

Aus dem Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen-,
Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der Mastzellen in der Physiologie und Pathologie der
Cochlea
The role of mast cells in the physiology and pathology of the cochlea

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Betül Karayay
aus Berlin

Datum der Promotion: 25. November 2022

Vorwort

Die in dieser Monographie dargelegten Ergebnisse bauen auf unsere Publikation „Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents“ auf, die im Oktober 2020 im Journal *Brain Sciences* veröffentlicht wurde:

Szczepek AJ, Dudnik T, **Karayay B**, Sergeeva V, Olze H and Smorodchenko A, *Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents*. Brain Sci. 2020 Oct; 10(10): 697.

Online verfügbar unter:

<https://www.mdpi.com/2076-3425/10/10/697/htm> [abgerufen am 15.05.2021].

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung	X
Abstract	XI
1. Einleitung	12
1.1. Die Mastzelle	12
1.1.1. Einführung in die Mastzellbiologie	12
1.1.2. Verteilungsmuster und Heterogenität	13
1.1.3. Aktivierungswege	14
1.1.4. Funktionen	15
1.1.5. Histamin und seine Rezeptoren im Innenohr	16
1.1.6. Die Wechselwirkung zwischen Mastzellen und Neuronen	17
1.1.7. Der Mastzellstabilisator Cromoglicinsäure	17
1.2. Das Innenohr	18
1.2.1. Allgemeine Anatomie	19
1.2.2. Neuroanatomie.....	20
1.2.3. Physiologische Prozesse	21
1.2.4. Pathologische Prozesse	22
1.3. Cisplatin und seine ototoxische Wirkung	22
1.4. Immunprivileg des Innenohrs	23
2. Zielsetzungen der Arbeit	25
3. Materialien und Methoden	27
3.1. Materialien	27
3.1.1. Laborgeräte	27
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.3. Reagenzien/Chemikalien/Puffer	30
3.1.4. Kits.....	32

3.1.5. Software.....	32
3.2. Tiere	32
3.2.1. Tierhaltung.....	32
3.2.2. C57BL/6-Cpa3-Cre; <i>Mcl-1</i> Mausmodell	33
3.3. Experimentelle Methoden am peritonealen Mastzellmodell – Vorversuche	34
3.3.1. Zellgewinnung	34
3.3.2. Zellanzahlbestimmung.....	34
3.3.3. Zellkultivierung	35
3.3.4. Zellbehandlung	35
3.3.5. Fluoreszenzfärbung	36
3.3.6. Auswertung.....	36
3.4. Experimentelle Methoden mit Cochlea-Explantaten	36
3.4.1. Vorbereitung und Präparationsvorgehen	36
3.4.2. Organotypische Kultur des sensoneuronalen Epithels und der Lateralwand	37
3.4.3. Gewebeaufarbeitung durch Formalinfixierung	38
3.4.4. Fluoreszenzfärbung von Mastzellen.....	38
3.4.5. Fluoreszenzfärbung von Haarzellen	38
3.4.6. Immunfluoreszenzfärbung von Spiral Ganglion Neuronen.....	39
3.4.7. Fluoreszenzmikroskopie.....	39
3.4.8. Behandlung der Explantate.....	40
3.4.9. Auswertung.....	42
3.5. Molekularbiologische Methoden	44
3.5.1. RNA-Isolation aus Gewebekulturen.....	44
3.5.2. Reinheit-und Konzentrationsbestimmung der RNA.....	45
3.5.3. Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	45
3.5.4. Primer	47
3.5.5. Relative Quantifizierung.....	47
3.6. Statistische Analyse	47
4. Ergebnisse.....	49
4.1. Prüfung von Cromoglicinsäure im peritonealen Mastzellmodell – Vorversuche.....	49
4.1.1. Cromoglicinsäure hemmt <i>in vitro</i> die Degranulation von peritonealen Mastzellen	49
4.2. Der Einfluss von Cisplatin auf die Cochlea-Mastzellen	52
4.2.1. Distribution der Mastzellen in Cochlea-Explantaten.....	52

4.2.2. Cisplatin führt zur Abnahme der nicht-degranulierten Cochlea-Mastzellen.....	53
4.3. Cromoglicinsäure wirkt protektiv gegen Cisplatin-induzierter Ototoxizität	57
4.3.1. Cromoglicinsäure in höheren Konzentrationen sorgt für eine Abnahme intakter Haarzellen	57
4.3.2. Bestimmung der LD ₅₀ Konzentration von Cisplatin	58
4.3.3. Cromoglicinsäure inhibiert die Cisplatin-induzierte Degranulation von Cochlea- Mastzellen.....	59
4.3.4. Cromoglicinsäure inhibiert den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust in Cochlea- Explantaten	60
4.3.5. Cromoglicinsäure inhibiert die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in Cochlea- Explantaten	63
4.4. Die Rolle des Histamin-Rezeptors in Cisplatin-induzierter Ototoxizität.....	65
4.4.1. Die Expression des Hrh1 und Hrh3 Gens wird in der Cochlea durch Cisplatin moduliert.....	65
4.4.2. Der Histamin-Rezeptor 1/3 Agonisten und Antagonisten weist einen Effekt auf die Anzahl intakter Haarzellen auf	66
4.5. Charakterisierung der Cochlea im C57BL/6-Cpa3-Cre; <i>Mcl-1</i> Mausmodell	68
4.5.1. Die Haarzellen in <i>Mcl-1</i> modifizierten Cochlea-Explantaten weisen eine physiologische Form und Anzahl auf.....	68
4.5.2. Die Anzahl und Dichte der Spiral Ganglion Neurone ist in <i>Mcl-1</i> modifizierten Cochlea-Explantaten reduziert.....	70
4.5.3. Die inneren Haarzellen werden in <i>Mcl-1</i> modifizierten Cochlea-Explantaten nicht durch Typ I Spiral Ganglion Neurone innerviert.....	73
4.5.4. Die Typ II Spiral Ganglion Neurone weisen in <i>Mcl-1</i> modifizierten Cochlea- Explantaten eine abnormale neuronale Führung auf.....	76
4.5.5. In der Lateralwand der Cochlea sind in homozygoten <i>Mcl-1</i> ^{fl/fl} Explantaten keine Mastzellen aufzufinden.....	77
5. Diskussion.....	79
5.1. Limitationen der verwendeten Methoden	80
5.2. Die Mastzellstabilisierende Wirkung von Cromoglicinsäure	81
5.3. Die Wechselwirkung zwischen Cisplatin und Cochlea-Mastzellen	82
5.4. Der protektive Effekt von Cromoglicinsäure auf Cisplatin-induzierte Ototoxizität.....	85

5.5. Der modulierende Einfluss von Cisplatin auf die Genexpression des Histamin-Rezeptors 1 und 3	87
5.6. Die Bedeutung der Cochlea-Mastzellen auf die neuronale Entwicklung im Innenohr.....	88
5.7. Schlussfolgerung und Ausblick	90
Literaturverzeichnis.....	92
Eidesstattliche Versicherung.....	104
Anteilerklärung an erfolgter Publikation.....	105
Lebenslauf.....	106
Publikationsliste	107
Danksagung.....	108
Bescheinigung Statistik	109

Abkürzungsverzeichnis

ÄHZ *äußere Haarzellen*
BDNF *brain-derived neurotrophic factor*
BM *Basilarmembran*
CP48/80 *Compound 48/80*
CS *Cromoglicinsäure*
FcεRI *Fc-epsilon-Rezeptor*
GPR35 *G-Protein gekoppelter Rezeptor 35*
Hrh1, Hrh2, Hrh3, Hrh4 *Histamin-Rezeptor H1, H2, H3, H4*
IgE *Immunglobulin E*
IHZ *innere Haarzellen*
IL *Interleukin*
IntDen *Integrated Density*
LD₅₀ *Mittlere letale Dosis*
LW *Lateralwand*
Mcl-1 *Myeloid cell leukemia sequence 1 Gen*
Mcl-1^{+/+} *Wildtyp*
Mcl-1^{+fl} *Heterozygot*
Mcl-1^{fl/fl} *Homozygot*
MZ *Mastzelle*
NF200 *Neurofilament 200*
NGF *Nerve growth factor*
OC *Corti-Organ*
PAMPS *Pathogen-assoziierte molekulare Muster*
PCMC *Peritoneale Mastzelle*
PLC *Phospholipase C*
PRR *Pattern Recognition Receptor*
ROI *Region of interest*
ROS *Reaktive Sauerstoffspezies*
RT-qPCR *Real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion*
SCF *Stammzellofaktor*
SG *Spiral Ganglion*
SGN *Spiral Ganglion Neuron*
SL *Spiral Ligament*
SV *Stria vascularis*
TKI *Tyrosin-Kinase-Inhibitor*
TLR *Toll-like Receptor*
TNF-α *Tumornekrosefaktor-α*
VEGF *Vascular endothelial growth factor*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Versuchsaufbau der Cromoglicinsäure und Cisplatin Experimente.	42
Abbildung 2 Die Behandlung mit CP48/80 bewirkt eine Senkung der Fluoreszenzintensität von PCMCs, während Cromoglicinsäure die Fluoreszenzintensität wieder ansteigen lässt.	50
Abbildung 3 Repräsentative Aufnahmen der PCMCs nach 15-minütiger Behandlung mit CP48/80 und Cromoglicinsäure.	51
Abbildung 4 Distribution der Mastzellen in unterschiedlichen Arealen der Cochlea.....	53
Abbildung 5 Repräsentative Aufnahmen der Cochlea-Mastzellen nach der Behandlung mit Cisplatin.	55
Abbildung 6 Cisplatin bewirkt eine Abnahme von nicht-degranulierten Avidin-positiven Cochlea-Mastzellen und in niedrigen Konzentrationen eine Zunahme von degranulierten Cochlea-Mastzellen.	56
Abbildung 7 Cisplatin bewirkt eine Reduktion der Cochlea-Mastzellen bei höheren Konzentrationen.	56
Abbildung 8 Cromoglicinsäure bewirkt in hohen Konzentrationen eine Reduktion der intakten Haarzellen.....	58
Abbildung 9 Dosis-Wirkungs-Kurve von Cisplatin in Abhängigkeit zum prozentuellen Anteil intakter Haarzellen.	59
Abbildung 10 Cromoglicinsäure verhindert die Cisplatin-induzierte Degranulation von Cochlea-Mastzellen.	60
Abbildung 11 Cromoglicinsäure wirkt protektiv gegen den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust.	62
Abbildung 12 Repräsentative Aufnahmen der Haarzellen mit den unterschiedlichen Behandlungskonzepten.....	63
Abbildung 13 Die Vorbehandlung der Cochlea-Explantate mit 25 μ M Cromoglicinsäure führt zu einer Zunahme der SGN Dichte.	64
Abbildung 14 Relative Expression des Hrh1 und Hrh3 Gens nach der Behandlung mit 15 μ M Cisplatin.	66
Abbildung 15 Der Einfluss des Hrh1/3 Agonisten und Antagonisten auf den prozentuellen Anteil intakter Haarzellen.	67
Abbildung 16 Repräsentative Aufnahmen der Haarzellen in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/η} und Mcl-1 ^{η/η} modifizierten Cochlea-Explantaten.....	69

Abbildung 17 Die Anzahl intakter Haarzellen je 100 μm in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	69
Abbildung 18 Repräsentative Aufnahmen der SGN in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	71
Abbildung 19 Quantifizierung der SGN in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	72
Abbildung 20 Die relative Dichte der SGN in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	73
Abbildung 21 Repräsentative Aufnahmen der verkürzten Typ I SGN in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	75
Abbildung 22 Quantifizierung der Typ I SGN Länge in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	76
Abbildung 23 Repräsentative Aufnahmen der Typ II SGN in Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.	77
Abbildung 24 Quantifizierung der Mastzellen in der Lateralwand von Mcl-1 ^{+/+} , Mcl-1 ^{+/fl} und Mcl-1 ^{fl/fl} modifizierten LW Explantaten.	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper.	40
Tabelle 2 Reaktionsansätze.	46
Tabelle 3 Zeit-und Temperaturschema.	46
Tabelle 4 Verwendete Primer.	47

Zusammenfassung

Das Innenohr galt lange Zeit als immunprivilegiertes Organ, was der Blut-Labyrinth-Schranke und dem Fehlen klassischer Lymphabflusswege zugeschrieben wurde. In den vergangenen Jahrzehnten wurden zunehmend Wechselwirkungen zwischen dem Innenohr und dem Immunsystem untersucht. Im Jahr 2020 veröffentlichte das HNO-Forschungslabor der Charité als erstes weltweit die Entdeckung residenter Mastzellen in der Cochlea von Nagetieren. Die Funktion dieser Mastzellen blieb jedoch unbekannt. Somit erschließt das Ziel dieser Arbeit eine umfassende Untersuchung der Cochlea-Mastzellen im Kontext von physiologischen und pathologischen Prozessen der Cochlea. In der vorliegenden Arbeit wurden explantierte Cochleae, die von p3-p5 alten C57BL/6-Mäusen seziiert wurden, als Modell verwendet, um die Rolle von Mastzellen in der Cisplatin-induzierten Ototoxizität zu untersuchen. So konnte beobachtet werden, dass nach der Zugabe von Cisplatin (15 μ M) die Cochlea-Mastzellen in den Explantaten degranulierten, was mit fluoreszenzmarkiertem Avidin sichtbar gemacht wurde. Der Mastzellstabilisator Cromoglicinsäure (5 μ M und 25 μ M) verhinderte die Degranulation der Mastzellen und den Haarzellverlust. Darüber hinaus modulierte Cisplatin (15 μ M) das Expressionsverhalten des Histamin-Rezeptors 1 (H1) und 3 (H3) auf mRNA-Ebene, was zu einer Hochregulierung als auch Herunterregulierung der Rezeptorexpression im Corti-Organ, der Lateralwand und dem Modiolus führte. Zusätzlich bewirkte die Zugabe des H1- und H3-Agonisten sowie des H3-Antagonisten eine Reduktion der intakten Haarzellen. Unter Zuhilfenahme eines Mastzell-Defizienten Mausmodells (C57BL/6-Cap3-Cre; *Mcl-1*) wurden die Funktionen von cochleären Mastzellen untersucht. In heterozygoten und homozygoten Mäusen wurde eine auffallend reduzierte Dichte an Spiral Ganglion Neuronen nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl innerer Haarzellen nicht durch Typ I Spiral Ganglion Neurone innerviert wurden, da sie ersichtlich kürzer erschienen als in den Wildtyp-Tieren. Auch konnte eine fehlerhafte neuronale Führung der Typ II Spiral Ganglion Neuronen beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vorstellung, dass in der Cochlea residente Mastzellen durch Induktion der Mastzelldegranulation und Modulation der H1- und H3-Expression zur Cisplatin-vermittelten Ototoxizität beitragen. Darüber hinaus scheint die Anwesenheit von Mastzellen erforderlich für die ordnungsgemäße Innervation der äußeren und inneren Haarzellen in sich noch entwickelnden murinen Cochlea zu sein. Die Erkenntnisse in dieser Arbeit sollen eine Grundlage für die Aufdeckung neuer Interaktionen zwischen den residenten Immunzellen und der Cochlea-Physiologie schaffen.

Abstract

The inner ear was long considered an immune-privileged organ, attributed to the blood-labyrinth barrier and the lack of lymphatic drainage pathways. In the past few decades, interactions between the inner ear and the immune system have increasingly been studied. In 2020, the ENT-Research Laboratory of the Charité was the first in the world to publish the discovery of resident mast cells in the cochlea of rodents. However, the function of mast cells in the inner ear remains unknown. Thus, this work aimed to investigate the function of cochlear-mast cells in the context of physiological and pathological processes of the cochlea. In the present study, explanted murine cochleae dissected from p3 – p5 C57BL/6 mice were used as a model to investigate the role of mast cells in cisplatin-induced ototoxicity. Upon addition of cisplatin (15 μ M) to the explants, cochlear mast cells degranulated, which was visualized using fluorescently labeled avidin. The mast cell-stabilizer sodium cromoglycate (5 μ M and 25 μ M) prevented mast cell degranulation and auditory hair cell death. Furthermore, cisplatin (15 μ M) modulated the expression of histamine receptors 1 (H1) and 3 (H3) on the mRNA level, leading to down- and upregulation of H1 and H3 in the organ of Corti, lateral wall and modiolus of the cochlea. The addition of H1- and H3 agonists as well as the H3 antagonist to the cochlear explants led to reduced intact hair cells. Lastly, the function of cochlear mast cells was examined in the mast cell-deficient pups (C57BL/6-Cap3-Cre; *Mcl-1*). Strikingly reduced density of spiral ganglion neurons was demonstrated in heterozygous and homozygous mice. In addition, a large number of inner hair cells were not innervated by type I spiral ganglion neurons, which were present in the cochlea but were shorter than in the wild-type animals. Finally, incorrect neural guidance of type II spiral ganglion neurons could also be observed. Presented research supports the notion about cochlear resident mast cells contributing to the cisplatin-mediated ototoxicity via induction of mast cell degranulation and modulation of H1 and H3 expression. In addition, the presence of mast cells in the developing murine cochlea seems to be required for the development of proper innervation of the outer and inner hair cells. The novel findings of the presented research are expected to create a base for uncovering new interactions between the resident immune cells and cochlear physiology.

