tierspital Irchel unter der Leitung von Prof. Johannes Vogel.

### 3. Material und Methoden

Mäuse haben ein etwas anderes Hörspektrum als Menschen. So nehmen Mäuse keine tiefen Töne wahr. Ihr Gehör ist am empfindlichsten für Töne zwischen ca. 4-60 kHz, wobei Mäuse auch Töne bis 100 kHz hören können (z.B. Manley et al. 2008).

Die Hörschwellenbestimmung kann bei den Mäusen auf verschiedene Arten erfolgen. In der Literatur lassen sich dazu mehrere Methoden finden. Unter anderem kann die Hörschwellenbestimmung indirekt durch eine Verhaltensaudiometrie (zusammenfassend Heffner et al. 2006) oder direkt durch eine Hirnstammaudiometrie (BERA) (Zheng et al. 1999) oder durch akustische Schreckreaktionen gemessen werden (Ison und Allen 2003). Bei der Verhaltensaudiometrie werden die Daten durch operante Konditionierung gewonnen, wobei dies einiges aufwändiger ist als die Bestimmung der Hörschwelle mittels Hirnstammaudiometrie. Da die Hirnstammaudiometrie jedoch nur eine ungefähre Schätzung der Hörschwelle liefert, empfiehlt es sich, die Messwerte mit Daten aus der Verhaltensaudiometrie zu plausibilisieren. Je nach Mausstamm und Verfahren sind dabei unterschiedliche Angaben vorhanden (Radziwon et al. 2009).

Mehrere Arbeiten haben sich bereits mit der altersbedingten Hörschwäche von C57BL6 Mäusen befasst. Dabei hat sich dieser Mausstamm als gutes Modell für die Erforschung anatomischer und physiologischer Korrelate der Presbyakusis erwiesen. Die Mäuse zeigen im Alter von etwa 12 Monaten einen Verlust an Haarzellen, eine Abnahme der Dichte der Stria vascularis, eine Reduktion der Spiralganglienzellen sowie erhöhte Hörschwellen (Zheng et al. 1999, Ichimiya et al. 2000). Ferner wurden mittels BERA Messung in der Arbeit von Yu et al. 2011 die Hörschwellen für C57BL6 Mäuse in verschiedenem Alter ermittelt.

Für die eigene Analyse wurde eine transgene Epo-überexprimierende Mauslinie (TG21) gewählt, in welcher das Erythropoietin nur im Gehirn überexprimiert ist, und mit Kontrollmäusen verglichen. Die Kontrollmäuse (männliche wildtyp Mäuse) werden in Laboratorien mit standardisierter Haltung und Nahrung im Schnitt etwa 2 Jahre alt, wobei hier eine grosse Spannweite vorliegt (Keipert et al. 2011, List et al. 2013). Zu der von uns verwendeten Verhaltensaudiometrie existieren wenige vorpublizierte Daten. Die meisten beschränken sich auf die Publikationen von Prof. Henry Heffner, auf welchem die von uns gewählte Methode auch beruht (Heffner et al. 2006, Heffner H, Heffner R 2007, Koay et al. 2002).

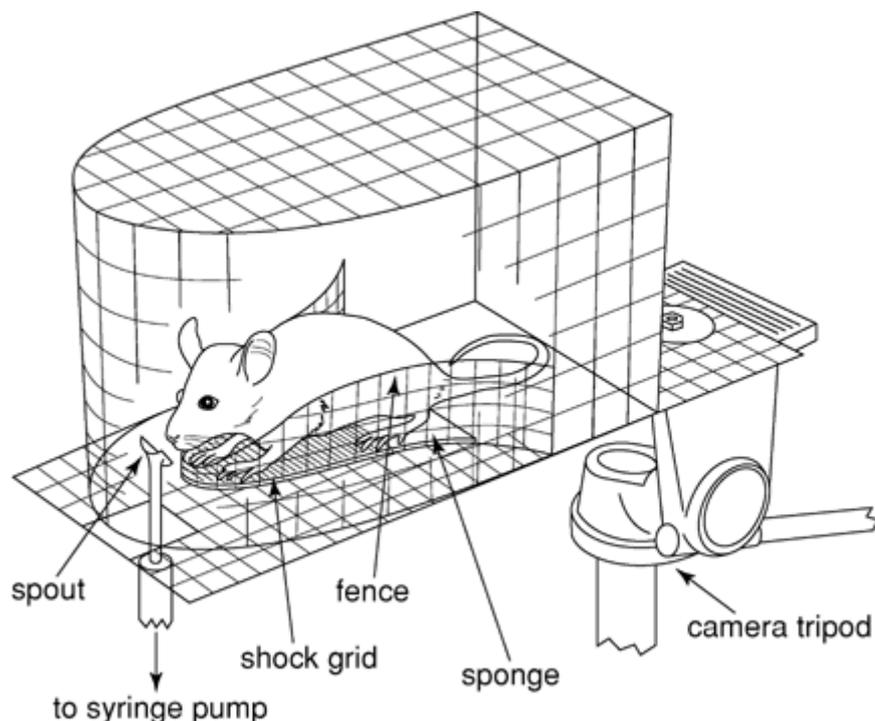
#### 3.1. Tiere

Die Untersuchung wurde mit sieben männlichen transgenen Mäusen (TG21) und sechs männlichen Kontrollmäusen (wildtyp, WT) durchgeführt. Die Mäuse wurden von 1) - 7) bzw. 1) - 6), ausgehend von Ihren Körpermerkmalen oder Schwanzmarkierungen, nummeriert. Die Tiere waren zu Beginn der ersten Versuche 80 bis 142 Tage alt und wurden in einer standardisierten Tierhaltung gehalten. Sie erhielten Trockenfutter ad libitum. Wasser gab es nur während dem täglichen Training. Die Tiere wurden täglich gewogen. Das Gewicht der Tiere konnte während des ganzen Versuchs bei 85-90% des Ausgangsgewichts gehalten werden. Der zweite Durchgang wurde ein halbes Jahr später mit den gleichen, nun gealterten Mäusen und unter denselben Bedingungen wie bei den ersten Versuchen durchgeführt. Da eine TG21 Maus in der Zwischenzeit verstarb, musste in dieser Gruppe mit einem Tier weniger gearbeitet werden.

Alle Versuche und der Unterhalt der Tiere wurden nach den kantonalen Richtlinien des Veterinäramts Zürich durchgeführt und durch dieses genehmigt.

### 3.2. Verhaltensaudiometrie

Der Versuchsaufbau wurde nach der Vorlage von H. Heffner et al. (2006) nachgebaut und die Beschreibung in diesem Kapitel stammt aus dieser original Publikation (auf Deutsch übersetzt und angepasst) [siehe Abb. 1]. Die Versuche fanden in einer schallisolierten Box statt. Aussen bestand die Box aus Holz, innen wurde sie mit Styropor und Noppenschaum ausgekleidet. Ein Testkäfig wurde, wie in Abb. 2, in der Mitte der schallisolierten Box montiert. Der Käfig wurde weiter mit einem Wasserspender (spout) ergänzt, welcher mit der Wasserpumpe (syringe pump) verbunden war. Eine Lautsprecheranlage für reine Töne von 1 bis 100 kHz wurde ebenfalls in der Box platziert. Ein Lautsprecher wurde frontal, zwei weitere seitlich zum Kopf der Maus installiert. Sie wurden etwa einen Meter vor dem Testkäfig auf einer Höhe von 0-15° zum Kopf der Maus platziert [siehe Abb. 2]. Die digital erzeugten Töne hatten eine Dauer von 400 ms und eine Anstiegs- und Abfallzeit von 10 ms. Die weitere Ausrüstung für die Überwachung und Stromerzeugung wurde ausserhalb der Box platziert. Das Tier im Testkäfig konnte via Videokamera, welche seitlich neben dem Testkäfig platziert wurde, auf dem Monitor verfolgt werden. Für die Überwachung des elektrischen Signals sorgte ein Oszilloskop. Weiter wurden auch ein Spektrums Analysator, eine Mikrofon Kalibrator, und ein Verstärker verwendet.



**Abb. 1:** Testkäfig mit Wasserrinne (Heffner et al. 2006)

Das Drahtgitter wurde an der Oberseite gelenkig verschlossen, so dass man die Tiere gut herausnehmen konnte. Im Testkäfig wurde ein Maschendrahtzaun (fence) etwa auf Höhe der Mausschulter angebracht. Er diente der geraden Ausrichtung der Maus zum Lautsprecher hin. Die Maus stand dabei auf einem Drahtgeflecht (shock grid). Zwischen diesem Drahtgeflecht und dem Boden des Käfigs war ein etwa 2 Millimeter dicker Schwamm (sponge) platziert. Dieser Schwamm wurde täglich befeuchtet damit ein guter elektrischer Kontakt zu den

Füssen des Tieres gewährleistet war. Die Wasserpumpe setzte ein, wenn ein Kontakt zwischen der Mausschnauze und der Wasserrinne bestand und die Maus zusätzlich in Kontakt mit dem Drahtgeflecht des Bodens war. So wurde sichergestellt, dass die Wasserpumpe nicht fälschlicherweise anging, wenn sich die Maus nur im Käfig bewegte und dabei zufälligerweise an der Wasserrinne ankam. Die Maus konnte folglich nur dann die Wasserpumpe in Gang setzen und trinken, wenn sie korrekt im Käfig positioniert war. Dies war die Voraussetzung dafür, dass der Kopf der Maus und folglich auch die Ohren stets optimal zur Lautsprecheranlage hin ausgerichtet waren. Ein Stromgenerator wurde ausserhalb der Versuchsbox installiert. Beim Erklingen eines Tons aus der Lautsprecheranlage wurde ein Strom zwischen dem Wasserspender und dem Käfigboden erzeugt. Bestand während dieser Zeit ein Kontakt mit der Wasserrinne, was beim Trinken der Maus der Fall war, kam es zu einem milden Stromschlag. Ebenso wurden auch kleine Lichter neben dem Käfig in Höhe der Kamera platziert [siehe Abb. 2]. Diese produzierten ein helles Licht, welches während dem Schock an- und nach dem Schock wieder ausging. Die Versuche wurden über einen Computer gesteuert und auf dem Monitor verfolgt.