1. Einleitung

1.1. Die Mastzelle

Dr. Friedrich von Recklinghausen stellte 1863 erstmalig eine bis dahin noch unbekannte granulierten Zellmasse in den Hornhäuten von diversen Tierarten fest (1). Ungefähr ein Jahrzehnt verging, bis Waldeyer diese granulierten Zellmasse in „embryonale Zellen des Bindegewebes“ einteilte und eine detailgetreue Veranschaulichung der heute bekannten Mastzelle (MZ) veröffentlichte (2). Allerdings gelang es erst Paul Ehrlich 1878, der eigentliche Namensgeber der „Mastzelle“, diese Zellen hinsichtlich ihrer „gemästeten“ metachromatischen Färbeeigenschaft näher zu charakterisieren (3, 4). Die Tragweite dieser Entdeckung war keinem dieser Forscher bewusst, denn heutzutage gilt die MZ als die Induktorzelle für allergische Reaktionen. Allerdings wird die Rolle der MZ im Kontext der Allergie nicht seinem eigentlichen Potenzial gerecht (5, 6). Auch ihre Interaktion in entzündlichen Abläufen (7, 8) und ihre Funktion während der Immunantwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems (9) konnten bereits detailliert beschrieben werden. Obwohl mehr als ein Jahrhundert seit der Entdeckung der MZ vergangen ist, bestehen weiterhin Unklarheiten hinsichtlich der eigentlichen Rolle der MZ in physiologischen und pathologischen Prozessen des Organismus. Das Bemühen unterschiedlicher Forschungsgebiete, diese essenziellen Fragen auf den Grund gehen, spiegelt die Komplexität der Mastzellforschung wider.

1.1.1. Einführung in die Mastzellbiologie

Die MZ stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab (10, 11). Im Gegensatz zu anderen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, die im Knochenmark differenzieren und reifen, gelangen MZ als undifferenzierte Vorläuferzellen durch die Blutstrombahn ins periphere Gewebe, wo sie ihre Reifung abschließen (12, 13). Die eigentliche Zelldifferenzierung findet unter dem Einfluss von lokalen Stammzellwachstumsfaktoren (SCF) und verschiedenen Zytokinen statt (14, 15). Dabei stimuliert der SCF die Proliferation und Differenzierung von MZ, initiiert die Chemotaxis und sichert deren Überleben (16, 17). Hierfür bindet der SCF an den c-kit-Rezeptor (CD117), der einen transmembranen Tyrosin-Kinase-Rezeptor darstellt (18). Neben dem Einfluss des SCF ist die Entdifferenzierung der MZ auch von Interaktionen mit T-Zellen und Fibroblasten (19) sowie Interleukin (IL) 3 und 4 abhängig (20, 21).

Einleitung

Die in den unterschiedlichen Geweben stattfindende Differenzierung zeichnet sich dadurch aus, dass durch den Stimulus und dessen Konzentration die MZ phänotypisch, funktionell und in der Zusammensetzung der Mediatoren moduliert werden können (20, 22). Auch kann die Anzahl der MZ im Gewebe nicht als fixe Größe betrachtet werden. So identifizierte Takagi et al. (1990), dass die MZ-Anzahl in Abhängigkeit zur IL-4 Konzentration anstieg (23). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass im Thymus von Mäusen Vorläufer-MZ vorhanden sind, die *in vitro* differenzieren und heranreifen können (24, 25).

Die ausdifferenzierte, ubiquitär im Gewebe vorkommende 6 - 17 µm große MZ lässt sich durch ihre zahlreichen Granula sehr gut von anderen Zellen abgrenzen (15). Diese Granula beinhalten eine Vielzahl von Mediatoren, dessen Einteilung in zwei Kategorien erfolgt (15, 26). 1. Die präformierten Mediatoren, zu denen Histamin, Heparin, Sulfatasen, Serinproteasen und Zytokine gehören, liegen bereits in den Granula vor und müssen nach einem erfolgten Stimulus nicht synthetisiert werden, was eine schnelle und effiziente Sofortreaktion initiiert (27, 28). 2. Die *de novo* Mediatoren, zu denen Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane zählen, werden nach einem Stimulus neu synthetisiert und können dementsprechend erst zu einem späteren Zeitpunkt sezerniert werden (27, 28). Als weiterer sehr spezifischer Marker der MZ gilt der membranständige, hochaffine Fcε-Rezeptor (FcεRI) und der c-Kit-Rezeptor (29). Angesichts des FcεRI wird die MZ als eine der Schlüsselzellen bei der Initiierung allergischer Reaktionen betrachtet, die durch die Quervernetzung des FcεRI eine Aktivierung der MZ einleitet und folglich zur Freisetzung von präformierten Granula führt (30, 31). Abschließend lässt sich festhalten, dass die MZ eine heterogene Zellpopulation darstellt, dessen Differenzierung von vielen Faktoren abhängig ist (32).

1.1.2. Verteilungsmuster und Heterogenität

Die MZ ist eine langlebige Zelle, die in der Dermis von Wistar Ratten bis zu 12 Wochen überleben kann (33). Sie ist in nahezu allen Geweben des Körpers vorzufinden, priorisiert jedoch in den Organen, die eine Grenzfläche zur Umwelt darstellen (34-36). Aufgrund dieser Lokalisation wird die MZ als erste Instanz zu Bekämpfung von eindringenden Pathogenen oder anderweitigen Einflüssen gesehen. Diese strategische Verteilung sorgt für eine schnelle Reaktion in Form von Mediatorfreisetzung und Rekrutierung von Immunzellen an den Ort des Geschehens (36, 37). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die MZ sich vermehrt in unmittelbarer Umgebung von Blutgefäßen und Nervenfasern befinden (26, 38). Wie schon angeführt, lässt sich innerhalb der MZ-Population keine homogene Morphologie beschreiben (32, 39).

Einleitung

Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflussen die Differenzierung und Reifung von MZ und tragen folglich zum Phänotyp der MZ bei, was eine direkte Folge ihres ubiquitären Aufkommens ist (32, 39, 40). Dementsprechend weisen die MZ eine diverse Heterogenität auf, die sich nicht nur morphologisch, sondern auch in der Zusammensetzung der Mediatoren voneinander unterscheiden lässt (32, 39, 41, 42). So wurden Subtypen der reifen MZ auf der Grundlage ihrer Verteilung und ihrer funktionellen und biochemischen Eigenschaften beschrieben (41, 42). Hierbei erfolgt die Einteilung der MZ-Subtypen anhand des Speicherungsmusters von Tryptase und Chymase (41, 42). Die Heterogenität der MZ, die sich sowohl in den vielfältigen Aktivierungswegen als auch in der Vielzahl gespeicherten und freigesetzten Mediatoren widerspiegelt, ermöglicht eine Reihe von Reaktionen, die die MZ initiieren kann.

1.1.3. Aktivierungswege

Durch die Expression zahlreicher Oberflächenrezeptoren besitzt die MZ die Fähigkeit, auf diverse Pathogene und Umwelteinflüsse mit einer Aktivierung zu reagieren (15, 26). Hierbei leitet diese Aktivierung entweder eine klassisch anaphylaktische Reaktion ein, wobei der gesamte Granulainhalt in den Extrazellularraum sezerniert wird, oder sorgt für eine *de novo* Synthese von Mediatoren (15). Dabei kann eine Degranulation innerhalb von Sekunden bis hin zu Minuten nach Antigenkontakt erfolgen (15, 43). Der wohl am akribischsten studierte Aktivierungsweg stellt die Kreuzvernetzung des hochaffinen Immunglobulin-E (IgE) Rezeptors Fc ϵ RI dar, dessen Mechanismus im Rahmen von allergischen Reaktionen detailliert charakterisiert wurde (30, 31). Das Fc-Fragment des IgE-Antikörpers liegt gebunden an der α -Untereinheit des Fc ϵ RI vor (44, 45). Erst durch die Bindung eines Allergens an das gebundene IgE, wird die Vernetzung des Rezeptors initiiert, was eine intrazelluläre Kaskade in den Gang setzt und folglich zur Degranulation der MZ führt (44, 45). Für die direkte Wahrnehmung von Pathogenen exprimieren MZ auf ihrer Zelloberfläche sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), zu denen die Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) gezählt werden (46-50). Diese Rezeptoren werden durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPS), die auf der Zelloberfläche von Pathogenen lokalisiert sind, aktiviert (50, 51). Die direkte Wechselwirkung zwischen PAMPs und dem spezifischen PRR induziert die Aktivierung von MZ und die Freisetzung selektiver Mediatoren (50).

Einleitung

Hierbei variiert die MZ-Antwort je nach aktivierendem PAMP. So führt eine Stimulation am TLR4 durch Lipopolysaccharide nicht zur Degranulation, sondern zu Synthese von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-6, IL-13 und IL-1 β (49). Auch diverse andere Stimuli wie endogene Peptide (Substanz P (52), Endothelin 1 (53)), synthetisch hergestellte Verbindungen (Compound 48/80 (CP48/80 (54-56)) und physikalische Reize (57) können MZ aktivieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Cisplatin, ein gängiges Chemotherapeutikum, welches zur Behandlung verschiedener Krebsarten verwendet wird, die Aktivierung von MZ induzieren kann (58). Das Polymer CP48/80, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Stimulation von peritonealen MZ (PCMC) eingesetzt wurde, bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, was die Freisetzung von Histamin initiiert (55, 56). Die Aktivierung des G-Proteins induziert eine Signalkaskade, die in den MZ zum intrazellulären Anstieg der Ca²⁺-Konzentration führt (55, 56), was in allen Aktivierungsmechanismen eine essenzielle Voraussetzung zur Degranulation darstellt (59). Zusätzlich besitzen MZ die Fähigkeit, entleerte Granula während oder nach der Immunantwort aufzufüllen und erneut zu degranulieren (60).

1.1.4. Funktionen

Die Heterogenität der MZ und die damit verbundene Variabilität der Mediatorprofile dieser Zellen lässt ein weites Feld an MZ-Funktionen erahnen. Durch die Diversität und Quantität der Mediatoren werden physiologische Reaktionen nicht nur aufrechtgehalten, sondern auch pathologische Abläufe initiiert (15, 26). Ihre ubiquitäre Präsenz in nahezu allen Geweben versetzt die MZ in die privilegierte Position, als erste Instanz des Immunsystems zu fungieren und an diversen biologischen Prozessen teilnehmen zu können (15, 26, 61).

Neben der bereits aufgeführten Funktion der MZ in der IgE-vermittelten allergischen Sofortreaktion wird der MZ zusätzlich eine Rolle beim Bindegewebsumbau und Beteiligung am Wundheilungsprozess attestiert (62). Dabei induziert der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) sowie Histamin und Tryptase die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten (63). Im Rahmen des angeborenen Immunsystems sind MZ zusätzlich für die Rekrutierung von Immunzellen durch chemotaktisch wirkende Mediatoren (CCL11, CXCL8) verantwortlich (64).

Einleitung

Angesichts der Freisetzung von Histamin und anderen proinflammatorischen Zytokinen übernimmt die MZ eine weitere entscheidende Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (65, 66) und Urtikaria (67). Durch die Fähigkeit der MZ angiogene Mediatoren wie Angiopoietin-1, VEGF, IL-8, TGF- β , TNF- α , Histamin, Heparin, Tryptase und Chymase zu sezernieren, ist eine Beteiligung der MZ im Prozess der Angiogenese unumstritten (68). Demnach wird der MZ auch eine Funktion bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren zugeschrieben (69). So konnte beobachtet werden, dass MZ einer der ersten Zellen sind, die Tumore infiltrieren und an Mikrogefäßen akkumulieren (69). Die Verteilung der MZ in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes führte zur Annahme, dass Immunzellen und ihre Mediatoren eine Rolle bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielen könnten (70, 71).

Die hier gelisteten Funktionen stellt nur eine kleine Auswahl der teilweise noch ungeklärten Aufgaben der MZ dar. Dennoch zeigt diese exemplarische Auflistung, dass die MZ aus heutigem Wissen als multifunktionale Immunzelle, die an verschiedenen physiologischen Zuständen und pathologischen Prozessen beteiligt ist, angesehen wird.

1.1.5. Histamin und seine Rezeptoren im Innenohr

Die Aktivierung von MZ führt zur Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren, zu denen auch Histamin gehört (15, 26). Histamin ist ein biogenes Amin, welches durch die Decarboxylierung mit Histidindecaboxylase aus L-Histidin synthetisiert wird und hauptsächlich in MZ und basophilen Granulozyten gespeichert vorkommt (15, 72, 73). Zu den verschiedenen Wirkungen von Histamin gehören Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Erhöhung der Kapillarpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskulatur (74). Histamin wirkt an derzeit vier bekannten Rezeptoren, die als Histamin H1-, H2-, H3- und H4- Rezeptoren (Hrh1, Hrh2, Hrh3, Hrh4) bezeichnet werden (75). Alle vier Histamin-Rezeptoren stellen ein heptahelikales Membranprotein dar, welches intrazellulär an ein G-Protein gekoppelt ist (75). So bewirkt die Interaktion von Histamin an dem Hrh1 die Kontraktion der glatten Muskulatur, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Erregung sensorischer Nervenenden (72, 76). Über den Hrh2 initiiert Histamin die Magensäuresekretion und die Relaxierung der glatten Gefäßmuskulatur (72, 76). Die Interaktion zwischen Histamin und dem Hrh3 hemmt die Histaminsynthese und Histaminfreisetzung (76, 77), während die Aktivierung des Hrh4 die Chemotaxis von MZ und eosinophilen Granulozyten bewirkt (78, 79). Die Lokalisation aller vier Histamin-Rezeptoren konnte in der Cochlea von Mäusen beobachtet werden (80).

Einleitung

Von Relevanz für diese Arbeit waren die Rezeptoren Hrh1 und Hrh3, die sich an den äußeren (ÄHZ) und inneren Haarzellen (IHZ) des Corti-Organs (organ of corti, OC) sowie an den Spiral Ganglion (SG) der Cochlea identifizieren ließen (80).

1.1.6. Die Wechselwirkung zwischen Mastzellen und Neuronen

Die Lokalisation der MZ an Nervenenden wurde in diversen Geweben bereits beschrieben (81). So gelangen undifferenzierte MZ-Vorläufer während der Embryonalentwicklung ins zentrale Nervensystem, wo sie im Thalamus, Hypothalamus, an den Meningen und an der Blut-Hirn-Schranke aufzufinden sind (82). Diese unmittelbare Lokalisation der MZ um Neurone lassen eine neuroimmune Wechselwirkung vermuten. Dabei lässt sich innerhalb des somatosensorischen Systems eine repräsentative Funktionseinheit zwischen MZ und Nerven erfassen (83). So führt die Aktivierung von MZ zur Sensibilisierung von Nozizeptoren und trägt somit unmittelbar zur Schmerzempfindung bei (83). In den sensorischen Neuronen wird eine Signalkaskade eingeleitet, die die Freisetzung von Substanz P und Calcitonin-Gen-verwandtem Peptid initiiert (84). Diese Peptide führen im Umkehrschluss zu einer weiteren Aktivierung von MZ, was wiederum die Vasodilatation erhöht und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen induziert (85, 86). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass das von MZ stammende Serotonin zur Neurogenese und Aufrechterhaltung von physiologischen Funktionen des Hippocampus benötigt wird (82, 87). Ferner wurde beschrieben, dass PCMCs aus Ratten die Eigenschaft besitzen, biologisch aktives NGF zu synthetisieren, zu speichern und zu sezernieren (88). NGF gehört zu den neurotrophen Proteinen, die zur Familie der Neurotrophine gezählt werden, wie auch das aus dem Gehirn stammende neurotrophe Faktor (BDNF), Neurotrophin-3 und Neurotrophin-4 (89, 90). Die Neurotrophine sind essenziell für die Differenzierung und das Wachstum peripherer und zentraler Neurone im sich entwickelnden Nervensystem und tragen zur Aufrechterhaltung von Neuronen im reifen Nervensystem bei (88, 91).

1.1.7. Der Mastzellstabilisator Cromoglicinsäure

Wie bereits beschrieben besitzt die MZ die Fähigkeit, auf diverse Stimuli mit einer Aktivierung zu reagieren, die zur Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren gipfelt, was wiederum zu einer lebensgefährlichen Anaphylaxie führen kann (92).

Einleitung

Die Sezernierung von Histamin, Tryptase, Carboxypeptidase A3 und Proteoglykane, die Synthese von Arachidonsäure Metaboliten (Prostaglandine, Leukotriene) sowie die Freisetzung von Zytokinen (TNF- α) und Chemokinen leiten den Prozess einer Anaphylaxie ein und halten diesen aufrecht (92, 93). Um diese MZ-Aktivierung und anschließende Degranulation zu unterbinden, wurden Mastzellstabilisatoren entwickelt (94). Cromoglicinsäure (CS) zählt zu den ersten therapeutisch eingesetzten Mastzellstabilisatoren, die zur Wirkstoffgruppe der Cromone gehören (94, 95). Sie werden zur Unterbindung von Entzündungsmechanismen bei allergischem Asthma bronchiale, Mastozytose und allergischer Konjunktivitis angewendet (94, 95). Zusätzlich hemmt CS die Degranulation von zerebralen MZ und verbessert die kognitive Funktion nach hypoxisch-ischämischen Hirnschäden (96). So verdeutlichte Kempuraj et al. (2020), dass die Vorbehandlung von Mäusen mit CS vor schwerwiegenden Hirnschäden induziert durch akute traumatische Verletzungen schützen kann (97). Infolgedessen konnte dem Mastzellstabilisator eine neuroprotektive Wirkung bei Neuroinflammationen und Neurotraumata zugeschrieben werden (97, 98). Darüber hinaus soll CS die Expression von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL3 und MCP1 reduzieren (99).

Wie bereits angeführt stellt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration einer der Hauptfaktoren dar, die die Degranulation von MZ initiiert (59, 100). Daher wurden Medikamente entwickelt, die die Dynamik des Ca²⁺ in den MZ beeinflussen sollen. Durch die membranstabilisierende Wirkung von CS wird angenommen, dass die MZ-Membran undurchlässiger für Ca²⁺ wird, was die Degranulation von MZ hemmen soll (54). Der eigentliche Wirkungsmechanismus von CS konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden. Es wird vermutet, dass CS ein selektiver Agonist des G-Protein gekoppelten Rezeptors 35 (GPR35) sei, der durch die Bindung eines spezifischen Liganden die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung moduliert (101, 102). Der GPR35 ist durch eine siebenfache transmembrane Helix charakterisiert und wird an der Zelloberfläche diverser Immunzellen, zu denen vor allem die MZ gehören, exprimiert (101-104). Aufgrund der Expression des GPR35 auf den MZ wird vermutet, dass dieser Rezeptor an Histamin-vermittelten Immunantworten beteiligt sei (105).