**Abb. 2:** Bild der Versuchsapparatur. Der Deckel ist geöffnet. Sichtbar ist die mit Noppenschaum ausgekleidete schallisolierte Box und in der Mitte der geöffnete Testkäfig. Weiter sind auch die Kamera mit der Lichtquelle und die Lautsprecher sichtbar.

Um die Hörschwelle zu ermitteln, wurde ein Standardverfahren zur konditionierten Unterdrückung nach Heffner et al. (2006) verwendet. Das Ziel war, dass die Maus augenblicklich mit dem Trinken aufhörte, sobald sie einen Ton hörte. Falls die Maus weiter aus der Wasserrin-

ne trank, während der Ton erklang, floss Strom in der Versuchsanleitung und die Maus erhielt einen milden elektrischen Schock.

Am Anfang dieses Verfahrens zur konditionierten Unterdrückung wurde die Maus mit der Versuchsanlage und dem Testkäfig vertraut gemacht. So konnte sie den Testkäfig 15 bis 20 Minuten lang explorieren. Ebenso hatte sie die Gelegenheit aus der Wasserrinne zu trinken. Die Wasserpumpe im Testkäfig war zu Beginn des Trainings auf eine Flussrate von 20 ml/h eingestellt und wurde in den täglichen Trainings schrittweise reduziert bis die Maus für ca. 15 Minuten kontinuierlich am Trinken war. Dies war in der Regel bei einer Flussrate von 7-10 ml/h der Fall. Dieser erste Teil im Verfahren zur konditionierten Unterdrückung erforderte etwa 3-5 Tage. Die Maus wurde in diesem Schritt nur auf die Vertrautheit mit dem Testkäfig und das kontinuierliche Trinken trainiert. Um dies zu ermöglichen, musste die Wasserflasche aus dem Tierkäfig entfernt werden. Es bestand für die Maus sonst keinen Drang während dem täglichen Training aus der Wasserrinne der Versuchsanlage zu trinken. Folglich wurden 24 Stunden bevor dieses Verfahren zur konditionierten Unterdrückung startete, die Wasserflasche aus dem Tierkäfig entfernt und die Mäuse gewogen. Das Gewicht der Mäuse wurde täglich überwacht.

Beherrschte die Maus diesen ersten Teil folgte in einem zweiten Schritt die Konditionierung auf die tonbedingte Trinkunterbrechung. In unregelmäßigen Abständen wurden dazu im Training während dem Trinken aus der Wasserrinne laute Töne abgespielt (Warnsignale) gefolgt von einem hellen Licht und einem Stromfluss in der Versuchsanlage. Bestand nach einem Ton weiterhin Kontakt mit dem Wasserspender, erfolgte kurz ein milder elektrischer Schock. Das Tier lernte schnell den Schock zu vermeiden, indem es den Kontakt mit dem Wasserspender unterbrach und zurückwich, sobald das Warnsignal ertönte. Nach Abklingen des Warnsignals und Erlöschen des Lichts, positionierte sich die Maus wieder am Wasserspender und trank weiter. Die Warnsignale bestanden während der Konditionierung aus lauten Tönen der Frequenz von 4 kHz. Beherrschte die Maus diesen zweiten Schritt ebenfalls, konnte mit dem Versuchsprogramm begonnen werden.

Die Warnsignale waren sowohl von der Frequenz als auch von der Lautstärke veränderbar, was die Ermittlung einer Hörschwelle und das Erstellen einer Hörkurve für jede einzelne Maus ermöglichte. Das Warnsignal hatte in einem Versuch immer dieselbe Frequenz, so konnte mittels Veränderung der Lautstärke die Hörschwelle ermittelt werden. Die Lautstärke des Warnsignals war zu Beginn des Versuchs am höchsten und wurde dabei im Laufe des Versuches jeweils reduziert. Dies wurde so lange weitergeführt bis der Ton (das Warnsignal) unter der Hörschwelle der Maus lag und nicht mehr gehört werden konnte. Dabei folgte diesem Fehler ein milder elektrischer Schock, dies wurde als Fehler im Versuchsprogramm gewertet. Das Ermitteln und Auswerten der Fehler ermöglichte die Bestimmung der Hörschwelle. Es wurde täglich bei jeder Maus ein Versuch zu jeweils einer Frequenz durchgeführt. Die Versuche erfolgten täglich zur gleichen Uhrzeit mit der gleichen Reihenfolge der zu testenden Mäuse.

Das Trainieren einer Maus auf das kontinuierliche Trinken aus dem Wasserspender und in einem zweiten Schritt auf die tonbedingte Trinkunterbrechung nahm etwa eine Woche in Anspruch. Die anschließende Hörschwellenbestimmung dauerte je nach Maus unterschiedlich lang, aber in der Regel etwa vier Wochen. Um das Tier nicht zu demotivieren, wurden die Töne, welche unter der vermuteten Hörschwelle im Zufallsbereich lagen und von der Maus nicht gehört werden konnten, auf ein Minimum reduziert. Ein Versuch wurde zudem immer

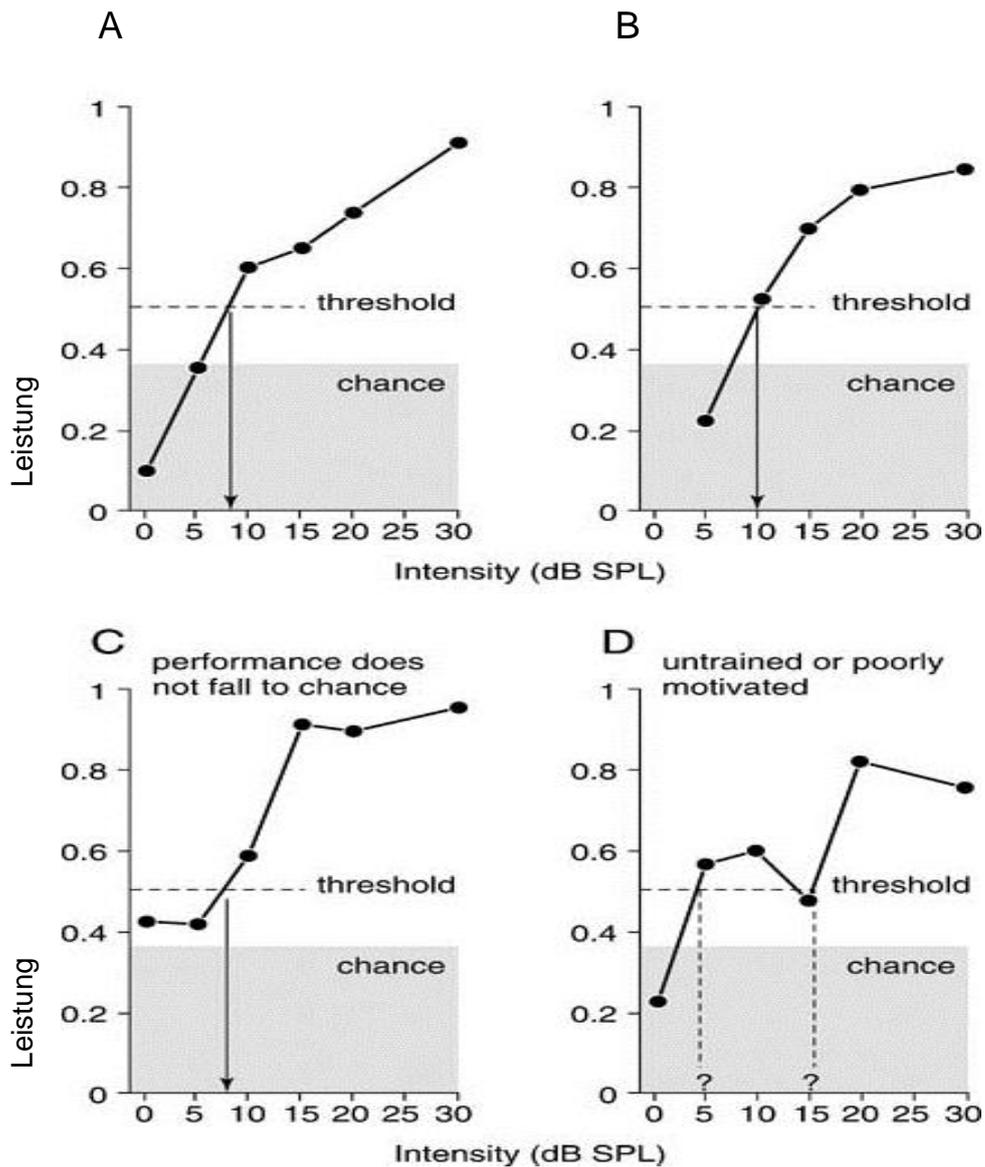
mit gut hörbaren, lauten Tönen beendet. Diese konnte die Maus mit Sicherheit hören und beendete die Hörschwellenbestimmung so jeweils immer ohne Fehler.

Das Versuchsprogramm war so aufgebaut, dass jeder Versuch zur Bestimmung einer Hörschwelle aus mehreren Teilversuchen, nachfolgend Trials genannt, bestand. Diese Trials waren je zwei Sekunden lang und mit einer Sekunde Abstand voneinander getrennt. Jeder Trial enthielt entweder ein akustisches Signal (Warnsignal) mit anschliessendem Schock, oder keinen Ton (Stille, sicheres Signal) ohne folgenden Schock. 22% des Versuches bestanden aus Trials mit einem akustischen Signal, der Rest bestand aus sicheren Signalen. Jeder Teilversuch wurde, abhängig vom Kontakt des Tiers mit dem Wasserspender, während der letzten 200ms mit 0 bis 10 bewertet. 10 stand dabei für kompletten Kontakt mit dem Wasserspender, 0 bedeutete keinen Kontakt mit dem Wasserspender. Die dazwischen liegenden Bewertungen zeigten einen intermittierenden Kontakt an, d.h. das Tier war nicht stetig am Trinken oder wich zu spät zurück. Unterbrach die Maus den Kontakt mit dem Wasserspender nach einem Warnsignal war dies ein Treffer (0), so wie auch der stetige Kontakt während eines sicheren Signals ohne Ton (10). Als Fehler galt, wenn ein Tier das Warnsignal nicht hörte und einen Schock bekam (10 anstatt 0) oder es ein sicheres Signal als Warnsignal falsch deutete (0 anstatt 10). Anhand dieser Bewertungen wurde die Leistung des Tieres zu der getesteten Frequenz berechnet. Die Leistung setzte sich demnach aus der Trefferrate und der Fehlerquote folgendermassen zusammen:

$$\text{Leistung} = \text{Trefferrate} - (\text{Fehlerrate} \times \text{Trefferrate})$$

Daraus abgeleitet wurde die Hörschwelle - analog dem Protokoll von Heffner et al. (2006) - als die Lautstärke definiert, die einer Leistung von 0.50 entsprach [siehe Abb. 3]. Gemäss Heffner et al. wurde die 0.50 (oder 50%) Leistungsschwelle (in unserem Fall eine 50% Trefferrate korrigiert mit der Fehlerrate) seit längerer Zeit in der Psychophysik als Schwelle definiert und sie scheint stabiler zu sein als höhere oder tiefere Leistungsschwellen.

Die Hörschwellen für die getesteten Frequenzen wurden eruiert, indem die Lautstärke eines Tons immer weiter verringert wurde. Die Lautstärke wurde vom Prüfer jeweils in 5 dB Schritten reguliert. Reagierte die Maus adäquat auf 3-4 Warnsignale bei sonst stetigem Kontakt zum Wasserspender bei den sicheren Signalen, wurde die Lautstärke für das nächste Warnsignal reduziert. Lag die Leistung des Tieres unter der Zufallsschwelle (Leistung < 0.35), konnte, sofern die Maus gut mitarbeitete, davon ausgegangen werden, dass die Maus den Ton nicht mehr hörte [siehe Abb. 3]. Die Lautstärke wurde dann wieder erhöht. Am Ende eines Versuchs wurde die Hörschwelle mittels der Leistungen, welche die Maus bei den geprüften Lautstärken aufwies, errechnet [siehe Abb. 3]. Wenn die Hörschwelle einer Frequenz in verschiedenen Versuchen stabil blieb und nicht nach oben oder unten variierte, wurde die Hörschwelle für diese Frequenz festgelegt. So wurden in den folgenden Tagen fortlaufend die Hörschwellen für die Frequenzen 1.4, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 50, 64 und 80 kHz ermittelt.



**Abb. 3:** Eine Auswahl von leistungsabhängigen Hörschwellenbestimmungen. Schema A und B zeigen gute Leistungen mit Hörschwellen (threshold) bei etwa 8 und 10dB, während bei C und D methodische Probleme vorliegen und keine Hörschwelle bestimmbar ist. Die horizontal gestrichelte Linie liegt bei der halben (0.5) Leistung. Das grau hinterlegte Areal zeigt den Zufallsbereich (chance) an. Hier unterscheiden sich die Treffer- und die Fehlerraten nicht signifikant (Heffner et al. 2006).

### 3.3. Statistikverfahren

Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe des SPSS Programm von IBM ausgerechnet. Es wurden die durchschnittlichen Hörschwellen der verschiedenen Frequenzen zwischen den Epo-überexprimierenden Tieren (TG21) und den Kontrolltieren (WT) im Alter von 5 und 11 Monaten miteinander verglichen. Es wurde dabei ein t-Test für unabhängige kleine Stichproben verwendet, um die Resultate der jungen WT und TG21 Tieren miteinander zu vergleichen. Dasselbe wurde auch bei den gealterten Tieren ausgewertet. Der statistische Ablehnungsbereich wurde bei  $p < 0,05$  für alle Vergleiche festgelegt. Es wurde zudem ein Vergleich zwischen der Gruppe von jungen Mäusen und der Gruppe der alten Mäuse ermittelt und grafisch als Hörschwellendifferenz der einzelnen Frequenzen dargestellt. Bei der statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den jungen vs. alten Mäusen wurden bei den Werten, wo die höchste Lautstärke unseres Geräts nicht wahrgenommen werden konnte, einen Wert angenommen, welcher 5dB über der höchsten Lautstärke unseres Geräts lag.

In einer vorangehenden Masterarbeit wurde dieses statistische Verfahren verwendet, um die Gleichheit der Hörschwellen der jungen WT Mäuse und TG21 Mäuse zu Beweisen und die Werte mit der Vorlage von Koay et al. (2002) zu vergleichen.

## 4. Resultate

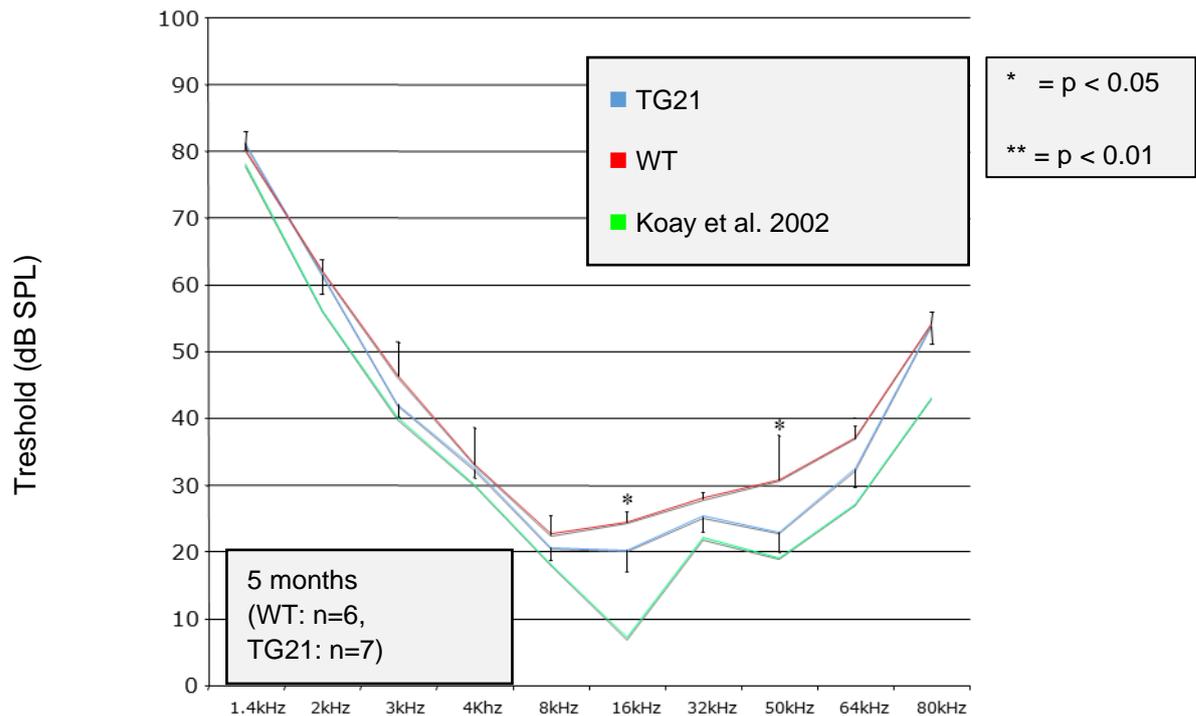
### 4.1. Gehör WT vs. TG21 Mäuse im Alter von 5 Monaten

In Tabelle 1 sind die ermittelten Hörschwellen der 5 Monate alten Tiere ersichtlich. In der Legende auf der linken Seite sind die Tiere beschrieben, 1) – 6) sind WT Mäuse, die Tiere 7) – 13) sind TG21 Mäuse. Die Durchschnittswerte der ermittelten Hörschwellen jeder Maus in dB SPL sind unter der jeweiligen Frequenz eingetragen. Diese Messungen mit den zugehörigen Resultaten wurden bereits in einer vorangehenden Masterarbeit gezeigt. In der Grafik 1 sind diese Werte als Hörkurve in Bezug zur jeweiligen Frequenz aufgezeigt. Die Werte der Tiere 1) - 6) (WT) sind dabei als rote Funktion aufgezeichnet, die der Tiere 7) – 13) (TG21) als blaue Funktion mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Zusätzlich noch als grüne Linie abgebildet sind vorpublizierte Daten von Koay et al. 2002.