1.2. Das Innenohr

Das Innenohr ist ein hochkomplexes Organ, was zwei essenzielle Sinnesorgane beherbergt: Das Hörorgan und das Vestibularorgan.

Einleitung

Im Hörorgan wird durch die Transduktion von mechanischen Reizen in elektrische Impulse das Hören gewährleistet, während die Steuerung des Gleichgewichtes im Vestibularorgan ermöglicht wird (106-110). Somit stellt das Innenohr eine Schnittstelle für die aktive Teilnahme am sozialen Leben dar (111).

1.2.1. Allgemeine Anatomie

Das Innenohr befindet sich im Felsenbein und wird anatomisch-topografisch in das cochleäre Labyrinth und das vestibuläre Labyrinth eingeteilt (108, 112). Zusätzlich wird histologisch-strukturell zwischen einem membranösen Labyrinth und einem knöchernen Labyrinth differenziert (108, 112). Das knöcherne Labyrinth stellt ein Gangsystem im Felsenbein dar, welches sich aus der Cochlea, dem ovalen Fenster und dem runden Fenster zusammensetzt (110). Der membranöse Anteil ist in das knöcherne Labyrinth eingebettet und wird mit Perilymphe und Endolymphe durchströmt (110). Die Zusammensetzung der Perilymphe weist einen hohen Natrium- und einen geringen Kaliumanteil auf, während die Endolymphe sich durch einen deutlich höheren Kaliumanteil und einen niedrigen Natriumanteil auszeichnet (113, 114). Dementsprechend herrscht zwischen den beiden Flüssigkeiten ein Ionengradient, der sich als endocochleäres Potenzial (80 mV) im endolymphatischen Raum gegenüber dem perilympathischen Raum ersichtlich macht (113, 114). Dieses endocochleäre Potenzial ist die Hauptantriebskraft für die Entstehung einer sensorischen Transduktion (113, 114). Die Cochlea windet sich 2,5-mal um seine eigene knöcherne Achse, die Modiolus bezeichnet wird (110). Im Modiolus sind die Perikaryon des 1. Neurons des auditorischen Systems sowie Fasern des N. cochlearis eingebettet (110). Die membranöse Struktur innerhalb der Cochlea wird in drei Gänge eingeteilt: Scala vestibuli (mit dem ovalen Fenster der Cochlea verbunden), Scala tympani (endet am runden Fenster der Cochlea) und Ductus cochlearis (108, 110). Sowohl die Scala vestibuli als auch die Scala tympani beinhalten Perilymphe und verlaufen oberhalb und unterhalb des Ductus cochlearis, der wiederum mit Endolymphe gefüllt ist (108, 110). Der Ductus cochlearis wird apikal durch die Reissner-Membran und basal durch den Knochenkamm (Lamina spiralis ossea) und der Basilarmembran (BM) begrenzt (108, 110). Die Lamina spiralis ossea besteht aus zwei Lamellen, in denen die Nervenfasern zum OC ziehen (108, 110). Ein Anteil des Limbus spiralis befindet sich an dem inneren Winkel des Ductus cochlearis und enthält Interdentalzellen, die die Tektorialmembran bilden (110). Die BM nimmt von der Schneckenbasis bis hin zur Schneckenspitze an Breite zu und besteht aus Kollagenfibrillen, die in der Extrazellulärmatrix eingebettet sind (110).

Einleitung

Die Lateralwand (LW) des Ductus cochlearis wird durch das Spiral Ligament (SL) und der Stria vascularis (SV) gebildet (110). Die SV ist durch ein sehr gefäßreiches und mehrschichtiges, prismatisches Epithel charakterisiert, was die Produktion von Endolymphe und zur Aufrechterhaltung des endocochleären Potenzialsverantwortlich ist (106, 109, 110, 113, 114). Das OC stellt das sensorische Epithel des Innenohrs dar und befindet sich im Ductus cochlearis auf der BM (106, 109, 110). Apikal wird das OC durch die gallertartige Tektorialmembran bedeckt (106, 109, 110). Eingebettet in verschiedenen Typen von Stützzellen befinden sich die Sinneszellen, die sogenannten Haarzellen (106, 109, 110). Wichtige Vertreter der Stützzellen sind die Phalangenzellen, die in 3-5 Reihen angeordnet sind und mit ihren Zellausläufern nach apikal hin eine horizontale Platte formen, in der die ÄHZ eingebettet sind (106, 109, 110). Aus dieser Platte schauen die Stereozilien der ÄHZ heraus (106, 109, 110). Zusätzlich werden die IHZ durch die Phalangenzellen kelchartig umschlossen (106, 109, 110). Die IHZ und ÄHZ besitzen an ihrem apikalen Zellpol ca. 50-100 Stereozilien, die eine Länge von 4–8 μm aufweisen und aufgrund ihrer zahlreich vernetzten Aktinfilamente steife Mikrovilli darstellen (110). Die Stereozilien sind v-förmig angeordnet, wobei die Länge der Stereozilien treppenförmig zunimmt und die längste Stereozilie der ÄHZ mit Tip-Links an der Tektorialmembran verbunden ist (110). Diese Tip-Links befinden sich in enger Nachbarschaft zu Kationenkanälen, die für die Signaltransduktion von besonderer Bedeutung sind (110, 115). Die Stereozilien der IHZ erreichen die Tektorialmembran nicht und sind für die Erregung der sensorischen Neurone des N. cochlearis verantwortlich (110).

1.2.2. Neuroanatomie

Die Haarzellen werden sowohl von afferenten als auch efferenten Nervenfasern innerviert. Die afferenten Nervenfasern stammen aus den SG des VIII. Hirnnervs ab, während die efferenten Fasern aus dem Hirnstamm entspringen. Die SG sind innerhalb des Modiolus lokalisiert und setzen sich aus bipolaren Nervenzellen zusammen, die über die Lamina spiralis ossea an die Haarzellen gelangen (116). Die Spiral Ganglion Neurone (SGN) verlaufen durch den inneren Tunnel der Cochlea und besitzen nach dem Durchtritt durch die Habenula perforata keine Myelinscheide mehr. Es wird zwischen zwei SGN-Subtypen unterschieden, die sich durch ihre Morphologie, Anzahl, synaptischen Ziele und Innervationsmuster voneinander differenzieren lassen (117, 118). Die myelinisierten Typ I SGN machen ungefähr 90-95 % der SGN aus (117, 118).

Einleitung

Während der Embryonalentwicklung projizieren die Typ I SGN auf beide Haarzelltypen, ziehen sich jedoch aus der ÄHZ-Region und aus benachbarten IHZ zurück, um eine unverzweigte Verbindung mit einer einzelnen IHZ einzugehen (117, 118). In Maus-Cochleae wurde beschrieben, dass jede einzelne IHZ von insgesamt 6-20 Typ I SGN innerviert wird (119). Die Typ I SGN sind für die Weiterleitung der elektrischen Impulse verantwortlich (117, 118). Die unmyelinisierten Typ II SGN machen dahingegen nur 5-10 % der gesamten SGN aus (117, 118). Die Typ II SGN verlieren während der Embryonalentwicklung jeglichen Kontakt zur IHZ-Reihe und wenden sich ausschließlich zur Cochlea-Basis, was die Expression des Transkriptionsfaktors Prox1 erfordert (120). Darüber hinaus verfünffacht sich ihre Faserlänge, was eine *en passant* synaptische Verbindung mit 5 bis 30 ÄHZ (in Mäusen) ermöglicht (121, 122). Somit wird jede ÄHZ von 2-5 Typ II SGN innerviert (121, 122). Die Typ II SGN übernehmen die Eigenschaft des "Cochlea-Verstärkers", indem sie die Schallübertragung verbessern (123).

Es lässt sich zusammenfassend darstellen, dass die Voraussetzung für die Funktion des auditorischen Systems die Wechselwirkung zwischen zwei neurosensorischen Geweben erfordert: Das OC mit den sensorischen Haarzellen, die durch die ortsspezifische Aktivierung zur Wahrnehmung von bestimmten Frequenzen führt, und die SGN, die diese ortsspezifische Aktivierungen der Haarzellen auf die Neurone des VIII. Hirnnervs überträgt.

1.2.3. Physiologische Prozesse

Um ein Verständnis für die physiologischen Prozesse im auditiven System zu erlangen, ist anatomisches Wissen über die Cochlea von besonderer Bedeutung. Die Umwandlung von mechanischen Reizen in elektrische Impulse dient zur Schallwahrnehmung (109, 124). Hierbei beginnt der Prozess der auditorischen Transduktion mit den Schallwellen, die über den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell treffen und diese in Vibrationen versetzen (109, 124). Diese Schwingungen werden entlang der Gehörknöchelchenkette, die aus Malleus, Incus und Stapes besteht, auf das ovale Fenster der Cochlea übertragen (109, 124). Folglich kommt es zur Schwingung der Perilymphe in der Scala vestibuli (109, 124). Die übertragene Schallenergie versetzt die BM in Schwingung, die die Haarzellen stimulieren und somit zur Bildung von afferenten Impulsen führt (109, 124). Hierbei übernehmen die Haarzellen eine wichtige Rolle. Die IHZ sind Zellen, die mit Typ I SGN in Verbindung stehen und afferente Impulse über den N. cochlearis an den auditiven Cortex weiterleiten (109, 124, 125). Durch mechanisch gesteuerte Kaliumkanäle an der Spitze der Stereozilien, die sich als Reaktion auf die Vibrationen öffnen, werden die afferenten Nervenimpulse gebildet (109, 124, 125).

Einleitung

Die ÄHZ erhöhen die maximale Amplitude der sich bewegenden Schwingungswelle, während efferente Nervenfasern aus dem Hirnstamm diesen Prozess entgegenwirken können (109, 124, 125). Die Frequenz dieser Schwingung entspricht einem Bereich entlang der BM, der maximal stimuliert wird, während hohe Frequenzen an der Basis und niedrige Frequenzen an der Spitze der Cochlea wahrgenommen werden (109, 126). Durch diese tonotopische Ausrichtung der BM ist die Interpretation verschiedener Schallfrequenzen entlang der Cochlea möglich (109, 126). Voraussetzung für diese spezifische Wahrnehmung an Frequenzen ist die charakteristische Struktur der BM (an der Basis schmal zur Spitze hin breit) verantwortlich, die somit die Wahrnehmung von Tönen im Frequenzbereich zwischen 20 Hz und 16.000 Hz ermöglicht (109, 126).

1.2.4. Pathologische Prozesse

Funktionsstörungen des auditorischen Transduktionsweges kann zu Hörverlust führen, was mit einer weltweiten Morbidität von etwa 8 % zu den am weitesten verbreiteten sensorischen Symptomen gezählt wird (127). Als häufigste Ursache eines Hörverlusts wird die Exposition gegenüber lauten Geräuschen gesehen, was in eine irreversible Schädigung der Haarzellen resultiert (128). Der Verlust von Haarzellen führt zu einer Unfähigkeit afferente Nerven zu stimulieren und folglich zur fehlenden Wahrnehmung von verschiedenen Frequenzen (128). Auch eine Vielzahl von Wirkstoffen und Arzneimittel wie Aminoglykosid Antibiotika (z. B. Amikacin, Gentamicin), Chemotherapeutika (z. B. Cisplatin), Diuretika (z. B. Furosemid) und Antimalariamittel (z. B. Chloroquin) können gehörschädigende Auswirkungen haben und sich als Hörverlust und Tinnitus äußern (129).

1.3. Cisplatin und seine ototoxische Wirkung

Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts beobachtete Rosenberg et al. (1965) die Hemmung des Wachstums von E. coli Bakterien durch die Behandlung mit Platinverbindungen (130). Heute ist Cisplatin ein weitverbreitetes Chemotherapeutikum, was in der Therapie verschiedener maligner Neoplasien eingesetzt wird (131). Es besteht aus einem zentralen Platinatom, welches eine Verbindung mit zwei Ammoniakmolekülen und zwei Chloridionen eingeht (132). Durch den Austausch von Wasserstoffmolekülen gelangt Cisplatin entweder durch passive Diffusion oder über einen aktiven Transporter in den intrazellulären Raum der Zelle (132). Durch die Bildung einer kovalenten Verbindung am Stickstoffatom von Guanin und Adenin führt Cisplatin zu Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges, was sowohl die Replikation als auch die Transkription beeinträchtigt und die Zelle folglich apoptotisch wird (132, 133).

Einleitung

Ototoxisch wirkende Substanzen können Funktionsstörungen oder Degenerationszustände des Innenohrgewebes verursachen (129). Ototoxizität ist durch die Schädigung des auditorischen Systems charakterisiert und kann zu Tinnitus oder sensorineuralem Hörverlust führen (134). Dabei verursachen platinhaltige Medikamente wie Cisplatin irreversible Schäden im Innenohr (135). Der Hörverlust setzt Tage bis Wochen nach der Behandlung ein und betrifft vorerst nur den Hochfrequenzbereich, der bei anhaltender Behandlung auch zu den Tieftonfrequenzbereichen weiterschreitet (136). Im Tiermodell konnte beobachtet werden, dass Cisplatin zunächst die ÄHZ der basalen Windung schädigt, was mit dem beobachteten Hörverlust bei Menschen übereinstimmt (136). Ein ätiologischer und molekularer Erklärungsansatz für den Cisplatin-induzierten Hörverlust sei die Entdeckung des Cisplatin-Aufnahme-Rezeptors (organischen Kationenrezeptor 2, OCT2) an den Haarzellen und der SV (137). Darüber hinaus wird vermutet, dass Cisplatin die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) initiiert und somit einen Mangel an intracochlearen Antioxidantien verursacht (138, 139). Neben den Sinneszellen wird auch die SV, das vestibuläre System und die SGN in Anwesenheit von Cisplatin geschädigt (140-142) (143, 144). So wurde beschrieben, dass Cisplatin im OC zur Abnahme von Typ I SGN führt und dies einer der Gründe sei, weshalb Cisplatin einen Hörverlust auslöse (145). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cisplatin einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Zelltodes in kultivierten sensorischen Neuronen verursacht (146). Der genaue molekulare Mechanismus, die die ototoxische und neurotoxische Wirkung von Cisplatin erklären könnte, wurde jedoch nicht vollständig geklärt.

1.4. Immunprivileg des Innenohrs

Das Innenohr wurde wie das zentrale Nervensystem Jahrzehnte lang als immunprivilegiertes Organ angesehen (147-149). Ein Grund hierfür ist die Existenz der Blut-Labyrinth-Schranke, die eine physiologische Barriere zwischen dem peripheren Kreislauf und der Perilymphe bietet (147, 148). Zusätzlich schützt die Blut-Labyrinth-Schranke das Innenohr vor toxischen Substanzen und leitet Ionen, Flüssigkeiten und Nährstoffe selektiv an der Cochlea weiter, was eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Cochlea-Homöostase spielt (150, 151). Erst durch die von Rask-Andersen et al. (1979) beschriebene Interaktion zwischen Lymphozyten und Makrophagen im endolymphatischen Sack von Meerschweinchen konnte eine neue Ära der Innenohrimmunologie eingeleitet werden, was dem alten Dogma des immunprivilegierten Innenohrs gänzlich widersprach (152). Auch unter normalen Bedingungen konnten immunreaktive Zellen in verschiedenen Bereichen des Innenohrs beobachtet werden (153-156).

Einleitung

So wurden Zellen hämatopoetischen Ursprungs im Modiolus und in der LW der Cochlea beschrieben (153). Okano et al. (2008) bewies, dass es bei diesen Zellen um Iba-1-positive Makrophagen handelte (154). Darüber hinaus wurden aus dem Knochenmark stammende CX3CR1-positive Zellen, zu denen Monozyten, natürliche Killerzellen, aktivierte T-Zellen und Gewebemakrophagen gehören, an den SG und im SL identifiziert (155, 156). Zusammenfassend weisen diese Befunde darauf hin, dass das Innenohr auch unter normalen Konditionen immunkompetente Zellen hämatopoetischen Ursprungs beherbergt und somit in Verbindung mit dem Immunsystem steht.

2. Zielsetzungen der Arbeit

Die MZ erlangte in den letzten Jahrzehnten große Faszination in der Welt der Forschung, was dem geschuldet werden kann, dass es bis heute unklar ist, welche Funktionen die MZ in diversen physiologischen als auch pathologischen Prozessen erfüllt. Daher wurde die Rolle der MZ intensiv anhand von *in vivo* und *in vitro* Experimenten untersucht. Poulsen (1959) beschrieb als erster die Anwesenheit von MZ im oberen Bogengang des Meerschweinchens (157). Zwei Jahrzehnte vergingen, bis Sleeckx et al. (1979) MZ im endolymphatischen Sack von menschlichen Innenohren identifizierte (158). Das HNO-Forschungslabor der Charité - Universitätsmedizin Berlin konnte erstmalig zeigen, dass MZ auch in der Cochlea von Säugetieren ansässig sind (159). Daher gingen wir davon aus, dass die MZ eine Schlüsselfunktion in der Integrität der Cochlea-Morphologie übernehmen könnte. Um diese These zu überprüfen, wurden verschiedene *in vitro* Methoden genutzt. Zum einen die Erstellung von organotypischen Kulturen des membranösen Anteils der Cochlea, die Kultivierung von PCMCs und die Verwendung von MZ-Defizienten Mausmodell.

Die Ätiologie der ototoxischen Wirkung von Cisplatin wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ob MZ bei der ototoxischen Wirkung eine Rolle spielen, wurde bis jetzt nicht untersucht. Erstes Ziel dieser Arbeit war es demzufolge, die Auswirkung von Cisplatin auf die Cochlea-MZ darzustellen und darzulegen, ob der Mastzellstabilisator CS einen protektiven Effekt auf die Cochlea haben könnte.

Zu diesem Zweck wurden folgende Fragen mit den verwendeten Methoden beantwortet:

1. Welchen Einfluss hat Cisplatin auf die Cochlea-Mastzelle?
2. Zeigt die Behandlung mit Cromoglicinsäure einen protektiven Effekt auf den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust?
3. Verändert sich die Expression des Histamin-Rezeptors 1 und 3 in der Cochlea nach der Behandlung mit Cisplatin?
4. Welchen Effekt weisen Agonisten und Antagonisten des Histamin-Rezeptors 1 und 3 auf die Haarzellen auf?

Zielsetzungen der Arbeit

Die Bedeutung von MZ in der Entwicklung der Cochlea ist nicht bekannt. Um die Rolle der MZ in sich noch entwickelnden Innenohr besser zu charakterisieren, wurde ein MZ-Defizientes Mausmodell den Wildtyp Mäusen gegenübergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde demzufolge als zweites Ziel folgende Fragen beantwortet:

1. Zeigen MZ-Defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen morphologisch veränderte Haarzellen?
2. Weisen MZ-Defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen Unterschiede in der Neurogenese und Innervation von Haarzellen auf?

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Feinwaage	Sartorius 1-1000 mg	Sartorius AG (Göttingen, DE)
Fluoreszenzmikroskop	EVOS FL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	Keyence BZ-X800	Keyence (Osaka, JPN)
Konfokalmikroskop	Leica Microsystems konfokales Mikroskop SPE	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
Kühlschrank 4 °C	Liebherr Profiline	Liebherr (Biberach an der Riß, DE)
LightCycler	LightCycler 96	Roche Molecular Systems (Pleasanton, USA)
Magnetrührer	Monotherm Variomag	H+P Medizintechnik AG (Oberschleißheim, DE)
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research® plus	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Mikrowelle	R-208	Sharp K.K. (Osaka, JPN)
Multipipette	Multipipette® plus	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
NanoDrop®	One Micro-UV/Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipetten	PhysioCare variabel	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Pipettierhilfe	Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences (Hudson, USA)
Plattenschüttler	Typ RO 10	Gerhard GmbH & Ko KG (Königswinter, DE)
Stereomikroskop	SteREO Discovery.V8	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)

Materialien und Methoden

Sterilbank	LaminAir HBB 2448	Heraeus Holding GmbH (Hanau, DE)
Sterilwerkbank	Typ C424 H	CEAG Schirp (Burladingen, DE)
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, DE)
Thermoschüttler	DTS-2	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG (Wasserburg, DE)
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr comfort	Liebherr (Biberach an der Riß, DE)
Tischzentrifuge	5417R	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Ultratiefkühlschrank -86 °C	HERA freeze	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vortexer	IKA MS1	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)
Zählkammer	Neubauer Improved	VWR International (Radnor, USA)

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Sterile Materialien sind mit * gekennzeichnet.

Material	Typ	Hersteller
Abdichtungsfilm für PCR-Platten*		Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Biosphere® Filter Tips*	0,1-10 µl; 2-100 µl; 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Chirurgische Schere	14,5 cm, gerade	Aesculap, B. Braun (Tuttlingen, DE)
Combitips Plus*	0,5 ml, 5 ml	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Deckgläser	24x50 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, DE)
Falcon*	15 ml, 50 ml	Corning Incorporated (New York, USA)

Materialien und Methoden

Feindosierspritzen *	BD Plastipak™	BD GmbH (Heidelberg, DE)
Kanülen*	21 G, 25 G	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Kryobox		Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikroschere		Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Mullkompressen *	10x10	Fink & Walter GmbH (Merchweiler, DE)
Nadel nach Wullstein		Karl Storz (Tuttlingen, DE)
Objektträger	25x75 mm SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, DE)
PAP Stift	ImmEdge Hydrophobic	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Petrischalen*	Easy Grip 35x10 mm	Corning Incorporated (New York, USA)
Pinzette	Dumont	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, DE)
Pipettenspitzen*	epT.I.P.S.® Reloads 50-1000 µl, 20-300 µl	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Polypropylen Reaktionsgefäße*	LoBind and PCR Clean	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Präzisionspinzette	gerade Spezialform	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
QIAshredder*		Qiagen GmbH (Hilden, DE)
Reaktionsgefäße*	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf Research (Hamburg, DE)
Rundmesser 45°		Karl Storz (Tuttlingen, DE)
Serologische Pipette*	10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Spritzen*	10 ml, 20 ml	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Spritzenvorsatzfilter*	Filtropur S plus 0.2	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)

Zellkulturplatten*	Corning BioCoat™ Cellware Poly-D- Lysine/mouse Laminin 8- well	Corning Incorporated (New York, USA)
	4 well Nunclon Delta SI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	Nunc MaxiSorp™ 96 well	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3.1.3. Reagenzien/Chemikalien/Puffer

Produkt	Hersteller
2-Pyridylethylamine dihydrochloride, Hrh1 Agonist	Tocris (Bristol, UK)
Alexa Fluor™ 594 Phalloidin	Life technologies™ (Carlsbad, USA)
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi (Bad Homburg, DE)
Anti-Neurofilament 200 Antikörper	Abnova (Taipeh, TWN)
Antibody diluent	Abcam (Cambridge, UK)
Avidin, Alexa Fluor™ 488	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
β-Mercaptoethanol	Stratagene (San Diego, USA)
Ciproxifan maleate, Hrh3 Antagonist	TargetMol (Boston, USA)
Cis-Diammineplatinum (II) dichloride, Cisplatin	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Compound 48/80	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
D-(+)-Glucose solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DAPI-Farbstoff	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Descosept	Dr. Schumacher GmbH (Malsfeld, DE)
Dimethylsulfoxide	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)

Materialien und Methoden

DMEM/F12	Gibco® by Life technologies™ (Carlsbad, USA)
Elektrolyt-Infusionslösung mit Glukose	Serumwerk Bernburg AG (Bernburg, DE)
Ethanol abs. 96 Vol.%	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Fetales Rinderserum	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Formaldehydlösung 4 % 10/20 ml	SAV LP GmbH (Flintsbach am Inn, DE)
Formalin Lösung 10 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor™ 594	Life technologies™ (Carlsbad, USA)
Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor™ 488 (H+L)	Life technologies™ (Carlsbad, USA)
Immethridine dihydrobromide, Hrh3 Agonist	Tocris (Bristol, UK)
Insulin-like growth factor I	R&D Systems (Minneapolis, USA)
PBS Tabletten (0,01 M)	Gibco® by Life technologies™ (Carlsbad, USA)
Penicillin G Sodium Salt	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Penicillin-Streptomycin Lösung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ProLong™ Gold antifade reagent	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Recombinant Mouse IGF-1	R&D Systems (Minneapolis, USA)
RIPA Buffer	Cell Signaling (Cambridge, UK)
RLT Buffer	Qiagen GmbH (Hilden, DE)
RPMI 1640 Medium	Biochrom GmbH (Berlin, DE)
S-(+)-Chlorpheniramine maleate salt, Hrh1 Antagonist	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Sodium chromoglycate, Cromoglicinsäure	TargetMol (Boston, USA)
Toluidinblau O	VWR International (Radnor, USA)
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Wash Buffer	Cell Signaling (Cambridge, UK)

Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch Lab. (Cambridge, UK)
-------------	---

3.1.4. Kits

Produkt	Hersteller
QuantiFast SYBR® Green RT-qPCR Kit	Qiagen GmbH (Hilden, DE)
QuantiTect® Primer Assay	Qiagen GmbH (Hilden, DE)
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen GmbH (Hilden, DE)
Rneasy Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden, DE)

3.1.5. Software

	Version	Hersteller
BioRender		BioRender 2020 (Toronto, CAN)
EndNote	X9	Clarivate Analytics (Philadelphia, USA)
GraphPad Prism	8.4.3	GraphPad Software (San Diego, USA)
ImageJ	1.52	Wayne Rasband, National institutes of health (USA)
LightCycler software	3.00	Roche Molecular Systems (Pleasanton, USA)
Microsoft Office	16.41	Microsoft Corporation (Washington, USA)

3.2. Tiere

3.2.1. Tierhaltung

Die Tierhaltung als auch alle durchgeführten Tierexperimente erfolgten gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien des Berliner Landesamtes für Gesundheit und Soziales. Durch das Landesamt wurde die Durchführung der Tierversuche T 0292/16 („Gewinnung von voll entwickelten Haarzellen“) genehmigt.

Die Ausführung aller Experimente erfolgte nur durch autorisierte Personen. Es wurden folgende Mausstämme genutzt: männliche und weibliche C57BL/6-Mäuse als auch heterozygote C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1*^{fl/fl} und homozygote C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1*^{fl/fl} Mäuse sowie deren C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1*^{+/+} Wildtyp Geschwister. Die *Mcl-1* modifizierten C57BL/6-Mäuse wurden freundlicherweise von der AG Maurer (Allergie-Zentrum-Charité) zur Verfügung gestellt und mithilfe von Polymerasekettenreaktion genotypisiert. Die Jungtiere waren während der Experimente zwischen drei und fünf Tage alt. Zusätzlich wurden ca. neun Wochen alte (adulte) C57BL/6-Mäuse zur Gewinnung von PCMCs genutzt.

Die verwendeten Tiere stammen aus der eigenen Nachzucht der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, wo sie bestellt und im Übergaberaum des Charité Cross Over's abgeholt wurden. Mit der Lieferung und Abholung der Tiere begann der Versuchstag. Um eine Auskühlung der Versuchstiere zu vermeiden, wurden diese in einer Styroporbox mit zuvor aufgewärmten Gelakkus (1 Minute 800 W) gelagert. Zusätzlich erhielt jede Maus eine subkutane Injektion, bestehend aus einem Elektrolyt-Glukose-Mix, was eine Exsikkose vorbeugen sollte.

3.2.2. C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodell

2011 generierte das Galli Lab erstmalig das C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodell (160). Dieses Modell beruht auf der Erkenntnis, dass durch die genetische Manipulation am Myeloid cell leukemia sequence 1 Gen (*Mcl-1*) Zellen hämatopoetischen Ursprungs reduziert bis hin gelöscht werden können (161). Durch die Verwendung des Cre-loxP-Systems konnte eine Mauslinie generiert werden, die die Expression des *Mcl-1*-Gens spezifisch in MZ supprimiert. Hierzu wurde die Cre-Rekombinase an den Promoter der Carboxypeptidase A3, welches sehr stark in MZ exprimiert wird (162), verbunden. Die Cre-Rekombinase ist in der Lage spezifische DNA-Sequenzen, die als loxP-Stelle (Locus of x-over, P1) bezeichnet werden, zu erkennen und dadurch eine Deletion an dieser spezifischen DNA-Sequenzen zu initiieren (163). Dementsprechend wurden Mäuse mit loxP flankiertem Allel am *Mcl-1*-Gen generiert und diese mit Cpa3-Cre transgenen Mäusen gekreuzt. Demzufolge konnte in der Nachkommengeneration die Entfernung und Inaktivierung des *Mcl-1*-Gens durch die Expression der Cre-Rekombinase spezifisch in den MZ beobachtet werden (160). Zellen anderer hämatopoetischen Ursprungs wiesen keine Veränderungen auf (160).

Das C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodell schafft somit eine Grundlage, welches zur Erforschung der Funktionen und Eigenschaften der MZ im Innenohr genutzt werden kann.

3.3. Experimentelle Methoden am peritonealen Mastzellmodell – Vorversuche

Diese Vorversuche wurden den eigentlichen Experimenten und Zielsetzungen dieser Dissertation vorangestellt, da zunächst einmal die Wirkung des Mastzellstabilisators Cromoglicinsäure an MZ von Mäusen getestet werden sollte, um im weiteren Verlauf auch eine Aussage im Innenohr treffen zu können.

3.3.1. Zellgewinnung

Die Isolierung der PCMCs erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Meurer et al. (2016) (164). Die PCMCs wurde aus der Peritoneallavage von etwa neun Wochen alten männlichen C57BL/6-Mäusen gewonnenen. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation. Der Bauchbereich der Tiere wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Haut des Bauches achtsam eröffnet, sodass das Peritoneum parietale nicht lädiert wurde. Mit einer 20 ml Spritze und einer 25 G Kanüle wurde 5 ml PBS und 5 ml Luft in den Peritonealraum gegeben. Anschließend wurde der Abdominalbereich der Mäuse für 3 Minuten vorsichtig massiert, was das Herauslösen der MZ in die Lösung hervorrief. Die Lavage wurde mit einer 20 G Kanüle gewonnen und in ein 50 ml Falcon Tube transferiert, welches auf Eis gelagert wurde. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert.

3.3.2. Zellanzahlbestimmung

Nach der Zentrifugierung der Zellsuspension wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 5 ml PCMC-Medium aufgezogen, was am Versuchstag frisch angesetzt und steril filtriert wurde. Das PCMC-Medium setzte sich aus 1 % Penicillin/Streptomycin, 20 % fetalem Rinderserum und Kulturmedium DMEM/F12 zusammen. Um die Differenzierung der MZ von anderen Zellen zu ermöglichen, wurden diese in einem Verhältnis von 1:2 mit Toluidinblau gefärbt, was eine etablierte Färbemethode zur Identifizierung von MZ darstellt (165). Toluidinblau ist ein metachromer Farbstoff, der die zahlreichen Granula der MZ violett koloriert. Aus der mit Toluidinblau versetzten Lösung wurden 10 µl in die vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt, sodass der gesamte Zählbereich ausgefüllt war. Die Auszählung der MZ erfolgte bei 10-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop.

Hierzu wurden die Toluidinblau-positiven Zellen innerhalb der vier Eckfelder ausgezählt. Die durchschnittliche MZ-Anzahl pro Eckquadrat wurde ermittelt, indem die MZ-Anzahl aller 4 Felder addiert und durch vier dividiert wurde. Anschließend wurde der ermittelte Durchschnitt mit 2 (Verdünnung) und 10.000 (Volumen eines Gruppenquadrates: $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$) multipliziert. Das Ergebnis entsprach dem Vielfachen von 10^6 Zellen pro ml Zellsuspension.

3.3.3. Zellkultivierung

Im Anschluss der Zählung wurde die Zellsuspension, die zuvor in Kulturmedium aufgenommen wurde, in 4-Well-Kulturplatten gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und bei einem CO_2 -Gehalt von 5 % für 24 Stunden. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden nicht adhärierende Zellen, die sich im Überstand befanden, verworfen und neues PCMC-Medium, für die am Wellboden adhärierenden PCMCs, hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Kulturplatte für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm. Die Zellen konnten infolgedessen für weitere Behandlungen genutzt werden.

3.3.4. Zellbehandlung

Die Behandlungszusätze wurden an jedem Versuchstag unter sterilen Bedingungen neu angesetzt und in das PCMC-Medium gegeben. Die Kontrollgruppen, die jedem Behandlungskonzept zugeordnet wurden, erhielten über den gesamten Inkubationszeitraum Medium ohne Behandlungszusätze. Die Inkubation erfolgte stets bei 37°C und bei einem 5 %igem CO_2 -Gehalt für 15 Minuten. Die Versuche endeten mit der Einleitung der Formalinfixierung.

Um die Degranulation der PCMCs zu initiieren, wurden diese mit dem Polymer CP48/80 behandelt. CP48/80 stellt eine intensiv untersuchte Substanz dar, die die Aktivierung und Degranulation von MZ einleitet (166). CP48/80 (#C2313) wurde in destilliertem Wasser gelöst und zu einer Stammlösung mit der Konzentration von 50 mg/ml angesetzt. Um die jeweilige Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ CP48/80 zu erhalten, wurde die Stammlösung um den Faktor 1:5000, 1:2500 und 1:1000 mit PCMC-Medium verdünnt.

In einem anderen Versuchsdesign erfolgte eine 15-minütige Vorbehandlung der PCMCs mit $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ CS (#T1260). Nach erfolgter Vorbehandlung wurden die PCMCs mit einem Wasch Buffer gewaschen und mit $10 \mu\text{M}$ CP48/80 für weitere 15 Minuten behandelt. Am Ende aller Behandlungen wurden die PCMCs mit 4%iger Formaldehydlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und infolgedessen 3-fach mit Wash Buffer gewaschen.

Nach der anschließenden Permeabilisierung mit 0,1%igem Triton X-100 waren die PCMCs für die darauffolgende Fluoreszenzfärbung ausreichend vorbereitet.

3.3.5. Fluoreszenzfärbung

Um den Degranulationszustand der PCMCs quantifizieren zu können, wurden diese nach der Permeabilisierung mit fluoreszenzmarkiertem Avidin (Alexa Fluor™ 488 conjugate) und DAPI gefärbt. Avidin Alexa Fluor™ 488 wurde um den Faktor 1:800 in PBS verdünnt. Die Lösung wurde in die Wells pipettiert und lichtgeschützt für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die PCMCs 3-fach mit Wash Buffer für 10 Minuten gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde der Farbstoff DAPI um den Faktor 1:100 in PBS verdünnt und in die Wells pipettiert. Die Behandlung erfolgte ebenfalls lichtgeschützt für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer letzten Waschung wurden die Zellen in ProLong™ Gold eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt.

3.3.6. Auswertung

Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurde der Degranulationszustand der PCMCs in den Kontroll- und Behandlungsgruppen bestimmt. Am Fluoreszenzmikroskop wurden fünf Sichtfelder je Well mit dem 20x Objektiv fotografiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe von ImageJ. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität ist die fluoreszierende Färbung der PCMCs mit Avidin (Alexa Fluor™ 488 conjugate) von besonderer Bedeutung, da die Sättigung der gefärbten Bereiche ermittelt wurde. Hierzu wurden die Aufnahmen zunächst einmal in ein binäres Bild umgewandelt. Anhand dieser binären Bilder konnte die „Integrated Density“ (IntDen) ermittelt werden. Die IntDen gibt die Sättigung der jeweiligen Färbung an. Dies deutet darauf hin, dass je höher und gesättigter die Färbung war, umso höher war die Integrated Density. Bei den PCMCs bedeutete diese Gegebenheit, dass kompakte nicht-degranulierte MZ einen höheren IntDen aufwiesen als degranulierte MZ.

3.4. Experimentelle Methoden mit Cochlea-Explantaten

3.4.1. Vorbereitung und Präparationsvorgehen

Sowohl die Feinpräparation als auch die Herstellung des Kulturmediums erfolgte stets in der sterilen Atmosphäre einer Sterilwerkbank. Die verwendeten Versuchsmaterialien zur Präparation der Cochlea wurden vorerst mit 70 %igem Ethanol sterilisiert und die Arbeitsfläche mit Descosept gewischt.