Tabelle 1: Ermittelte Hörschwellen bei jungen, 5 Monate alten Tieren\*

	1.4kHz	2 kHz	3kHz	4Khz	8kHz	16kHz	32kHz	50kHz	64kHz	80kHz
1) WT	77.35	60.15	43.45	32.49	21.95	23.74	28.2	40.7	37.22	54.17
2) WT	81.95	64.45	43.62	30.83	23.24	22.78	26.39	26.65	37.08	56.67
3) WT	83.17	61.52	53.86	40.83	25.95	24.185	28.35	27.39	34.58	52.5
4) WT	78.05	61.95	44.46	27.75	19.15	26.65	28.6	28.3	39.01	52.92
5) WT	80.28	60.83	45.28	34.17	21.81	21.39	22.78	24.44	30.97	47.5
6) WT	78.61	61.67	38.61	33.61	21.81	22.78	28.33	23.61	28.61	41.11
7) TG21	82.22	56.94	43.05	31.38	23.24	18.88	26.8	20	26.67	58.19
8) TG21	81.52	61.8	42.22	32.77	21.39	20.28	21.94	20.56	32.92	50.69
9) TG21	82.22	59.03	42.64	31.67	19.44	24.16	27.64	26.38	34.86	54.16
10) TG21	81.39	63.19	38.61	31.25	20	14.58	27.22	26.53	33.75	57.36
11) TG21	81.25	64.58	44.3	31.8	17.63	21.66	25.41	22.77	34.02	53.61
12) TG21	79.03	60.14	43.19	35	19.87	18.61	22.5	24.16	31.52	51.66
13) TG21	80.56	64.16	40.55	32.64	22.78	23.47	25	19.58	32.64	51.94

\* Die Werte aus der Tabelle 1 sind Durchschnittswerte der ermittelten Schwellen jeder Maus in dB SPL.



**Legende zu Grafik 1:** Hörschwellenwerte der jungen TG21 in blau und WT Mäuse in rot als Hörkurvenfunktion der einzelnen Werte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Zusätzlich vorpublizierte Daten von Koay et al. 2002 in grün.

Die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen dem Gehör der jungen WT und TG21 Mäusen gibt, konnte für alle Frequenzen ausser bei den Frequenzen 16 und 50kHz, angenommen werden. Bei den Frequenzen 16 und 50kHz zeigten die WT Tiere signifikant höhere Hörschwellen. Die von uns ermittelten Hörschwellen waren alle signifikant höher als die vorpublizierten Daten von Koay et al. (2002).

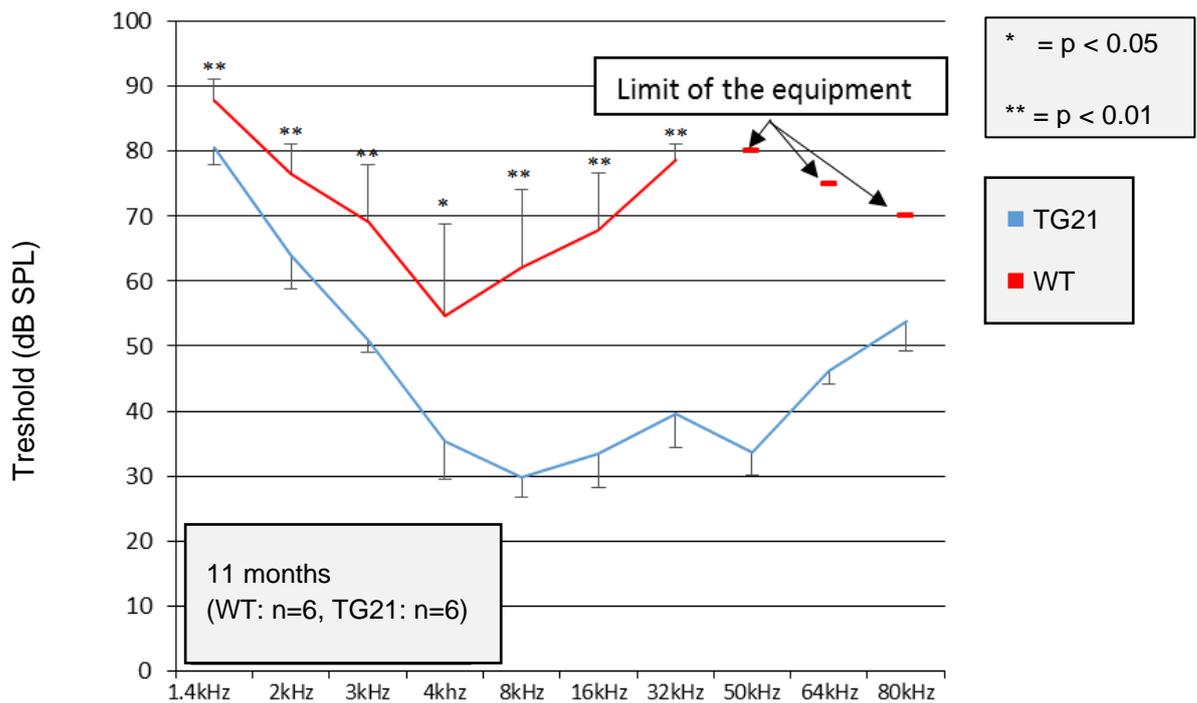
## 4.2. Gehör WT vs. TG21 Mäuse im Alter von 11 Monaten

In der Tabelle 2 sind die ermittelten Hörschwellen der gealterten, 11 Monate alten Tiere ersichtlich. In der Legende auf der linken Seite sind die Tiere wieder analog zur Tabelle 1 beschrieben. 1) – 6) sind WT Mäuse, die Tiere 7) – 13) sind die TG21 Mäuse. Die Durchschnittswerte der ermittelten Hörschwellen jeder Maus in dB SPL sind unter der jeweiligen Frequenz eingetragen. In der Grafik 2 sind diese Werte als Hörkurve in Bezug zur jeweiligen Frequenz aufgezeigt. Die Werte der Tiere 1) - 6) (WT) sind dabei als rote Funktion aufgezeichnet, die der Tiere 7) – 13) (TG21) als blaue Funktion mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Tabelle 2: Ermittelte Hörschwellen bei gealterten, 11 Monate alten Tieren\*

	1.4kHz	2kHz	3kHz	4kHz	8kHz	16kHz	32kHz	50kHz	64kHz	80kHz
1) WT	90	82.22	81.67	63.06	66.67	>80	>80	>80	>75	>70
2) WT	>90	71.94	61.67	41.67	39.17	64.17	73.77	>80	>75	>70
3) WT	>90	75.28	77.22	62.78	69.44	56.94	78.33	>80	>75	>70
4) WT	82.5	77.5	59.44	38.33	58.89	62.78	>80	>80	>75	>70
5) WT	>90	81.39	68.06	74.44	69.44	77.22	>80	>80	>75	>70
6) WT	84.44	70.83	67.22	47.5	69.17	65.83	>80	>80	>75	>70
7) TG21	83.61	62.22	53.06	35.83	33.89	26.39	38.06	31.67	48.61	57.22
8) TG21	80.56	58.89	49.44	28.06	33.33	29.72	38.33	33.61	45.56	56.11
9) TG21	81.53	64.72	48.89	36.11	27.78	32.5	31.67	28.33	47.78	47.5
10) TG21	77.5	67.5	51.92	30	28.61	35.28	41.11	33.06	45.56	51.39
11) TG21	82.78	58.61	52.5	37.22	27.5	34.72	41.11	37.5	43.06	59.72
12) TG21	77.5	71.94	49.44	45	27.5	41.67	47.5	38.06	46.11	50.83

\* Die Werte aus der Tabelle 2 sind Durchschnittswerte der ermittelten Schwellen jeder Maus in dB SPL. Falls das Tier bei einer Frequenz die höchste Lautstärke des Geräts nicht hören konnte, wurde dies mit „>“ gekennzeichnet.



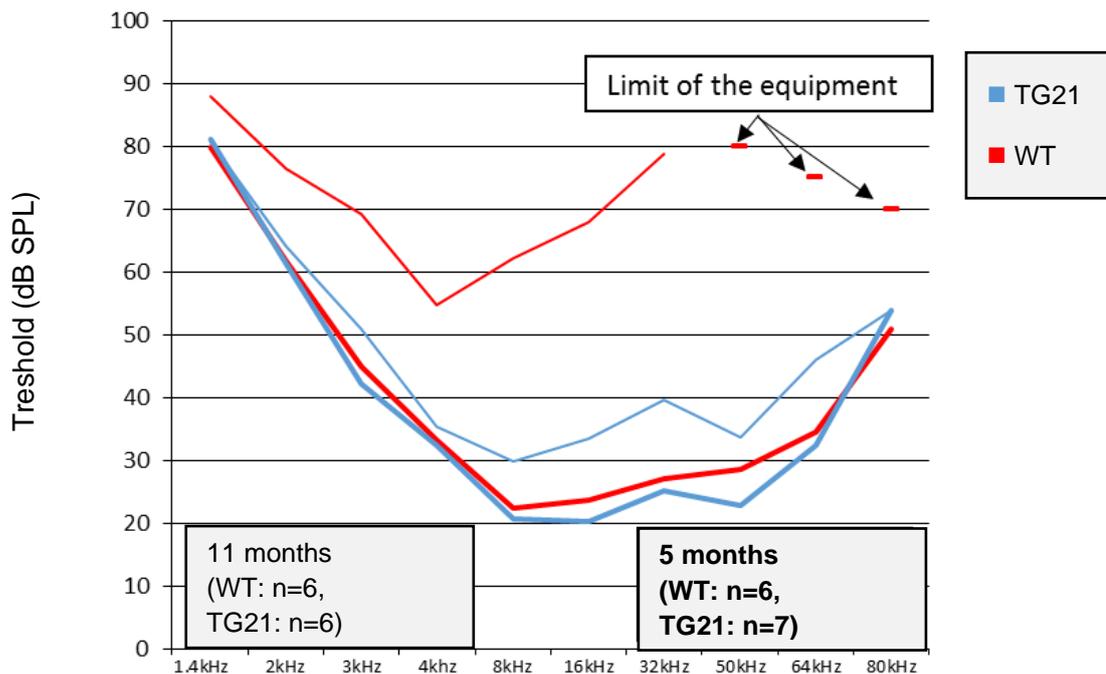
**Legende zu Grafik 2:** Hörschwellenwerte der gealterten TG21 Mäuse in rot und WT Mäuse in blau als Hörkurvenfunktion der einzelnen Frequenzen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Bei 50-80kHz konnten die WT Mäuse die höchste Lautstärke des Geräts nicht wahrhaben.

Die Hypothese, dass es Unterschiede im Gehör der 11 Monaten alten WT und TG21 Mäuse gibt, konnte zu allen Frequenzen angenommen werden. Ausser bei der Frequenz 4kHz war das Gehör der TG21 Mäuse sogar hoch signifikant besser, als dasjenige der WT Mäuse. Bei der Frequenz 50kHz, 64kHz und 80kHz konnte das Gehör der WT Mäuse nicht mehr die höchste Lautstärke unseres Geräts wahrhaben (>80kHz, >75kHz, >70kHz). Es wird demnach ein noch schlechteres Gehör der WT Mäuse bei diesen Frequenzen angenommen.

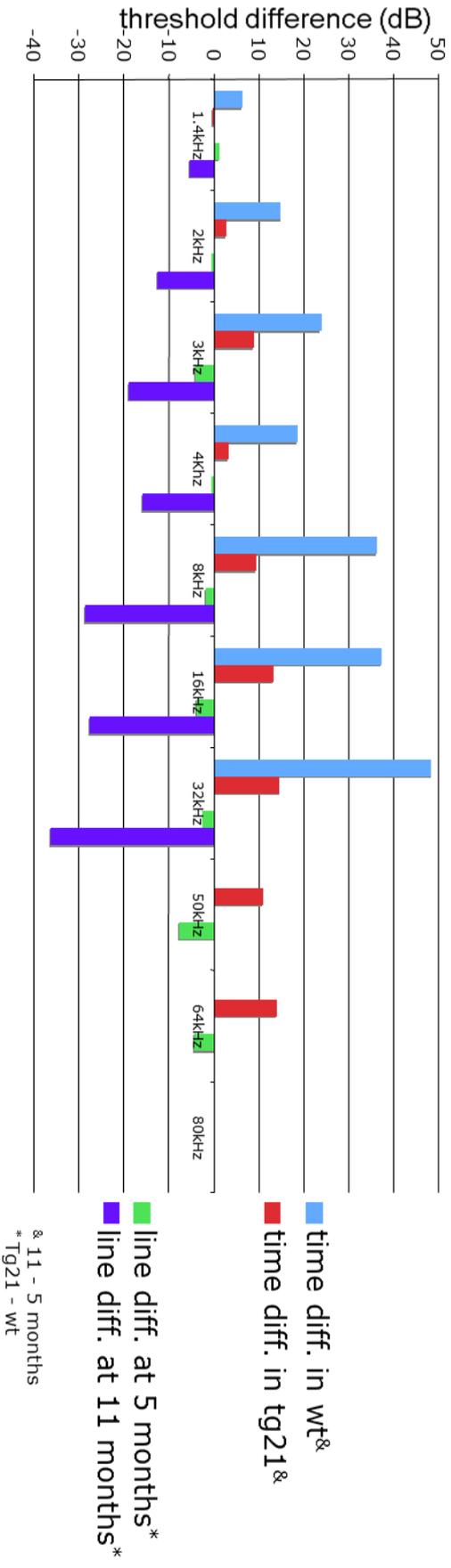
### 4.3. Gehör WT und TG21 Mäuse im Alter von 5 Monaten vs. 11 Monaten

In der Grafik 3 sind die ermittelten Hörschwellen der 5 Monate alten Tiere und der gealterten, 11 Monate alten Tiere in einer Grafik ersichtlich. Die roten Hörkurven zeigen wie in den vorangehenden Grafiken die Hörschwellenwerte der WT Mäusen und die blauen Hörkurven die Hörschwellenwerte der TG21 Mäusen. Die Durchschnittswerte der ermittelten Hörschwellen jeder Maus sind in dB SPL unter der jeweiligen Frequenz eingetragen, zur besseren Übersichtlichkeit ohne die dazugehörigen Standardabweichungen. Die Werte der gealterten, 11 Monate alten Tiere sind als Funktion mit dünner Linie aufgezeichnet und die der 5 Monate alten Tiere als Funktion mit dicker Linie.

In der Grafik 4 ist mithilfe von hellblauen Balken, der absolute Hörschwellenunterschied in dB der jungen vs. gealterten WT Mäuse zur jeweiligen Frequenz dargestellt. Mithilfe von roten Balken ist dasselbe für die Hörschwellenunterschiede der jungen vs. gealterten TG21 Mäuse aufgezeigt. Die grünen Balken zeigen die absolute Differenz der Hörschwellenwerte der jungen WT Mäuse vs. jungen TG21 Mäuse in dB zur jeweiligen Frequenz. Die Differenz der Hörschwellen der gealterten TG21 Mäusen und den WT Mäusen sind mithilfe von dunkelblauen Balken dargestellt, bei 50-80kHz konnte keine genaue Differenz festgelegt werden bei fehlenden absoluten Hörschwellen der gealterten WT Mäusen.



**Legende zu Grafik 3:** Hörschwellenwerte der TG21 Mäuse in roter Farbe und WT Mäuse in blau als Hörkurvenfunktion der einzelnen Frequenzen. Die dicke Linie steht für die jungen Tieren und die dünne Linie zeigt die Hörkurve der gealterten Tiere (zur besseren Übersicht ohne Standardabweichung, siehe Grafik 1 und 2). Bei 50-80kHz konnten die gealterten WT Mäuse die höchste Lautstärke des Geräts nicht wahrhaben.



**Legende zu Grafik 4:** Hellblau dargestellt sind die Hörschwellenunterschiede der jungen vs. gealterten WT Mäuse und in Rot dasselbe für die TG21 Mäuse. In Grün sind die Differenzen zwischen den Hörschwellen der jungen WT Mäuse und TG21 Mäuse dargestellt. Mithilfe von dunkelblauen Balken dargestellt sind die Differenzen zwischen den Hörschwellen der gealterten TG21 Mäusen und den WT Mäusen, wobei bei 50-80kHz keine genaue Differenz festgelegt werden kann, bei fehlenden absoluten Hörschwellen der WT Mäusen.

Die ermittelten Werte der absoluten Hörschwellen ergaben, dass die gealterten WT Mäuse eine Hörschwellenverschlechterung zwischen etwa 6dB (bei 1.4kHz) bis zu 49dB (bei 32kHz), gegenüber den Hörschwellenwerten im jungen Alter aufwiesen. Die Unterschiede stiegen dabei mit zunehmender Frequenz. Bei den alten TG21 Tieren zeigte sich im Mittel keine Verschlechterung bei den Hörschwellenwerten von 1.4kHz und 80kHz. Bei den restlichen Frequenzen zeigte sich eine Verschlechterung der Hörschwellenwerte gegenüber den Werten im jungen Alter von 3dB (bei 2kHz und 4kHz) bis zu 14dB (bei 32 kHz und 64 kHz). Der absolute Vergleich zwischen den Hörschwellen der jungen und gealterten WT und TG21 Tieren ergab, dass die Unterschiede der Hörschwellenwerte der WT Mäusen viel höher ausfiel und bis zu 35dB mehr betrug als die Unterschiede zwischen den jungen und den gealterten TG21 Mäusen. Statistisch erweisen sich die Werte der alten WT Tiere als signifikant schlechter zu allen Frequenzen im Vergleich zu den jungen WT Mäusen. Bei 4kHz erwies sich die Differenz als signifikant schlechter ( $p < 0.05$ ), bei allen anderen Frequenzen erwies sich die Differenz sogar als hoch signifikant schlechter ( $p < 0.01$ ). Bei den TG21 Tieren erwies sich die Hörschwelle der alten Tieren signifikant schlechter bei allen Frequenzen ( $p < 0.05$ ) ausser bei den Frequenzen 1.4kHz, 2kHz, 4kHz und 80kHz, hier konnten keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Hörschwellenwerte der jungen und alten TG21 Tieren festgestellt werden.

## 5. Diskussion

Die Fragestellung war, ob Mäuse mit einer konstanten Erythropoietin-Überexpression einen anderen Verlauf der altersabhängigen Schwerhörigkeit haben als Wildtypen.

Epo-überexprimierende Tiere zeigten im Alter [siehe Grafik 2] ein eindeutig besseres Gehör als die WT Mäuse bei allen gemessenen Frequenzen. Weiter konnte auch gezeigt werden, dass die Gehörverschlechterung im Alter bei den WT Mäusen viel höher ausfiel als bei den Epo-überexprimierenden Mäusen. Der absolute Unterschied zwischen den Hörschwellen der jungen Mäuse und gealterten Mäuse betrug bei den WT Mäusen bis zu über 35 dB mehr als bei den TG21 Mäusen [siehe Grafik 3 und Grafik 4].

Die WT Mäuse und die TG21 Mäuse unterschieden sich lediglich dadurch, dass die TG21 Tiere Erythropoietin im Gehirn überexprimierten. Es fand kein direkter Nachweis von Erythropoietin im Innenohr der TG21 Mäuse statt. Beide Gruppen gehörten zum Mausstamm C57BL6 und wurden zu denselben standardisierten Konditionen gehalten. Sie wurden täglich zu denselben Zeiten geprüft und waren zu Beginn des Experiments jeweils gleich alt. Die Umgebung und die Lärmbelastungen waren ebenfalls gleich für alle Mäuse. Der unterschiedliche Verlauf der altersabhängigen Schwerhörigkeit beider Gruppen wird daher trotz dem fehlenden Nachweis am ehesten auf die Epo-Überexpression der TG21 Mäuse im Gehirn zurückgeführt. Unsere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass eine konstante Epo-Überexpression einen positiven Effekt auf das alternde Gehör von Mäusen bewirkt.