Anderweitige Materialien wurden nur unter der Werkbank genutzt. Pro Tier wurden zwei Petrischalen mit jeweils 3 ml DMEM/F12 (ohne Zusätze) vorbereitet und bis zum Einsatz bei 4 °C gelagert. Die Präparation der Cochlea erfolgte in Anlehnung an Sobkowicz et al. (1993) (167) und Parker et al. (2010) (168). Je Versuchstag wurden vier bis acht Mäuse präpariert. Für die Herstellung der organotypischen Kulturen wurden Jungtiere im Alter von drei bis fünf Tage verwendet. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation mit einer chirurgischen Schere. Anschließend wurden die Köpfe mit der Schnittfläche nach unten auf eine sterile Mullkomresse gelegt und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Kopfhaut wurde durch eine anatomische Pinzette und einer kleinen chirurgischen Schere entfernt. Das Neurocranium wurde entlang der Sagittalebene halbiert und das Gehirn mit einem Spatel entnommen. Die Pars petrosa des Os temporale wurde aus dem halbierten Schädel separiert und in eine der zuvor vorbereiteten Petrischale überführt. Die darauffolgende feingewebliche Präparation erfolgte mit einem Mikroskop unter der sterilen Atmosphäre einer Arbeitsbank. Das überschüssige Gewebe wurde entfernt, die Cochlea mit der knorpeligen Kapsel aufgesucht und aus dem Felsenbein gelöst. Anschließend wurde die freigelegte Kapsel in eine frische Petrischale, die DMEM/F12 gefüllt war, überführt. Infolgedessen wurde die Cochlea-Kapsel in kleine Stücke eröffnet, bis der membranöse Anteil der Cochlea frei lag. Die SV und das SL wurden von der Basis bis zur Spitze der Cochlea im Ganzen abgezogen und das OC vom Modiolus getrennt. Unter den Begriff OC werden im Folgenden die Haarzellen als auch die SGN und SG mitgezählt.

3.4.2. Organotypische Kultur des sensoneuronalen Epithels und der Lateralwand

Die Kultivierung des OCs und der LW erfolgte in sterilen 8-Well oder 4-Well Zellkulturplatten, die jeweils mit 400 µl Kulturmedium befüllt wurden. Um eine bessere Anheftung der Explantate zu erzielen, wurden die Zellkulturplatten über Nacht in einem mit 5 % CO₂ begasten Inkubator bei 37 °C vorinkubiert. Abhängig vom weiteren Verwendungszweck der Explantate wurden diese in zwei verschiedenen Kultivierungsverfahren bearbeitet. Explantate, die für die Immunfluoreszenz designed waren, wurden als ganze OCs und LWs in einer der Wells überführt und auf dem Boden positioniert. Explantate, die jedoch für die one-step real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) vorgesehen waren, wurden als freischwebende Proben kultiviert.

Materialien und Methoden

Das dafür benötigte Kulturmedium setzte sich aus Dulbecco modifiziertes Eagle Medium, was mit 10 % fetalem Rinderserum, 1,3 % Glucose, 0,2 % Penicillin G, 0,2 % einer Lösung aus Insulin, Transferrin und Natriumselenit sowie 0,025 % Insulin-like-Growth-Faktor versetzt wurde, zusammen. Das Kulturmedium wurde am jeweiligen Versuchstag frisch angesetzt und steril mit einem 0,2 µm Spritzenvorsatz filtriert. Nach der Präparation wurden alle Explantate in einem mit 5 % CO₂ begasten Inkubator bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert, um diese für anschließende Versuchszwecke vorzubereiten.

3.4.3. Gewebeaufarbeitung durch Formalinfixierung

Am Ende der Inkubationszeit wurden die OCs und LWs in 10%iger Formalinlösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 3-fach mit Wash Buffer gewaschen. Die Fixierung fand unter einem Abzug und hinter einem Schutzglas statt. Die darauffolgende Permeabilisierung fand mit 0,5 % Triton X-100 in einer PBS-Spülpufferlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur statt. Nach einer letzten Waschung erfolgte die anschließende Fluoreszenzfärbung oder RNA-Isolierung.

3.4.4. Fluoreszenzfärbung von Mastzellen

Zur Quantifizierung der MZ wurden die Explantate nach der Fixierung mit fluoreszenzmarkiertem Avidin gefärbt. Das Glykoprotein Avidin, was mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa FluorTM konjugiert wurde, dient zur fluoreszenzmikroskopischen Identifizierung von MZ und stellt eine etablierte Färbemethode zur Darstellung von MZ-Granula dar (169). Die spezifische Bindung an die MZ-Granula soll durch elektrostatische Interaktionen zwischen dem negativ geladenen Heparin in den Granula und dem positiv geladenen Avidin zustande kommen (170). Avidin Alexa FluorTM 488 wurde um den Faktor 1:600 in PBS verdünnt und in die Wells pipettiert. Anschließend erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Explantate für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit wurden die Explantate 3-fach mit Wash Buffer für 10 Minuten gewaschen. Infolgedessen wurde die Kammer der 8-Well Zellkulturplatte entfernt und die Explantate in ProLongTM Gold Antifading-Reagenz, was mit DAPI versetzte war, eingebettet. Die Abdeckung der Explantate erfolgte anschließend mit einem Deckglas.

3.4.5. Fluoreszenzfärbung von Haarzellen

Um die Anzahl und den Zustand der Haarzellen quantifizieren zu können, wurden diese nach der Fixierung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt.

Phalloidin ist das zyklische Peptidtoxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), welches hochaffin an filamentäres Aktin (F-Aktin) bindet und dessen Depolymerisierung hemmt (171, 172). Somit kann durch Phalloidin, was mit dem Fluoreszenzfarbstoff iFluor® konjugiert wurde, die aktinreichen Stereozilien der Haarzellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die IHZ und ÄHZ lassen sich durch ihre typisch morphologische Anordnung im OC und der Stereozilienausrichtung sicher voneinander unterscheiden. Phalloidin-iFluor® 594 wurde um den Faktor 1:1500 in PBS verdünnt. Die Explantate wurden anschließend lichtgeschützt für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 3-fachen Waschung mit Wash Buffer wurde die Kammer der 8-Well Zellkulturplatte entfernt und die Explantate in ProLong™ Gold Antifading-Reagenz, was mit DAPI versetzt wurde, eingebettet. Die Abdeckung der Explantate erfolgte anschließend mit einem Deckglas.

3.4.6. Immunfluoreszenzfärbung von Spiral Ganglion Neuronen

Die Immunfluoreszenz beruht auf dem Prinzip der spezifischen Bindung des Erstantikörpers an das untersuchende Protein im Zellverband (173, 174). Diese Koppelung wird erst durch die Verwendung eines Zweitantikörpers sichtbar (173, 174). Der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper kann durch die Anregung mit Licht bestimmte Wellenlängen emittieren und so im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (173, 174). Die Explantate wurden mit 4 %iger Blockierungslösung (Ziegen Serum und PBS) bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert, um nicht-spezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Explantate mit dem neuronenspezifischen Primärantikörper Anti-Neurofilament 200 (NF200) markiert. Hierzu wurde NF200 im Verhältnis von 1:400 in Antibody Diluent verdünnt, in die Wells pipettiert und bei 37 °C für 40 Minuten inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der Ziegen-anti-Maus Antikörper IgG, was mit Alexa Fluor™ 488 oder mit Alexa Fluor™ 594 konjugiert wurde, verwendet. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis von 1:400 in Antibody Diluent angesetzt und für 5 Minuten bei 14000 U zentrifugiert. Anschließend wurden die Explantate mit dem Überstand lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Nach der Waschung mit Wasch Buffer erfolgte entweder die Färbung der Haarzellen oder der MZ.

3.4.7. Fluoreszenzmikroskopie

Die Explantate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop EVOS FL und Keyence BZ-X800, in 400-facher Vergrößerung abgebildet, quantifiziert und analysiert. Durch verschiedene Filter konnten die Emissionsfarben der jeweiligen Fluorochrome dargestellt werden (**Tabelle 1**).

Tabelle 1 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper.

		Ex*	Em*	Emissionsfarbe	Struktur
Primär-antikörper	NF-200 monoclonal Antikörper	-	-	-	Spiral Ganglion, Spiral Ganglion Neurone
Sekundär-antikörper	Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor™ 488 IgG (H+L)	495	519	grün	-
	Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor™ 594	590	617	rot	-
Fluorochrom	Avidin Alexa Fluor™ 488	495	519	grün	Mastzellen
	Phalloidin-iFluor® 594	590	617	rot	Haarzellen
	DAPI	405	420	blau	Zellkerne

*Exzitations-(Ex) und Emissionsmaxima (Em) von Konjugaten in nm.

3.4.8. Behandlung der Explantate

Je nach Versuchsdesign wurden die Explantate entweder mit Cisplatin, CS oder Histamin-Rezeptor 1/3 Agonisten/Antagonisten behandelt. Die Behandlungszusätze wurden stets unter sterilen Bedingungen angesetzt und in das Kulturmedium der Explantate gegeben. Die Kontrollgruppen, die jedem Behandlungskonzept zugeordnet wurden, wurden über den gesamten Inkubationszeitraum mit Kulturmedium ohne Behandlungszusätze inkubiert. Die jeweiligen Versuche wurden zwischen zwei und viermal Mal wiederholt. Die Inkubation erfolgte stets bei einem 5 % CO₂ begasten Inkubator bei 37 °C und endete mit dem Beginn der RNA-Isolierung oder mit der Formalinfixierung.

Cisplatin (#232120) wurde zunächst in Dimethylsulfoxid zu 100 mg/ml Ansätze gelöst. Anschließend wurde das gelöste Cisplatin in RPMI-Medium um den Faktor 1:100 verdünnt und aliquotiert. Die Konzentration der endgültigen Stammlösung betrug 3,3 mM. Zur Bestimmung der mittleren letalen Konzentration (LD₅₀) von Cisplatin wurden die Explantate mit 5 µM, 10 µM, 15 µM und 20 µM Cisplatin behandelt. Die Behandlung erfolgte nach der initialen Inkubation für weitere 24 Stunden.

Materialien und Methoden

Die Negativ-Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit alleinigem Kulturmedium ohne den Zusatz von Cisplatin kultiviert. Anhand des Beschädigungsgrades der IHZ und ÄHZ wurde die LD₅₀ Konzentration von Cisplatin bestimmt. In einem anderen Versuchsdesign wurden OCs, LWs und Modioli mit 15 µM Cisplatin für 2, 4, 6 und 24 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die RNA-Isolierung.

Cromoglicinsäure (#T1260) wurde in destilliertem Wasser gelöst und zu einer Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mM angesetzt. Anschließend wurden die Explantate mit 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM CS behandelt. Die Behandlung erfolgte nach der initialen 24-stündigen Inkubation für weitere 24 Stunden. Die Negativ-Kontrollgruppe wurde unter den gleichen Bedingungen mit alleinigem Kulturmedium ohne den Zusatz von CS kultiviert. Die Auswertung erfolgte anhand des Beschädigungsgrades der IHZ und ÄHZ sowie durch semi-quantitativer Bestimmung der Fluoreszenzintensität von SGN.

In einem anderen Versuchsdesign erfuhren die Explantate eine Vorbehandlung mit 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM CS für 2 Stunden. Anschließend wurden diese Explantate mit 15 µM Cisplatin für weitere 24 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Immunfluoreszenzanalyse (**Abbildung 1**).

2-Pyridylethylamine dihydrochloride (Hrh1 Agonist; #2478), S-(+)-Chlorpheniramine maleate salt (Hrh1 Antagonist; #SC-253441) und Immethridine dihydrobromide (Hrh3 Agonist; #2315) wurde in destilliertem Wasser gelöst und zu einer Stammlösung mit der Konzentration von 100 mM angesetzt. Ciproxifan maleate (Hrh3 Antagonist; #T2004) wurde in Dimethylsulfoxid gelöst, welche auch in eine Stammlösung mit 10 mM angesetzt wurde. Die Behandlung der Explantate mit dem Hrh1 Agonisten/Antagonisten und dem Hrh3 Agonisten/Antagonisten erfolgte in den Endkonzentrationen 10 µM, 50 µM und 100 µM. Hierzu wurden die Stammlösungen um den Faktor 1:1000, 1:200 und 1:100 verdünnt. Nach der anfänglichen 24-stündigen Inkubation wurden die Explantate mit dem angereicherten Medium für weitere 24 Stunden behandelt.

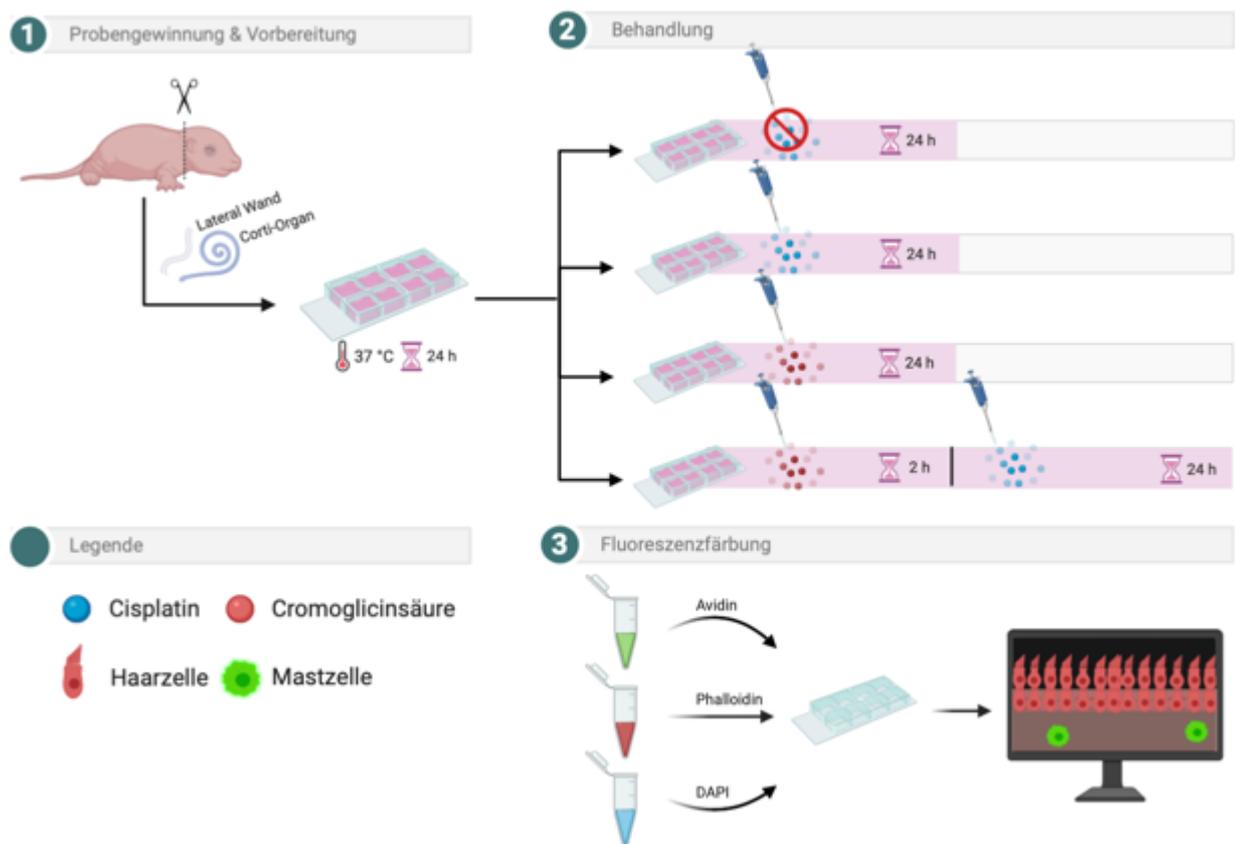


Abbildung 1 Versuchsaufbau der Cromoglicinsäure und Cisplatin Experimente.

Erstellt durch BioRender.com (2020).

3.4.9. Auswertung

Im Rahmen der Auswertung wurden in jedem Explantat die MZ-Anzahl, der Haarzellverlust und die SGN Dichte quantifiziert. Um die Anzahl und den Aktivierungszustand der MZ in den Kontroll- und Behandlungsgruppen zu bestimmen, wurden diese mit fluoreszenzmarkiertem Avidin gefärbt. Es erfolgte sowohl eine distributive als auch eine quantitative Auswertung der MZ. Für die distributive Auswertung der MZ in den OCs wurde diese in drei Bereiche eingeteilt: Haarzellareal, Neuritareal und SG Areal. Die Einteilung der LW erfolgte in SV und SL. Anschließend wurden die MZ im gesamten OC und LW ausgezählt. Zusätzlich wurden die MZ nach ihrem Granulationszustande in zwei Gruppen eingeteilt: nicht-degranulierte MZ und degranulierte MZ. Nicht-degranulierte MZ zeichneten sich dadurch aus, dass sie kompakt und granulareich erschienen und keine Granula im extrazellulären Raum aufzufinden war. Degranulierte MZ hingegen wiesen zahlreiche extrazelluläre Granulate und/oder einen reduzierten intrazellulären Granulagehalt auf. Diese Einteilung der MZ anhand des Granulationszustandes erfolgte in Anlehnung an Ribatti (2018) (165). Die Dokumentation der Zählung und der MZ-Verteilung fand durch standardisierte Tabellen statt.