Wir schliessen unter Annahme dieser Vermutung, dass eine konstante Epo-Überexpression einen schützenden Effekt auf das Gehör ausübt, welches die Tiere vor einer altersbedingten Schwerhörigkeit schützt. Das Gehör der TG21 Mäuse verschlechterte sich in unseren Messungen im Alter maximal um 14dB, dasjenige der WT Mäuse um mehr als 49dB. Diese Feststellung deckt sich mit den Erkenntnissen aus den Studien von Andreeva et al. 2006, Monge et al. 2006 und Kaiser et al. 2013 über den schützende Effekt von Erythropoietin in vitro. Weiter ist dies auch einen Hinweis darauf, dass Epo nicht nur intraperitoneal injiziert einen Effekt auf das Gehör ausübt, wie z.B. in der Studie von Han et al. 2013, sondern auch durch eine konstante Überexpression im Gehirn.

Die WT Mäuse zeigten im Alter eine Verschlechterung der Hörschwelle, die bei höheren Frequenzen zunahm. Dies deckt sich mit der typischen Ausprägung einer altersbedingten Schwerhörigkeit und den Resultaten aus älteren Studien über die altersbedingte Schwerhörigkeit der C57BL6 Mäuse (z.B. Keithley et al. 2004, Hunter et Willott 1987). Eine Screening-Untersuchung an 80 Mäusestämmen zeigte, dass die C57BL6 Mäuse im Alter von 33 Wochen noch normale Schwellen in der ABR-Messung haben und im Alter von 100 Wochen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine 60dB höhere Hörschwelle in der ABR-Messung aufwiesen (Zheng et al. 1999).

Die jungen TG21 Mäuse [siehe Grafik 1] zeigten einen geringfügigen Unterschied in wenigen Frequenzen im Vergleich zu den Kontrolltieren und eine geringe Abweichung zu den publizierten Daten von Koay et al. (2002). Auf die Gründe dazu wurde in der vorangehenden Masterarbeit *Wirkung von Erythropoietin auf das Gehör von adulten transgenen Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen*, eingegangen. Zusammenfassend wurde eine protektive Wirkung von Epo bei nur zwei Frequenzen als unwahrscheinlich angesehen. Eine protektive

Wirkung wäre einerseits nicht nur in zwei Frequenzen zu erwarten und andererseits würden wir sie eher in den höheren Frequenzen erwarten, da die Haarzellen der basalen Windung am empfindlichsten gegenüber toxischen Einwirkungen sind (Lim 1976). Somit wurde der Unterschied in zwei Frequenzen als zufällig angesehen. Die Gründe für eine Abweichung von der publizierten Hörkurve von Koay et al. (2002) wurde am ehesten mit unterschiedlich getestetem Mausstamm und den etwas jüngeren Mäusen von Koay et al. erklärt.

Die gealterten TG21 Tiere [siehe Grafik 3] zeigten bei den meisten Frequenzen eine Verschlechterung im Alter, die Hörschwellen waren signifikant schlechter in allen Frequenzen ausser 1.4kHz, 2kHz, 4kHz und 80kHz (siehe 4.3. Gehör WT und TG21 Mäuse im Alter von 11 Monaten vs. 5 Monaten). Die Unterschiede der Hörschwellen der gealterten TG21 Mäuse versus der Hörschwelle der jungen TG21 Mäuse nahmen tendenziell bei den höheren Frequenzen zu. Etwas atypisch für die Ausprägung einer altersbedingten Schwerhörigkeit war, dass die Hörschwelle bei 80kHz gleich blieb. Die Ursache hierfür ist nicht ganz ersichtlich.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sind Teil einer grösseren Studie, welche noch nicht publiziert wurde. Es wurden im Rahmen dieser Studie von Dr. med. Arianne Monge Naldi und Prof. Dr. med. Johannes Vogel mittels objektiver Hirnstammaudiometrie (click BERA) am anästhesierten Tier Messungen durchgeführt, am Ende des Versuchs wurde die Cochlea fixiert und histologisch untersucht [Resultate siehe Anhang].

Die in dieser Arbeit aufgezeigten verhaltensaudiometrischen Befunde konnten mittels Hirnstammaudiometrie bestätigt werden. Im Alter von 8 Monaten lag die mittels click BERA gemessene Hörschwelle bei den TG21 Mäusen im Durchschnitt bei 25 dB SPL während sie bei den WT Mäusen bei 56dB lag. Es lag damit bereits eine signifikante Verschlechterung vor. Im Alter von 12 Monaten lag die mittels click BERA gewonnene Hörschwelle der TG21 Mäuse im Durchschnitt bei 41dB, während die Schwelle bei den WT Mäusen bereits bei 75dB lag. Es konnte bei vielen 12 Monate alten WT Mäusen auch mit der maximalen Lautstärke von 80dB keine Hirnstampmpotentiale mehr ausgelöst werden. Die anschliessende histologische Untersuchung der Cochlea ergab bei den WT Tieren einen altersbedingten Verlust der Spiralganglionneurone und der äusseren Haarzellen im Cortischen Organ. Die histologische Untersuchung der Cochlea der TG21 Mäuse zeigte signifikant mehr Spiralganglienzellen und äussere Haarzellen. Diese Unterschiede waren am deutlichsten in der basalen Windung, tonotopisch den höheren Frequenzen entsprechend. Diese Befunde stellen somit das morphologische Korrelat der unterschiedlichen Hörschwellen von TG21 und WT Mäuse dar.

Es könnten aber auch weitere Faktoren auf das Resultat der Verhaltensaudiometrie einen Einfluss gehabt haben. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Erhöhung des Erythropoietin auch zu einer verbesserten Lernleistung führt. In der Arbeit von Hamidi et al. 2013 wurde an einem Demenzmodell (Streptozotocin intraventricular injiziert) gezeigt, dass Ratten welche Erythropoietin intraperitoneal erhielten, ein besseres räumliches Lernen und ein besseres Gedächtnis zeigten. In anderen Studien mit Epo-behandelten Ratten und Mäuse wurde ebenfalls ein steigernder Effekt des Epo auf die kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere nachgewiesen. Eventuell könnte dies auch für die Erythropoietin überexprimierenden TG21 Mäuse zutreffen (El-Kordi, Radyushkin und Ehrenreich 2009, Mala et al. 2005).

Ob eine erhöhte kognitive Leistung und die bessere Voraussetzungen für die operante Konditionierung auch einen Effekt auf die bessere Gehörleistung der TG21 Tiere hatten, ist nicht sicher beurteilbar. Es wurde während dem Versuch die Beobachtung gemacht, dass die alten TG21 Mäuse sich tendenziell schneller wieder in der Versuchsumgebung zurechtfinden.

Ebenso ist in der Studie von Yu et al. 2011 gezeigt worden, dass der altersbedingte Hörverlust durch eine Degeneration von Synapsen im Hippocampus von C57BL6-Mäusen begleitet wird. Es wurde im Alter bei allen Mäusen dieser Studie eine generelles Nachlassen der Kognition und der Performance nachgewiesen. Beim Mausstamm C57BL6 war dies jedoch im Alter von 11 Monaten schwerwiegender, sie zeigten eine deutlich schlechtere Leistung als im jungen Alter. Ob das Alter und die stammspezifische Synapsen Degeneration im Bereich des Hippocampus zu schlechteren Testbedingungen führte im Rahmen der operanten Konditionierung, ist möglich, die gealterten WT Tiere zeigten jeweils grosse Standardabweichungen. Eventuell hat das Erythropoietin die TG21 Mäuse auch vor dieser Degeneration partiell zu schützen vermocht, die TG21 Tiere zeigten im Alter keine starke Streuung der Leistung und Zunahme der Standardabweichungen, wie es bei den WT Mäusen beobachtet wurde.

Zusammenfassend mögen viele Effekte einen Einfluss auf unser Resultat gehabt haben, die Resultate legen jedoch nahe, dass eine konstante Epo-Überexpression zu einem deutlich positiven Effekt auf das alternde Gehör von Mäusen beiträgt. Es wurde mit dieser Arbeit erstmalig aufgezeigt, dass ein langfristig erhöhter Erythropoietinspiegel sich positiv auf die auditive Funktion von Mäusen auswirkt.

Vorausblickend werden Erythropoietin und dessen Rezeptor weiterhin ein interessantes und vielversprechendes Thema von künftigen Studiendesigns sein. Die genauen Wirkungsmechanismen und die möglichen therapeutischen Nutzen, in unserem Fall in Bezug auf die altersbedingte Schwerhörigkeit, bleibt ein noch weiter zu erforschendes Gebiet, nicht zuletzt wegen der beschriebenen zunehmenden Prävalenz in der Bevölkerung (Reiss 2009). In Anbetracht der erwähnten Arbeiten und Resultaten, sowie unseren Erkenntnissen, kann von einem positiven Effekt von Erythropoietin auf die auditive Funktion ausgegangen werden und zu weiteren Studien geraten werden.

## 6. Abbildungsnachweis

[1] Testkäfig mit Wasserrinne:

Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice— Conditioned Suppression. *Current Protocols in Neuroscience*. 8.21D.1–8.21D.15.