Materialien und Methoden

Um den Haarzellverlust der jeweiligen Kontroll- und Behandlungsgruppen zu identifizieren, wurde für jedes OC ein individuelles Cochleogramm erstellt. Dabei stellt ein Cochleogramm den prozentualen Haarzellverlust als Funktion zwischen dem Abstand von der Basis bis zum Apex der Cochlea dar. Daher wurde zunächst einmal die Länge der BM ausgemessen. Hierzu wurde durch die Verwendung des 10x Objektivs des Fluoreszenzmikroskops Bilder der gesamten BM aufgenommen, welche anschließend zusammengesetzt wurden. Mit dem ImageJ Plugin Measure_Line wurde die Länge der BM zwischen der Lamina spiralis ossea und der IHZ-Reihe gemessen. Nach der Ausmessung jeder Cochlea wurde diese in 10 Abschnitte eingeteilt, welche einen bestimmten Prozentsatz der gesamten OC-Länge repräsentiert (0 % = Apex – 100 % = Basis). Anschließend wurde in jedem Abschnitt drei repräsentative Haarzellbereiche ausgesucht und mit dem 40x Objektiv fotografiert. Da die IHZ und ÄHZ nicht alle auf einer Ebene lagen, wurden mehrere Aufnahmen von unterschiedlichen Ebenen erstellt. Diese Bilder wurden dann in einem Z-Stack zusammengefügt. Die Anzahl der IHZ und ÄHZ wurde aus diesen digitalen Bildern mit einer Skala von 100 µm ausgezählt. Zur Zellzählung wurde das ImageJ Plugin Cell_Count genutzt. Die Haarzellen wurden in drei morphologische Charakteristika eingeteilt: intakte, defekte und fehlende Haarzellen. Intakte Haarzellen waren dadurch gekennzeichnet, dass die Stereozilien physiologisch angeordnet waren. Defekte Haarzellen waren durch gestörte Anordnung und/oder Fusionen der Stereozilien charakterisiert. Fehlende Haarzellen wurden durch das Fehlen der Stereozilien und eventueller Narbenbildung identifiziert. Gelegentlich wurde eine vierte ÄHZ Reihe beobachtet, die nicht in die Zählung miteingeschlossen wurde. Der Mittelwert der ausgezählten Haarzellen wurde ermittelt, sodass jeweils 100 µm einen bestimmten Prozentsatz der kompletten OC-Länge repräsentierte. Daraufhin wurde der Durchschnittswert der intakten, defekten und fehlenden IHZ und ÄHZ in 10 % -Intervallen über die gesamte Länge des OCs angegeben.

Die OCs der *Mcl-1* modifizierten Mäuse wurden entlang der zweieinhalb Windungen in apikale, mediale und basale Fragmente eingeteilt. In jeder Windung wurden drei repräsentative Bereiche zur Haarzellquantifizierung mit dem 40x Objektiv aufgenommen, die anschließend mit der zuvor beschriebenen Haarzellcharakteristika ausgezählt wurden. Der Mittelwert der ausgezählten Haarzellen wurde errechnet, sodass dieser die durchschnittliche Anzahl der Haarzellen je Windung repräsentierte.

Zur Quantifizierung der SGN wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurden die SGN numerisch quantifiziert und zum anderen wurde eine semi-quantitative Auswertung der Daten unternommen.

Für beide Methoden wurden die SGN zunächst mit dem Primärantikörper NF200 markiert und anschließend mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper gefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop wurden die SGN mit dem 40x Objektiv fotografiert. Da die SGN nicht alle auf einer Ebene lagen, wurden mehrere Aufnahmen von unterschiedlichen Ebenen erstellt, die anschließend in ImageJ zu einem Z-Stack zusammengefügt wurden. Die numerische Quantifizierung der SGN erfolgte aus den digitalen Bildern, indem die einzelnen SGN je 100 µm ausgezählt wurde. Für die semi-quantitative Auswertung wurde in ImageJ das Verfahren der Flächeninhaltbestimmung genutzt. Hierzu wurde zunächst ein 100 µm langer Bereich zwischen der Habenula perforata und der IHZ-Reihe als „region of interest“ (ROI) ausgewählt. Um die Fläche der grün oder rot gefärbten SGN in den jeweiligen ROI zu analysieren, wurden die Aufnahmen in ein binäres Bild umgewandelt. Mit der Funktion Color Threshold wurden die ausgewählten Bereiche weiß markiert und der nicht gefärbte Hintergrund schwarz. Anschließend konnte der Flächenanteil der SGN in jedem ROI durch ImageJ berechnet werden.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. RNA-Isolation aus Gewebekulturen

Zur RNA-Isolierung wurden neben OCs und LWs auch Modioli genutzt, die jeweils für 2, 4, 6 und 24 Stunden mit 15 µM Cisplatin behandelt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Explantate mit PBS gewaschen und in getrennte Eppendorf Behälter gegeben. In das jeweilige Behältnis wurde 350 µl RLT-Puffer, welches zuvor mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde, beigefügt und für 3 Minuten mit der Pipette homogenisiert. Proben, die nicht anschließend für die weitere RNA-Isolation genutzt wurden, wurden bei -80 °C eingefroren. Für die Extraktion zu einem anderen Zeitpunkt wurde das zuvor homogenisierte Gewebe auf einem Eisblock unter der Atmosphäre einer Sterilwerkbank aufgetaut. Anschließend wurde die Probe bei 14000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Daraufhin wurde das Lysat mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Infolgedessen wurden 600 µl auf eine RNeasy Spin Säule gegeben, die wiederum in einem 2 ml Auffangbehältnis überführt wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Säule bei 80000 rpm für 20 Sekunden. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgte der erste Waschschrift. Zuerst wurde 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Spin Säule gegeben und bei 10000 rpm für 20 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde 350 µl RW1-Buffer in die RNeasy Säulen zugesetzt und für 20 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand und das Auffangbehältnis wurden verworfen. Die RNeasy Säule wurde in ein neues 2 ml Auffangbehältnis überführt. 500 µl RPE-Buffer wurde in die RNeasy Säule pipettiert und für 20 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der vorige Waschschrift mit 500 µl RPE-Buffer wiederholt. Der Überstand mit dem Auffangbehältnis wurde nochmalig verworfen, sodass die RNeasy Säulen in eine neue 2 ml Auffangbehältnis überführt wurde. Die Säule wurde daraufhin bei 14000 rpm für 1 Minute getrocknet und dann auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf Behältnis gesetzt. Auf die Membran der Säule wurde 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert und bei 10000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der aufgefangene Durchfluss enthielt die extrahierte RNA, deren Gehalt mithilfe des NanoDrop® ermittelt wurde.

3.5.2. Reinheit-und Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Konzentrationsbestimmung der gewonnen RNA-Proben aus OCs, LWs und Modioli erfolgte am NanoDrop®. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm fotometrisch bestimmt. Für die Messungen wurden 1 µl RNA auf das Gerät pipettiert und die RNA Konzentration mithilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{A}_{260 \text{ nm}} \times \text{K} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$(\text{K} = \text{optische Dichte; RNA } 40 \mu\text{g/ml})$$

Die Reinheit der RNA-Proben wurde durch die Bildung des Quotienten aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm bestimmt ($\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$), wobei Werte zwischen 1,80 und 2,20 auf eine reine RNA-Isolierung hinwiesen.

3.5.3. Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Variante des one-step RT-qPCRs, findet die cDNA-Synthese und PCR nicht getrennt voneinander statt, sondern in ein und demselben Behältnis, was die Anzahl an Pipettiereinheiten minimierte und somit die Quantität der möglichen Fehler. Mit dem Qiagen QuantiFast SYBR® Green one-step RT-qPCR Kit wurde die RNA ohne eine weitere Reaktion in cDNA umgewandelt und anschließend mit spezifischen Primern amplifiziert. Die RT-qPCR erfolgte in einer 96-Well-Platte mit einer Gesamtmenge von 25 µl QuantiFast SYBR® Green RT-qPCR Master Mix. Hierzu wurde für jede untersuchte Probe (OC, LW und Modiolus) ein 12,8-facher MasterMix-Lösung, die 195,2 µl umfasste, vorbereitet und auf 36 Reaktionsgefäße á 15,25 µl verteilt (**Tabelle 2**).

Tabelle 2 Reaktionsansätze.

	Volumen 1 x [μl]
2x QuantiFast SYBR® Green RT-qPCR MasterMix	12,5
Primer A, B, C	2,5
QuantiFast RT Mix	0,25
RNA	60 ng
RNase-freies Wasser	9,75
Gesamtvolumen	25

Anschließend wurden die 96-Well-Platten mit einem Abdichtungsfilm abgedeckt, für 1 Minute bei 1000 g zentrifugiert und in den LightCycler96 platziert. Die Denaturierung der c-DNA wurde nach 45 Zyklen und durch die in der **Tabelle 3** aufgezeigtem Zeit- und Temperaturschema erreicht.

Tabelle 3 Zeit-und Temperaturschema.

	Zeit (in Sekunden)	Temperatur (in °C)
Reverse Transkription	600 s	50 °C
Initiale Denaturierung	300 s	95 °C
Denaturierung	10 s	95 °C
Kombinierte Annealing/Extension	30 s	60 °C
Schmelzen	1 s	97 °C
Kühlung	30 s	37 °C

3.5.4. Primer

Die im Rahmen dieser one-step RT-qPCR verwendeten Primer wurden von der Firma Qiagen bezogen und sind in **Tabelle 4** gelistet.

Tabelle 4 Verwendete Primer.

Name	Spezies	Transkript	bp
Hrh1	Maus	NM_001252643	3868 bp
Hrh3	Maus	NM_133849	2641 bp
Ywhaz	Maus	NM_001253805	3604 bp

3.5.5. Relative Quantifizierung

Die Auswertung der one-step RT-qPCR erfolgte über eine relative Quantifizierung, die gegen Ywhaz als Hauskeeping-Gen berechnet wurde. Die Berechnung fand mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode statt, wobei folgende Formeln für die Bestimmung des Verhältnisses zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen (relative Transkripthäufigkeit) verwendet wurde:

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{Zielgen}}} - C_{t_{\text{Ywhaz}}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{Behandlung}}} - \Delta C_{t_{\text{Kontrolle}}}$$

$$\text{relative Transkripthäufigkeit} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Alle Proben wurden als Duplikate analysiert.

3.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Beratung durch das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Zur statistischen Analyse wurde die Software GraphPad Prism 8 verwendet. Die Ergebnisse wurden in Microsoft Excel® gesammelt und anschließend in GraphPad übertragen. Die statistische Signifikanz wurde durch eine one-way ANOVA-Varianzanalyse und two-way ANOVA-Varianzanalyse mit multiplen post-hoc Vergleiche durch den Dunnett Test oder Turkey Test berechnet.

Materialien und Methoden

Konnten die Bedingungen für eine Normalverteilung nicht erfüllt werden, so wurde ein Kruskal-Wallis Test mit multiplen post-hoc Vergleiche durch den Dunn's Test durchgeführt. Ein Signifikanzwert (p-Wert) unter $p < 0,05$ (*) wurde als signifikant, $p < 0,01$ (**) als sehr signifikant, $p < 0,001$ (***) als hoch signifikant, $p < 0,0001$ (****) als höchst signifikant und $p > 0,05$ (ns) als nicht signifikant betrachtet. Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Prüfung von Cromoglicinsäure im peritonealen Mastzellmodell – Vorversuche

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, den mastzellstabilisierenden Einfluss von CS an PCMCs zu prüfen. Diese Versuche dienten als Basis dafür, um die hier gewonnen Erkenntnisse auf das Innenohr-Modell zu übertragen und einen Erklärungsansatz für mögliche Interaktion zwischen dem mastzellstabilisierenden Effekt von CS und der ototoxischen Wirkung von Cisplatin zu bieten.

4.1.1. Cromoglicinsäure hemmt *in vitro* die Degranulation von peritonealen Mastzellen

Um die mastzellstabilisierende Eigenschaft von CS an PCMCs zu prüfen, wurden diese zunächst mit dem MZ-Aktivator CP48/80 in 10 μM , 20 μM und 50 μM für 15 Minuten behandelt. In einem weiteren Versuchsdesign wurden die PCMCs mit 1 μM , 10 μM und 50 μM CS für 15 Minuten vorbehandelt und anschließend mit 10 μM CP48/80 für weitere 15 Minuten. Die Analyse erfolgte durch die semi-quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität, wobei kompakte nicht-degranulierte PCMCs eine höhere Fluoreszenzintensität aufwiesen als degranulierte PCMCs.

In **Abbildung 2** ist schematisch die Fluoreszenzintensität der PCMCs nach der Behandlung mit CP48/80 und CS abgebildet. Es ist zu erkennen, dass eine Stimulation der PCMCs mit 10 μM , 20 μM und 50 μM CP48/80 zu einer höchst signifikanten Reduktion der IntDen führte (von links nach rechts: $p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,0004$; Kruskal-Wallis Test). Des Weiteren ist eindeutig zu erkennen, dass nach der Vorbehandlung mit 1 μM und 10 μM CS (+ +) kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe (- -) ermittelt werden konnte. Die Vorbehandlung mit 50 μM CS wies hingegen eine signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis Test).

In **Abbildung 3** sind repräsentative Aufnahmen dargestellt, die die PCMCs nach alleiniger Behandlung mit CP48/80 (**Abbildung 3c/d**) und nach der Vorbehandlung mit CS (**Abbildung 3e/f**) zeigen. Es ist visuell zu erkennen, dass die Anzahl nicht-degranulierter PCMCs in der Kontrollgruppe sowie in der CS + CP48/80 Gruppe erhöht sind, was anhand vieler runder und intakter Zellen erkennbar wird. In der CP48/80 Gruppe ist eine deutliche Reduktion nicht-degranulierter PCMCs aufzufinden, was durch die vermehrte Streuung an Granula im extrazellulären Raum verdeutlicht wird.

Ergebnisse

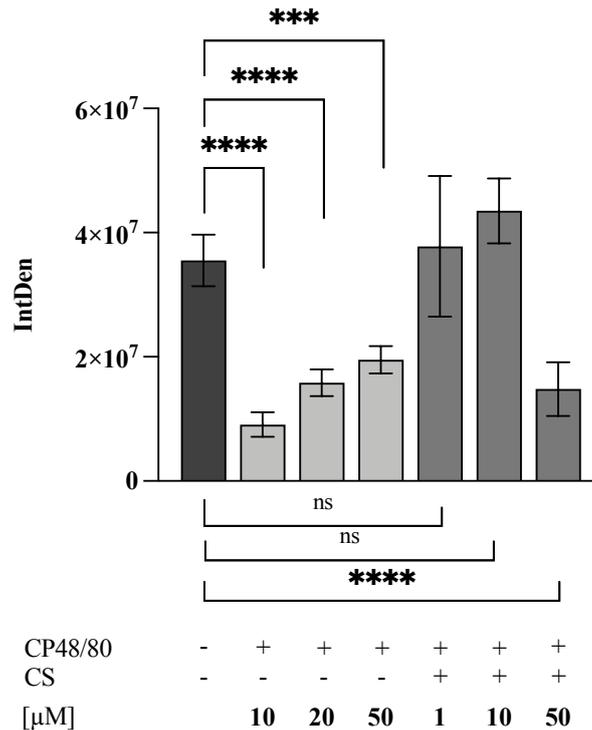


Abbildung 2 Die Behandlung mit CP48/80 bewirkt eine Senkung der Fluoreszenzintensität von PCMCs, während Cromoglicinsäure die Fluoreszenzintensität wieder ansteigen lässt.

Die Fluoreszenzintensität wird als IntDen angegeben, was eine Zusammenfassung der Pixel in einem ausgesuchten Areal darstellt. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen PCMC in fünf Sichtfelder durch ImageJ berechnet. Die Behandlung der PCMCs mit CP48/80 (10, 20 und 50 μ M) erfolgte für 15 min ((+ -) hellgrau). In einem anderen Versuch wurden die PCMCs mit CS (1, 10 und 50 μ M) für 15 min vorbehandelt und anschließend mit 10 μ M CP48/80 für weitere 15 min kultiviert ((+ +) dunkelgrau). Die Ergebnisse wurden mit der Kontrollgruppe verglichen, welche nur mit dem Kulturmedium ohne den Zusatz von C48/80 oder CS kultiviert wurde (- -). Die Daten wurden aus zwei Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. ns > 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's).