[2] Bild von der Versuchsanordnung:

Eigenes Foto, 02.02.2011

[3] Eine Auswahl von leistungsabhängigen Hörschwellenbestimmungen:

Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice— Conditioned Suppression. *Current Protocols in Neuroscience*. 8.21D.1–8.21D.15

## 7. Literaturverzeichnis

Albers K (2012) Hearing loss and dementia: new insights. *Minn Med.* 95:52-4.

Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:3974–3978.

Andreeva N, Nyamaa A, Haupt H, Gross J, Mazurek B (2006) Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti. *Neurosci Lett.* 396:86-90.

Baur M, Fransen E, Tropitzsch A, Mauz PS, Van Camp G, Blin N, Pfister M (2009) Einfluss exogener Faktoren auf Altersschwerhörigkeit. *HNO.* 57:1023-1028.

Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N (2003) The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62:228-236.

Cayé-Thomasen P, Wagner N, Lidegaard-Frederiksen B, Asal K, Thomsen J (2005) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in the guinea pig inner ear. *Hear Res.* 203:21–27.

Chisolm TH, Abrams HB, McArdle R (2004) Short- and long-term outcomes of adult audiological rehabilitation. *Ear Hear.* 25:464-477.

Ciorba A, Bianchini C, Pelucchi S, Pastore A (2012) The impact of hearing loss on the quality of life of elderly adults. *Clin Interv Aging.* 7:159-63.

Cox RM, Alexander GC, Gray GA (2005) Who wants a hearing aid? Personality profiles of hearing aid seekers. *Ear Hear.* 26:12-26.

DeStefano AL, Gates GA, Heard-Costa N, Myers RH, Baldwin CT (2003) Genomewide linkage analysis to presbycusis in the Framingham Heart Study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 129:285–289.

Diensthuber M, Illner T, Rodt T, Samii M, Brandis A, Lenarz T, Stöver T (2007) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in vestibular schwannoma: potential role in tumor progression. *Otol Neurotol.* 28:559-565.

Divenyi PL, Stark PB, Haupt KM (2005). Decline of speech understanding and auditory thresholds in the elderly. *J Acoust Soc Am.* 118:1089–1100.

EI-Kordi A, Radyushkin K, Ehrenreich H (2009) Erythropoietin improves operant conditioning and stability of cognitive performance in mice. *BMC Biol.* 7:37.

Fredriksen BL, Cayé-Thomasen P, Lund SP, Wagner N, Asal K, Olsen NV, Thomsen J (2007) Does erythropoietin augment noise induce hearing loss? *Hear. Res.* 223:129-137.

Freigang C, Schmidt L, Wagner J, Eckardt R, Steinhagen-Thiessen E, Ernst A, Rübsamen R (2011) Evaluation of central auditory discrimination abilities in older adults. *Front Aging Neurosci.* 3:6.

Genc S, Koroglu TF, Genc K (2004) Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci.* 22:105–119.

Hamidi G, Arabpour Z, Shabrang M, Rashidi B, Alaei H, Sharifi MR, Salami M, Reisi P (2013) Erythropoietin improves spatial learning and memory in streptozotocin model of dementia. *Pathophysiology.* 20:153-158.

Han F, Yu H, Zheng T, Ma X, Zhao X, Li P, Le L, Su Y, Zheng QY (2013) Otoprotective effects of erythropoietin on *Cdh23<sup>erl/erl</sup>* mice. *Neuroscience.* 237:1-6.

Hassan K, Gross B, Simri W, Rubinchik I, Cohen H, Jacobi J, Shasha SM, Kristal B (2004) The presence of erythropoietin receptors in the human peripheral nervous system. *Clin Nephrol.* 61:127–129.

Heffner H, Heffner R (2007) Hearing Ranges of Laboratory Animals. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 46:20-22.

Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice Conditioned Suppression. *Current Protocols in Neuroscience.* 8.21D.1–8.21D.15.

Hunter KP, Willott JF (1987) Aging and the auditory brainstem response in mice with severe or minimal presbycusis. *Hear Res.* 30:207–218.

Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G (2000) Age-related changes in the murine cochlear lateral wall. *Hear Res.* 139:116–122.

Ison JR, Allen PD (2003) Low-frequency tone pips elicit exaggerated startle reflexes in C57BL/6J mice with hearing loss. *J Assoc Res Otolaryngol.* 4:495-504.

Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 43:649-659.

Kaiser O, Paasche G, Stöver T, Ernst S, Lenarz T, Kral A, Warnecke A (2013) TGF-beta superfamily member activin A acts with BDNF and erythropoietin to improve survival of spiral ganglion neurons in vitro. *Neuropharmacology.* 75:416-425.

Keipert S, Voigt A, Klaus S (2011) Dietary effects on body composition, glucose metabolism, and longevity are modulated by skeletal muscle mitochondrial uncoupling in mice. *Aging Cell.* 10:122–136.

Keithley EM, Canto C, Zheng QY, Fischel-Ghodsian N, Johnson KR (2004) Age-related hearing loss and the ahl locus in mice. *Hear Res.* 188:21–28.

Koay G, Heffner R, Heffner H (2002) Behavioral audiograms of homozygous medJ mutant mice with sodium channel deficiency and unaffected controls. *Hear Res.* 171:111-118.

Kochkin S (2001) MarkeTrak VI: The VA and direct mail sales spark growth in hearing aid market. *Hearing Rev.* 8:16–24 and 63–65.

Lim DJ (1976) Ultrastructural cochlear changes following acoustic hyperstimulation and ototoxicity. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 85:740-751.

Lin FR, Metter EJ, O'Brien RJ, Resnick SM, Zonderman AB, Ferrucci L (2011) Hearing loss and incident dementia. *Arch Neurol.* 68:214-20.

List EO, Berryman DE, Wright-Piekarski J, Jara A, Funk K, Kopchick JJ. (2013) The effects of weight cycling on lifespan in male C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond).* 37:1088–1094.

Maiese K, Li F, Chong ZZ (2004) Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci.* 25:577–583.

Maiese K, Li F, Chong ZZ (2005) New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA.* 293:90–95.

Mala H, Alsina CG, Madsen KS, Sibbesen EC, Stick H, Mogensen J (2005) Erythropoietin improves place learning in an 8-arm radial maze in fimbria-fornix transected rats. *Neural Plast.* 12:329-340.

Manley GA, Fay RR, Popper AN (2008) Active processes and otoacoustic emissions in hearing. *Springer handbook of auditory research*, vol 30. Springer, New York

Markowski J, Gierek T, Wiecek A, Klimek D, Chudek J (2002) Assessment of hearing organ ability in high-frequency auditory in patients suffering from chronic renal failure treated by haemodialysis and human recombinant erythropoietin (rhPEO). *Otolaryngol Pol.* 56:589-596.

Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci.* 8:666–676

Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994) A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 269:19488–19493.

Mazurek B, Stöver T, Haupt H, Gross J, Szczepek A (2008) Pathogenesis and treatment of presbycusis. Current status and future perspectives. *HNO.* 56:429-432 and 434-435.

Monge A, Nagy I, Bonabi S, Schmid S, Gassmann M, Bodmer D (2006) The effect of erythropoietin on gentamicin-induced auditory hair cell loss. *Laryngoscope.* 116:312– 316.

National Council on Aging (2000) The consequences of untreated hearing loss in older persons. *ORL Head Neck Nurs.* 18:12-6.

Olgun Y, Kırkım G, Kolatan E, Kıray M, Bağrıyanık A, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Gökmen N, Ellidokuz H, Kumral A, Sütay S (2013) Otoprotective effect of recombinant erythropoietin in a model of newborn hypoxic-ischemic encephalopathy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 77:739-746.

Parham K (1997) Distortion product otoacoustic emissions in the C57BL/6J mouse model of age-related hearing loss. *Hear Res.* 112:216–234.

Probst R, Grevers G, Iro H (2008) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 3.Auflage, Thieme, Stuttgart

Quaschnig T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Hermann M, Slowinski T, Theuring F, Hocher B, Luscher TF, Gassmann M (2003) Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J.* 17:259–261.

Rabie T, Marti HH (2008) Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda)*. 23:263-264.

Radziwon KE, June KM, Stolzberg DJ, Xu-Friedman MA, Salvi RJ, Dent ML (2009) Behaviorally measured audiograms and gap detection thresholds in CBA/CaJ mice. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 195:961–969.

Reiss M (2009) *Facharztwissen HNO-Heilkunde*. Springer, Heidelberg

Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M (2000) Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:11609-11613.

Schuknecht HF, Gacek MR (1993) Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 102:1–16.

Sprinzi GM, Riechelmann H (2010) Current trends in treating hearing loss in elderly people: a review of the technology and treatment options - a mini-review. *Gerontology*. 56:351–358.

Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, Aulmann M, Frietsch T, Schmid-Schonbein H, Kuschinsky W, Gassmann M (2003) Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood*. 102:2278–2284.

Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M (2001) Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21:857–864.

Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K (2013) Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res*. 303:30-8.

Yu YF, Zhai F, Dai CF, Hu JJ. (2011) The relationship between age-related hearing loss and synaptic changes in the hippocampus of C57BL/6J mice. *Experimental Gerontology*. 46:716–722.