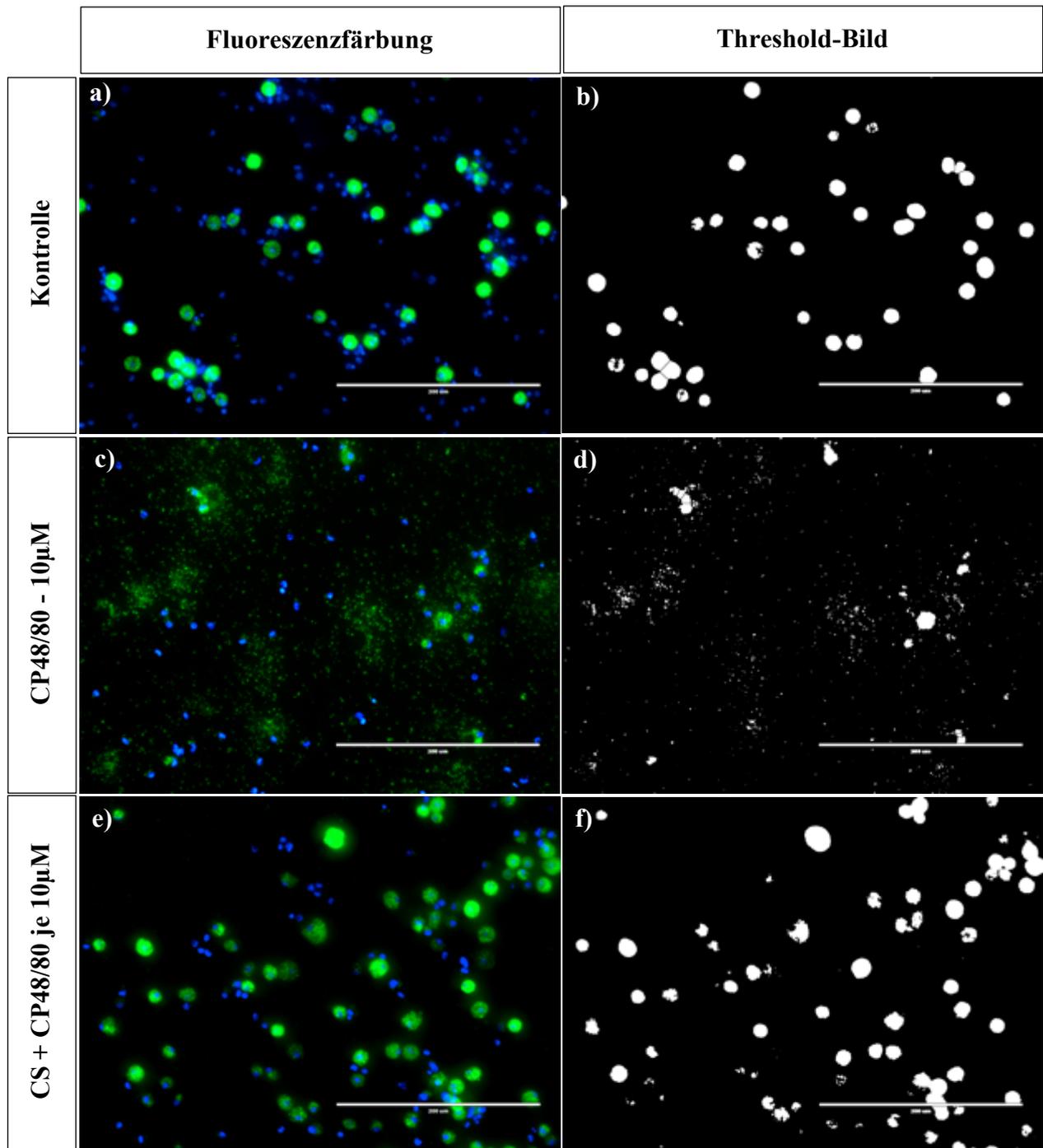


Abbildung 3 Repräsentative Aufnahmen der PCMCs nach 15-minütiger Behandlung mit CP48/80 und Cromoglicinsäure. Die PCMCs wurden mit fluoreszenzmarkiertem Avidin (Alexa Fluor™ 488 conjugate) und DAPI (Zellkerne) gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen grün markierten PCMCs wurde mithilfe des dazugehörigen Threshold-Bildes in ImageJ berechnet (**Abbildung 3b, 3d, 3f**). **Abbildung 3a/b** PCMCs Behandlung mit Kulturmedium ohne Zusätze (Kontrolle). **Abbildung 3c/d** PCMCs Behandlung mit 10 µM CP48/80. **Abbildung 3e/f** Vorbehandlung der PCMCs mit 10 µM CS und anschließende Behandlung mit 10 µM CP48/80. Der Maßstab entspricht 200 µm.

4.2. Der Einfluss von Cisplatin auf die Cochlea-Mastzellen

Die Tierversuche im nächsten Schritt verfolgten das Ziel, die Verteilung der Cochlea-MZ zu bestimmen, da zu diesem Zeitpunkt keine Daten diesbezüglich existieren. Darüber hinaus zeigte Brzezinska-Blaszczyk et al. (1996), dass die Behandlung mit Cisplatin die Histaminsekretion aus PCMCs induzierte (58), weshalb die Vermutung aufgestellt wurde, dass die Cochlea-MZ auch in Anwesenheit von Cisplatin degranulieren würden und diese Degranulation vermutlich eine Rolle in der Cisplatin-induzierten Ototoxizität spielen könnte.

4.2.1. Distribution der Mastzellen in Cochlea-Explantaten

Um den Einfluss von Cisplatin auf die Cochlea-MZ zu untersuchen, wurde zunächst einmal die Verteilung der MZ unter normalen Konditionen analysiert. Hierzu wurden die MZ in den verschiedenen Strukturen der Cochlea quantifiziert.

In **Abbildung 4** ist die durchschnittliche Anzahl der MZ in verschiedenen Bereichen der Cochlea grafisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Cochlea-MZ sowohl im SGN- und SG-Areal als auch im SV- und SL-Areal der LW aufzufinden waren, während keine MZ im Haarzellbereich beobachtet werden konnte (**Abbildung 4a**). Zwischen dem Haarzellbereich und den weiteren untersuchten Arealen des OCs und der LW konnten Unterschiede mit den Signifikanzwerten von $p < 0,0001$; $p = 0,0017$; $p = 0,0009$; $p < 0,0001$ (**Abbildung 4a**: von links nach rechts; Kruskal-Wallis Test) festgestellt werden. In der LW der Cochlea wurden durchschnittlich mehr MZ als im OC beobachtet, die jedoch keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (**Abbildung 4a**). Generell zeigte sich eine durchschnittliche Anzahl von $0,37 \pm 0,06$ SEM MZ im OC und $1,85 \pm 0,53$ SEM MZ in der LW (**Abbildung 4b**) und konnte mit einem Signifikanzwert von $p = 0,0001$ belegt werden (Mann-Whitney Test; **Abbildung 4b**).

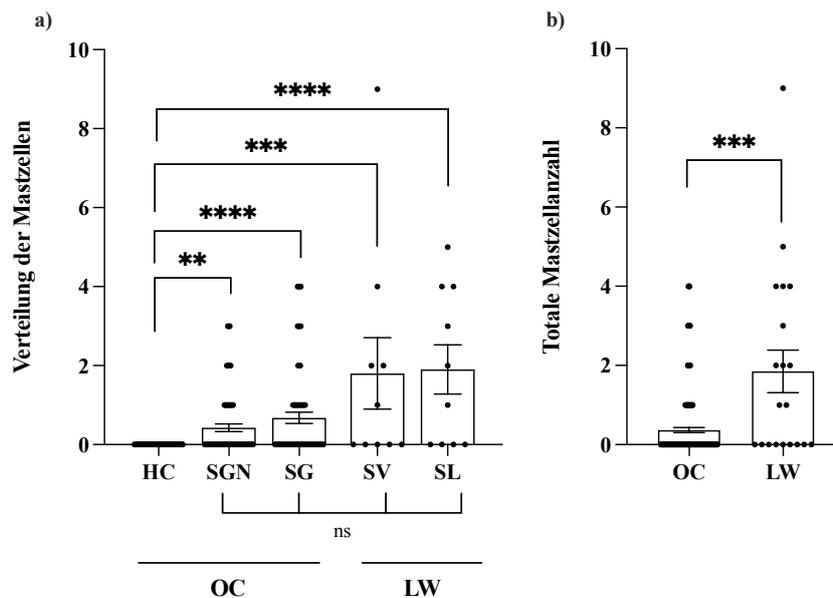


Abbildung 4 Distribution der Mastzellen in unterschiedlichen Arealen der Cochlea.

Die OC und LW Explantate wurden mit fluoreszenzmarkiertem Avidin (Alexa Fluor™ 488 conjugate) und DAPI gefärbt. Zur Datengewinnung wurde die Anzahl der MZ, unabhängig vom Degranulationsstatus, in jedem Explantat ausgezählt und hier als Gesamtanzahl je Areal (n = 9) angegeben. Die Quantifizierung erfolgte bei einer 40x Vergrößerung. **Abbildung 4a** Distribution der MZ im HZ, SGN, SG, SV und SL Areal. **Abbildung 4b** Gesamtmastzellanzahl im OC und LW. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. HZ = Haarzellen, SGN = Spiral Ganglion Neurone, SG = Spiral Ganglion, SV = Stria vascularis, SL = Spiral Ligament. ns > 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (**Abbildung 4a**: Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's; **Abbildung 4b**: Mann-Whitney Test).

4.2.2. Cisplatin führt zur Abnahme der nicht-degranulierten Cochlea-Mastzellen

Um den Effekt von Cisplatin auch auf Cochlea-MZ beweisen zu können, wurden OC und LW Explantate aus C57BL/6-Mäusen mit 10 µM, 15 µM, 20 µM und 30 µM Cisplatin für 24 Stunden behandelt und anschließend mit Avidin gefärbt. Die einzelnen Avidin-positiven MZ wurden in jedem Explantat analysiert und zusammenfassend dargestellt.

In **Abbildung 5a-5e** sind repräsentative Aufnahmen der MZ in der LW der jeweiligen Gruppen dargestellt. Die Kontrollgruppe (**Abbildung 5a**) wies vermehrt intakte, runde und mit Granula gepackte MZ auf. In den Behandlungsgruppen (**Abbildung 5b, 5c, 5d, 5e**) konnte eine deutliche Verstreuung der Granula in den extrazellulären Raum identifiziert werden.

In **Abbildung 6** ist die Anzahl der nicht-degranulierten und degranulierten Avidin-positiven MZ in den OC und LW Explantaten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl nicht-degranulierter MZ (**Abbildung 6a**) nach der Behandlung mit Cisplatin abnahm.

Ergebnisse

Durchschnittlich befanden sich in einem unbehandeltem OC und LW Explantat $2,00 \pm 0,78$ SEM nicht-degranulierte MZ und $0,09 \pm 0,26$ SEM degranulierte MZ. Nach der Behandlung mit $15 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ und $30 \mu\text{M}$ Cisplatin nahm die durchschnittliche Anzahl der nicht-degranulierten MZ mit einem Signifikanzwert von $p = 0,0045$, $p = 0,0334$ und $p = 0,0039$ ab (**Abbildung 6a**: von links nach rechts; Kruskal-Wallis Test), was in Zahlen ausgedrückt $0,25 \pm 0,09$ SEM, $0,70 \pm 0,24$ SEM und $0,06 \pm 0,06$ SEM MZ entsprach. Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Cisplatin wies zwar grafisch eine Reduktion der nicht-degranulierten MZ auf, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe errechnet werden. Ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl der degranulierten MZ konnte in keiner der Behandlungsgruppen errechnet werden. Lediglich konnte eine Zunahme der degranulierten MZ nach einer Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Cisplatin graphisch beobachtet werden.

Somit konnte mit dieser Erkenntnis gezeigt werden, dass Cisplatin eine signifikante Abnahme von nicht-degranulierten Cochlea-MZ initiiert. Anzumerken ist hier jedoch, dass wenn MZ komplett degranulieren, diese auch nicht mit Avidin zu färben sind. Daher kann es sein, dass mehr degranulierte MZ vorhanden waren als ermittelt werden konnte.

Darüber hinaus ist in **Abbildung 7** zu erkennen, dass mit steigender Cisplatin-Konzentration die MZ-Anzahl in den Explantaten (OC und LW zusammengefasst) abnahm. Durchschnittlich befanden sich in einem unbehandeltem Explantat, unabhängig vom MZ-Degradationsstadium, $1,58 \pm 0,42$ SEM MZ. Nach der Behandlung mit $15 \mu\text{M}$ Cisplatin nahm die durchschnittliche MZ-Anzahl zwar ab, erwies sich jedoch nur bei der $20 \mu\text{M}$ und $30 \mu\text{M}$ Gruppe als signifikant ($p = 0,0398$ und $p = 0,0360$ Kruskal-Wallis Test). In der Gruppe, die mit $10 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt wurde, konnte ein Anstieg der MZ auf $2,31 \pm 0,75$ SEM verzeichnet werden, was jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwies.

Ergebnisse

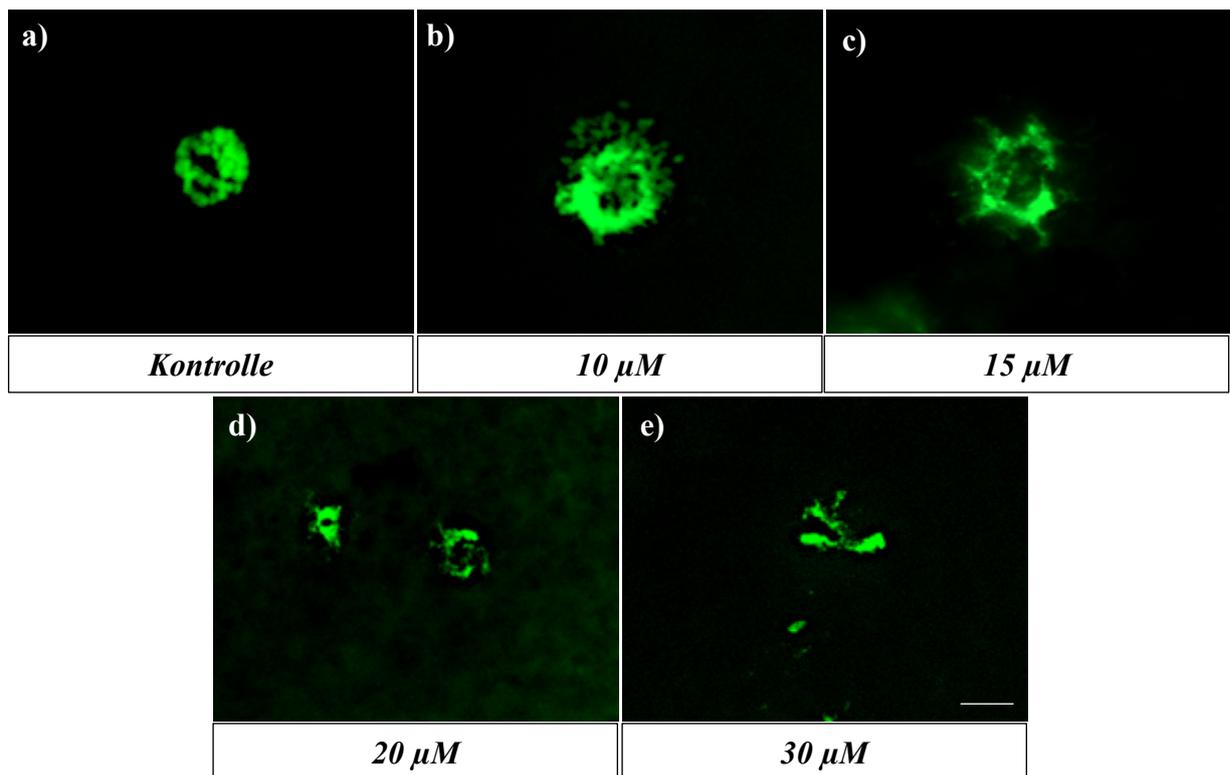


Abbildung 5 Repräsentative Aufnahmen der Cochlea-Mastzellen nach der Behandlung mit Cisplatin.

Hier sind MZ der LW abgebildet. Die MZ wurden mit fluoreszenzmarkiertem Avidin (Alexa Fluor™ 488 conjugate) gefärbt und bei einer 40-fachen Vergrößerung fotografiert. Anschließend wurden die Bilder zugeschnitten, sodass eine Nahaufnahme der MZ erwirkt wurde. **Abbildung 5a** Cochlea-MZ, die nur mit Kulturmedium ohne Zusätze behandelt wurde (Kontrolle). **Abbildung 5b** Cochlea-MZ, die eine Behandlung mit 10 μM Cisplatin erfuhr. **Abbildung 5c** Cochlea-MZ, die mit 15 μM Cisplatin behandelt wurde. **Abbildung 5d** Cochlea-MZ, die mit 20 μM Cisplatin behandelt wurde. **Abbildung 5e** Cochlea-MZ, die mit 30 μM Cisplatin kultiviert wurde. Der Maßstab entspricht 10 μm.

Ergebnisse

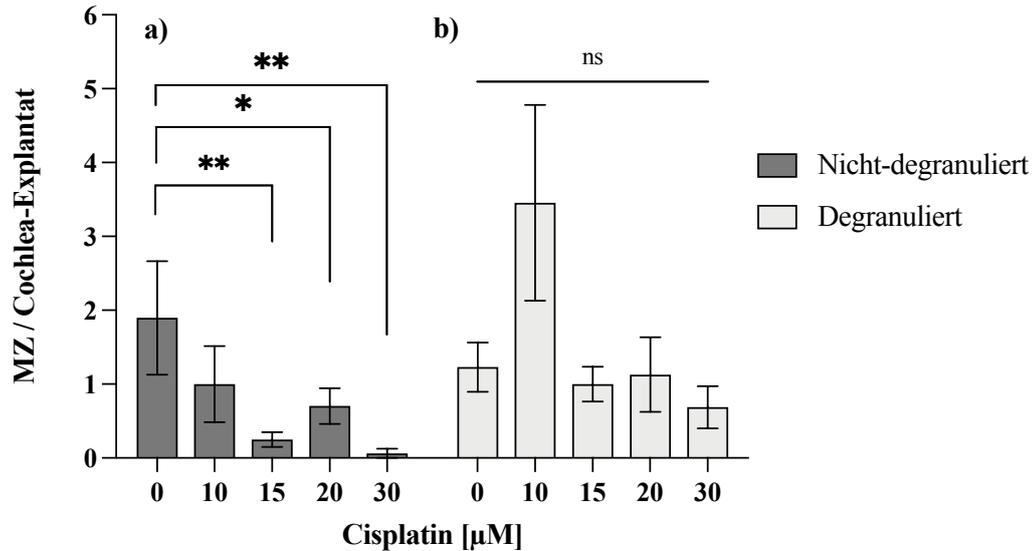


Abbildung 6 Cisplatin bewirkt eine Abnahme von nicht-degranulierten Avidin-positiven Cochlea-Mastzellen und in niedrigen Konzentrationen eine Zunahme von degranulierten Cochlea-Mastzellen.

Die nicht-degranulierten (a) und degranulierten (b) MZ wurden entlang der gesamten OC und LW Explantate ausgezählt und zusammengefasst. Die Kontrollgruppe (n = 9) wurde mit Kulturmedium ohne jegliche Zusätze für 24 h kultiviert. Die Behandlungsgruppen wurden jeweils mit 10 µM (n = 10), 15 µM (n = 4), 20 µM (n = 12) und 30 µM (n = 4) Cisplatin für 24 h behandelt. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *p < 0,05; **p < 0,01; (Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's).