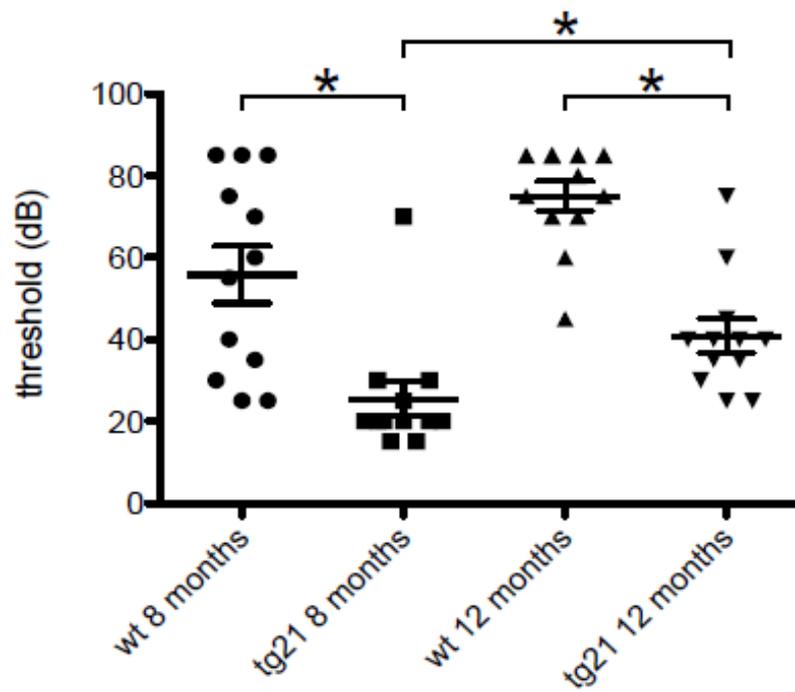
Zheng QY, Johnson KY, Erway LC (1999) Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res*. 130:94–107.

## 8. Verdankungen

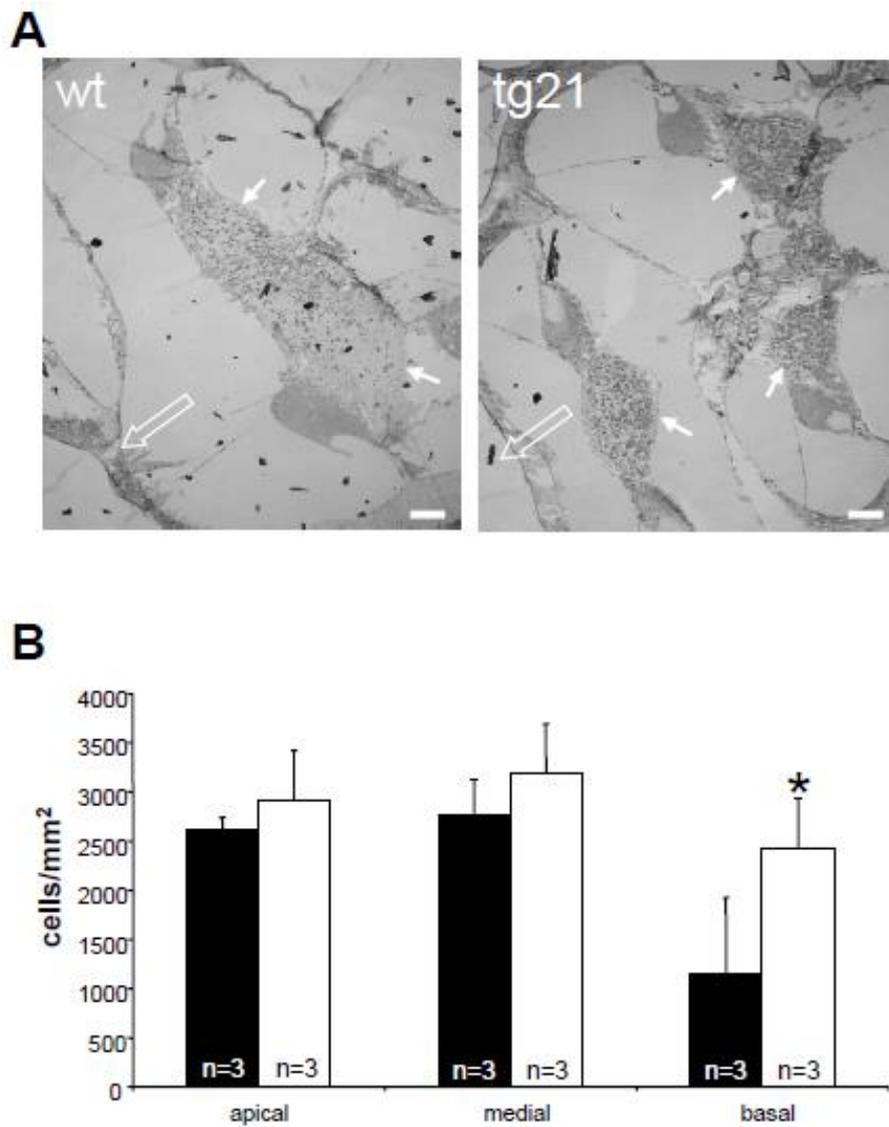
Ich möchte mich bei allen, die mir die Arbeit an meiner Dissertation ermöglichten und mich dabei unterstützten, ganz herzlich bedanken:

- Frau Dr. med. Arianne Monge Naldi, für die tatkräftige Unterstützung, die vielen Anregungen und Korrekturen.
- Herr Prof. Dr. med. Johannes Vogel, für die Versuchsanlage, die technische Unterstützung und die Lehre und Hilfe bei der Handhabung der Mäuse.
- Herr Prof. Dr. med. Rudolf Probst, für die Ermöglichung dieser Arbeit
- Meiner Familie, für die stetige Motivation.

## 9. Anhang

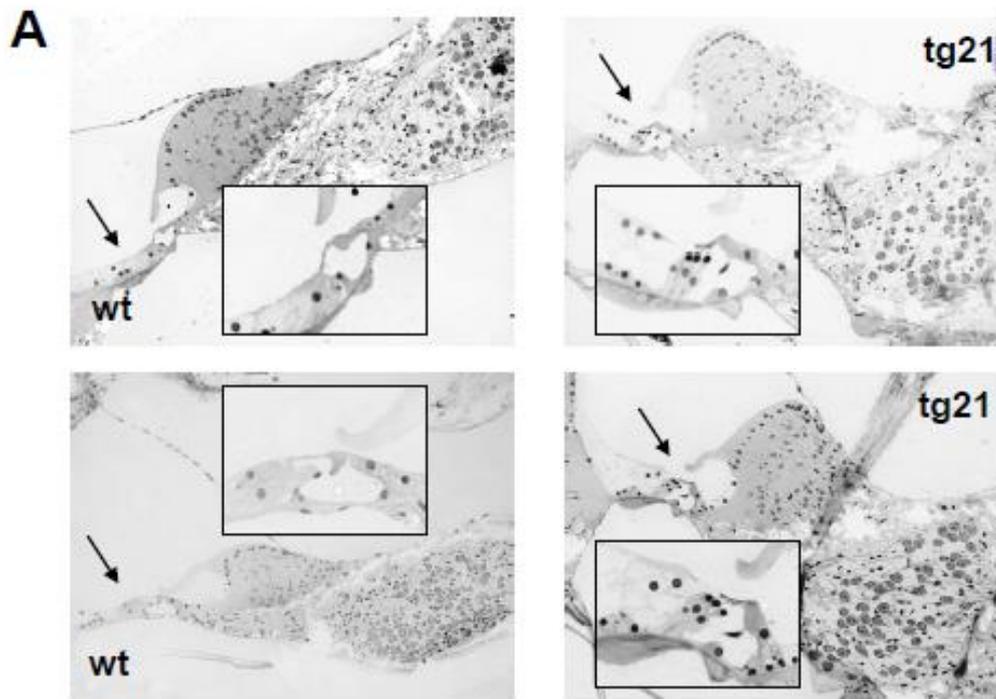


*Auditory brainstem responses (ABR)* obtained with click stimulus separately for each ear in mice at an age of 8 months and 12 months. Each dot represents the threshold of a single ear. Compared to wt mice click thresholds were significantly lower in tg21 mice at the age of 8 as well as 12 months. N = 6, Means  $\pm$  SD, \* =  $p < 0.05$ .



**A)** Histology of the spiral ganglions (arrows) of 11 months old wt (left) and tg21 mice (right). Spiral ganglion neuron density is considerably reduced in the wt mouse but preserved in the tg21 mouse despite being of the same age. Open arrows point to the apex, bar: 100 $\mu$ m.

**B)** Quantification of spiral ganglion neuron (SGN) loss in 11 months old wt (black bars) and tg21 (open bars) mice. SGN loss is more pronounced in the basal turn of the cochlea, the location of high frequencies. Means  $\pm$ SD, \* =  $p < 0.05$ ).



**B**

	IHC/OC	AHC/OC
wt	0.6	0.9
tg21	0.7	1.4 *

**A)** *Histology of the organ of Corti (arrows & insets) in the basal turn of 11 months old wt (left) and tg21 mice (right). Wt mice lack outer hair cells in the basal turn, the location of high frequencies, while the organ of Corti were quite well preserved in tg21 mice.*

**B)** *Number of inner hair cells (IHC) and outer hair cells (AHC) was counted by analyzing each organ of Corti (OC) of the whole cochlea. Aged tg21 mice have more outer hair cells in the whole cochlea when compared to wt mice. Means, \* =  $p < 0.05$*

## 10. Curriculum Vitae

Celina Ida Maria Belfrage aus Schweden

27.10.1987	Geboren in Zug ZG
1994 – 2000	Primarschule in Walchwil ZG
2000 – 2006	Kantonsschule Zug
2006	Eidg. Matura mit Schwerpunkt Biologie und Chemie
2006 – 2013	Medizinstudium an der Universität Zürich
2013	Eidg. Examen Humanmedizin an der Universität Zürich
2013 – 2014	Assistenzärztin Chirurgie, Kantonsspital Zug
2014	Assistenzärztin Arbeitsorientierte Rehabilitation, Rehaklinik Bellikon