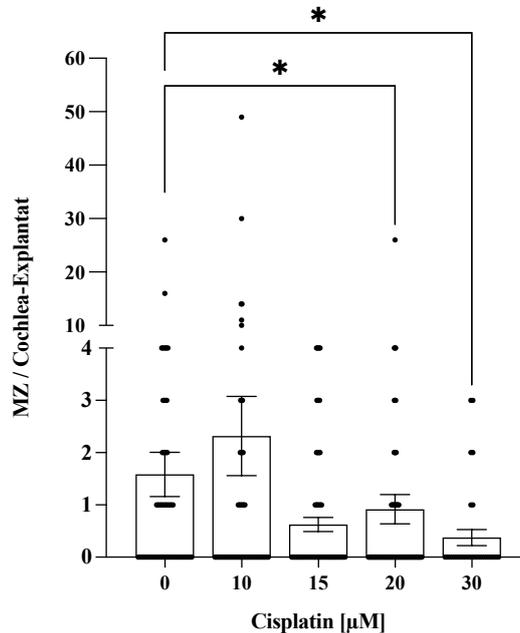


Abbildung 7 Cisplatin bewirkt eine Reduktion der Cochlea-Mastzellen bei höheren Konzentrationen.

Die nicht-degranulierten und degranulierten MZ wurden entlang der gesamten OC und LW Explantaten ausgezählt und hier zusammenfassend dargestellt. Die Kontrollgruppe (n = 9) wurde mit Kulturmedium ohne Zusätze für 24 h kultiviert. Die Behandlungsgruppen wurden mit 10 µM (n = 10), 15 µM (n = 4), 20 µM (n = 12) und 30 µM (n = 4) Cisplatin für 24 h behandelt. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *p < 0,05; (Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's).

4.3. Cromoglicinsäure wirkt protektiv gegen Cisplatin-induzierter Ototoxizität

Da gezeigt werden konnte, dass Cisplatin zur Abnahme von nicht-degranulierten Cochlea-MZ führt, wurde im nächsten Versuchsdesign untersucht, ob CS, dessen mastzellstabilisierende Wirkung am PCMC-Modell bereits bestätigt wurde, einen protektiven Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Ototoxizität haben könnte.

4.3.1. Cromoglicinsäure in höheren Konzentrationen sorgt für eine Abnahme intakter Haarzellen

Zunächst einmal wurden die Explantate mit 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM CS für 24 Stunden behandelt, um einen möglich bestehenden ototoxischen Effekt von CS aufzuzeigen und somit ein falsch-negatives Ergebnis ausschließen zu können. Als Kontrollgruppe galten Explantate, die alleinig mit Kulturmedium ohne den Zusatz von CS behandelt wurden.

In **Abbildung 8** ist die Auswirkung von CS auf die Anzahl der intakten IHZ und ÄHZ aufgezeigt. Die Quantifizierung defekter und fehlender Haarzellen wurde nicht grafisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine Behandlung mit 100 μM CS ($p = 0,0324$; two-way ANOVA) und 200 μM CS ($p = 0,0064$; two-way ANOVA) zu einer signifikanten Reduktion der intakten IHZ im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass mit der Abnahme von intakten IHZ der prozentuelle Anteil defekter IHZ anstieg (Daten nicht gezeigt). Die ÄHZ wiesen eine ähnliche Reaktion auf die Behandlung mit CS auf. Auch hier führte die Behandlung mit 100 μM CS zu einer signifikanten Abnahme der intakten ÄHZ ($p = 0,0252$; two-way ANOVA), während 200 μM CS keinen Effekt aufwies. Diese Ergebnisse waren von wichtiger Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass hohe CS-Konzentrationen eine haarzelldegenerierende Wirkung (100 μM und 200 μM) besaßen und dadurch diese Konzentrationen auf darauffolgenden Experimenten ausgeschlossen werden konnten. Somit kann eine eventuelle Protektion von Cisplatin-induzierten Haarzellverlust als Folge der CS-Behandlung mit Konzentrationen, die keinen Effekt auf die Haarzellen hatten, verstanden werden.

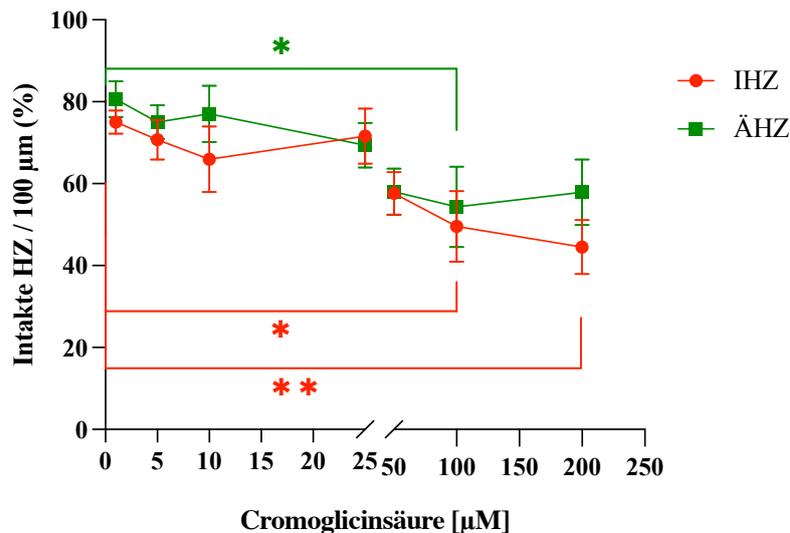


Abbildung 8 Cromoglicinsäure bewirkt in hohen Konzentrationen eine Reduktion der intakten Haarzellen.

Die Haarzellen wurden entlang des gesamten OC Explantats quantifiziert. Hierzu erfolgte die Einteilung der OC Explantate in 10 Abschnitte, in denen jeweils drei repräsentative Bereiche (je 100 µm) ausgezählt wurden. Der prozentuelle Anteil intakter IHZ (rot) und ÄHZ (grün) wurde über die gesamte Länge des OC Explantats dargestellt. Die Kontrollgruppe (n = 4) wurde für 24 h mit Kulturmedium ohne den Zusatz von CS kultiviert. Die Behandlungsgruppen (je n = 4) wurden mit 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM CS für 24 h behandelt. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *p < 0,05; **p < 0,01 (two-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunnett).

4.3.2. Bestimmung der LD₅₀ Konzentration von Cisplatin

Um eine einheitliche Konzentration für die Behandlung mit Cisplatin gewährleisten zu können, wurde die LD₅₀ von Cisplatin bestimmt. Hierzu wurden die Explantate mit 5 µM, 10 µM, 15 µM und 20 µM Cisplatin für 24 Stunden behandelt. Die Konzentrationen (Abszisse) wurde im logarithmischen Maßstab angegeben, sodass man in einem linearen Koordinatensystem eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve erhielt (**Abbildung 9**). Es ist zu beobachten, dass mit steigender Cisplatin-Konzentration die intakten Haarzellen abnahmen. Um anschließend die LD₅₀ Konzentration zu bestimmen, wurde der Wert auf der Abszisse abgelesen, der den Prozentwert 50 der intakten IHZ (**Abbildung 9a**) und ÄHZ (**Abbildung 9b**) repräsentierte. Da sowohl die IHZ (LD₅₀: 13,54 µM) als auch die ÄHZ (LD₅₀: 12,43 µM) unterschiedliche LD₅₀ Konzentrationen aufwiesen, haben wir uns für 15 µM Cisplatin als einheitliche Konzentration festgelegt.

Ergebnisse

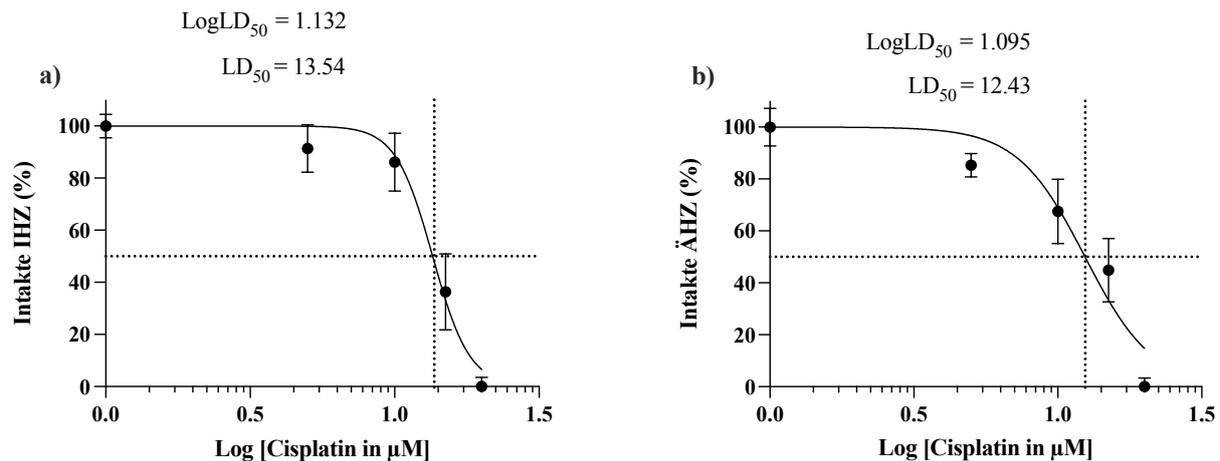


Abbildung 9 Dosis-Wirkungs-Kurve von Cisplatin in Abhängigkeit zum prozentuellen Anteil intakter Haarzellen.

Die Zellüberlebensrate wurde anhand des prozentuellen Anteiles intakter IHZ und ÄHZ festgestellt. Hierzu wurden die intakten Haarzellen entlang des gesamten OC Explantats (je $100 \mu\text{m}$) ausgezählt. Die Kontrollgruppe ($n = 3$) wurde mit Kulturmedium ohne jegliche Zusätze für 24 h kultiviert. Die Behandlungsgruppen (je $n = 4$) wurden mit $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt. Die Werte wurden normalisiert und die Konzentrationen (Abszisse) in einem logarithmischen Maßstab angegeben. **Abbildung 9a** Dosis-Wirkungs-Kurve für intakte IHZ. **Abbildung 9b** Dosis-Wirkungs-Kurve für intakte ÄHZ. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

4.3.3. Cromoglicinsäure inhibiert die Cisplatin-induzierte Degranulation von Cochlea-Mastzellen

Nach der Bestimmung der jeweiligen Behandlungskonzentrationen von Cisplatin und CS, wurde anschließend die Wechselwirkung dieser Substanzen auf die Cochlea- MZ und -Integrität untersucht. Hierzu wurden die Explantate mit $15 \mu\text{M}$ Cisplatin und verschiedenen CS-Konzentrationen (5 , 10 , 25 , $50 \mu\text{M}$) behandelt.

In **Abbildung 10** ist die Anzahl der Cochlea-MZ nach der Behandlung mit CS und Cisplatin aufgezeigt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass im Vergleich zu den Cis-CS+ (- +) Gruppen die Anzahl der MZ in der Cisplatin-Gruppe (+ -) signifikant reduziert war (**Abbildung 10**: von links nach rechts; $p = 0,0328$, $p = 0,0002$, $p = 0,0003$, $p = 0,0001$; Kruskal-Wallis Test). Im weiteren Verlauf konnte gezeigt werden, dass CS in den Konzentrationen $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $25 \mu\text{M}$ die Degranulation von Cochlea-MZ in der Anwesenheit von Cisplatin signifikant inhibierte (Vergleich zwischen (+ -) Gruppe und (+ +) Gruppen). In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies einen Signifikanzwert von $p = 0,0037$; $p = 0,0415$; $p = 0,0008$ (**Abbildung 10**: von links nach rechts, Kruskal-Wallis Test).

Ergebnisse

Des Weiteren ist zu erkennen, dass 50 μM CS keine Inhibierung der Cisplatin-induzierten MZ-Degranulation bewirkte (+ +). Auch die alleinige Zugabe von 50 μM CS (- +) verringerte die Anzahl intakter MZ und wies somit keinen Unterschied zur Cisplatin Gruppe auf (+ -).

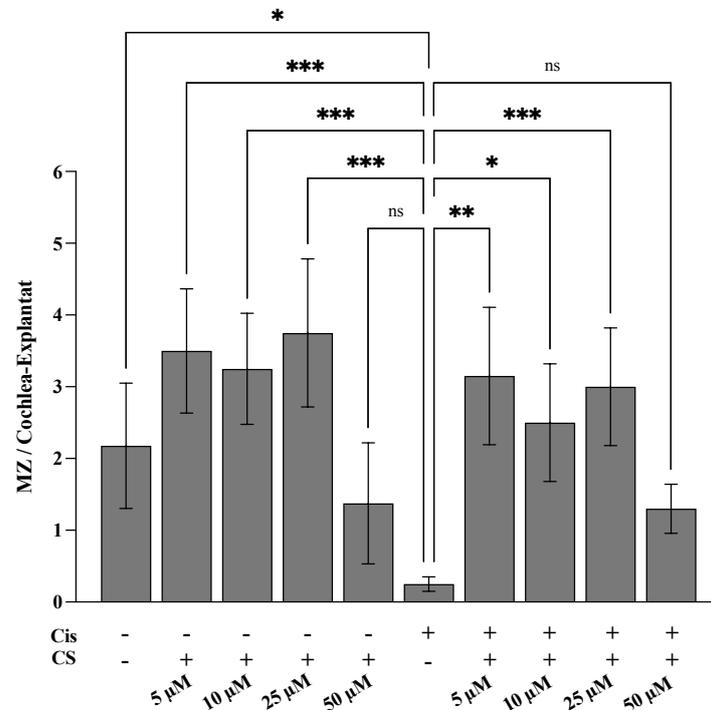


Abbildung 10 Cromoglicinsäure verhindert die Cisplatin-induzierte Degranulation von Cochlea-Mastzellen.

Die Kontrollgruppen (jeweils $n = 4$) wurden entweder nicht behandelt (- -) oder 24 h mit CS (- +; 5, 10, 25 50 μM) inkubiert. Die Behandlungsgruppen (jeweils $n = 4$) wurden 2 h mit 5, 10, 25 und 50 μM CS vorbehandelt und anschließend 24 h mit 15 μM Cisplatin kultiviert (+ +). Sowohl die Kontroll- als auch die Behandlungsgruppen wurden mit der Cisplatin-Gruppe (+ -) verglichen. Die MZ wurden in OC und LW Explantaten ausgezählt. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. ns > 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's).

4.3.4. Cromoglicinsäure inhibiert den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust in Cochlea-Explantaten

Um der Frage nachzugehen, inwiefern CS vor dem Cisplatin-induzierten Haarzellverlust schützt, wurden die Explantate 2 Stunden mit CS (5 μM , 10 μM , 25 μM und 50 μM) vorbehandelt. Anschließend wurden diese Explantate mit 15 μM Cisplatin für weitere 24 Stunden behandelt, um den durch Cisplatin verursachten Haarzellverlust zu induzieren (siehe **Abbildung 1**: Versuchsaufbau). Die intakten, defekten und fehlenden Haarzellen wurden entlang der gesamten OC Explantate quantifiziert und als prozentueller Anteil angegeben.

Ergebnisse

In **Abbildung 11a-d** wurde jedoch nur der Anteil intakter IHZ und ÄHZ dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 15 μM Cisplatin im Vergleich zur Kontrollgruppe (- -) zu einer signifikanten Reduktion intakter IHZ und ÄHZ führte (**Abbildung 11a/b** IHZ: $p < 0,0001$; ÄHZ: $p = 0,0009$; two-way ANOVA), während die Vorbehandlung mit CS die Anzahl intakter Haarzellen wieder ansteigen ließ (+ +). So verursachte die Vorbehandlung mit 5 μM CS im direkten Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 15 μM Cisplatin einen signifikanten Anstieg intakter IHZ ($p = 0,0427$; two-way ANOVA). Auch die Vorbehandlung mit 25 μM CS führte zu einem Anstieg der intakten IHZ mit einem Signifikanzwert von $p = 0,0050$ (two-way ANOVA). Zusätzlich lässt sich in allen Gruppen, die eine Vorbehandlung mit CS erfuhren und anschließend eine Behandlung mit Cisplatin erhielten (+ +), weder einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (- -) noch zur alleinig mit CS behandelten Gruppe (- +) feststellen (**Abbildung 11a**). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass mit der Zunahme von intakten IHZ der prozentuelle Anteil defekter IHZ sank (Daten nicht gezeigt). In **Abbildung 11b** ist verdeutlicht, dass auch die Vorbehandlung mit CS den Anstieg intakter ÄHZ initiierte (+ +). So zeigte die Vorbehandlung mit 5 μM CS im direkten Vergleich zur alleinig mit 15 μM Cisplatin behandelten Gruppe einen signifikanten Anstieg intakter ÄHZ ($p = 0,0237$; two-way ANOVA). Anders als bei den IHZ wirkte 25 μM CS nicht protektiv auf die ÄHZ. Auch hier ließen sich in allen Gruppen, die mit CS vorbehandelt und anschließend mit 15 μM Cisplatin kultiviert wurden, keinen signifikanten Unterschied mehr zur alleinig mit CS behandelten Gruppe und Kontrollgruppe feststellen (**Abbildung 11b**). In **Abbildung 11c und 11d** ist die Wirkung von 10 μM und 50 μM CS dargestellt. Es ist zu erkennen, dass diese Konzentrationen keinen protektiven Einfluss auf den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust hatten. In **Abbildung 12** sind die Haarzellen aus den Kontroll- und Behandlungsgruppen im visuellen Vergleich dargestellt. Die Haarzellen der Kontrollgruppe (**Abbildung 12a**) wiesen im direkten Vergleich zur Behandlungsgruppe (**Abbildung 12b und 12c**) eine typische Haarzellmorphologie auf. In **Abbildung 12d** ist gezeigt, dass die IHZ und ÄHZ nach der Behandlung mit 15 μM Cisplatin Haarzellläsionen in Form von Stereozilienverlust bzw. Verklebung aufwiesen, während die Haarzellen, die zuvor mit 5 μM CS (**Abbildung 12e**) und 25 μM CS (**Abbildung 12f**) vorbehandelt wurden, eine visuelle Reduktion dieser Läsionen aufzeigten. Es ließ sich somit ein morphologischer Unterschied zwischen der Cisplatin-Gruppe und der Cisplatin + CS-Gruppe ermitteln, während es keinen ersichtlichen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, der CS-Gruppe und der Cisplatin + CS-Gruppe gab. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Vorbehandlung der Cochlea-Explantate mit 5 μM und 25 μM CS den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust signifikant reduzierte.

Ergebnisse

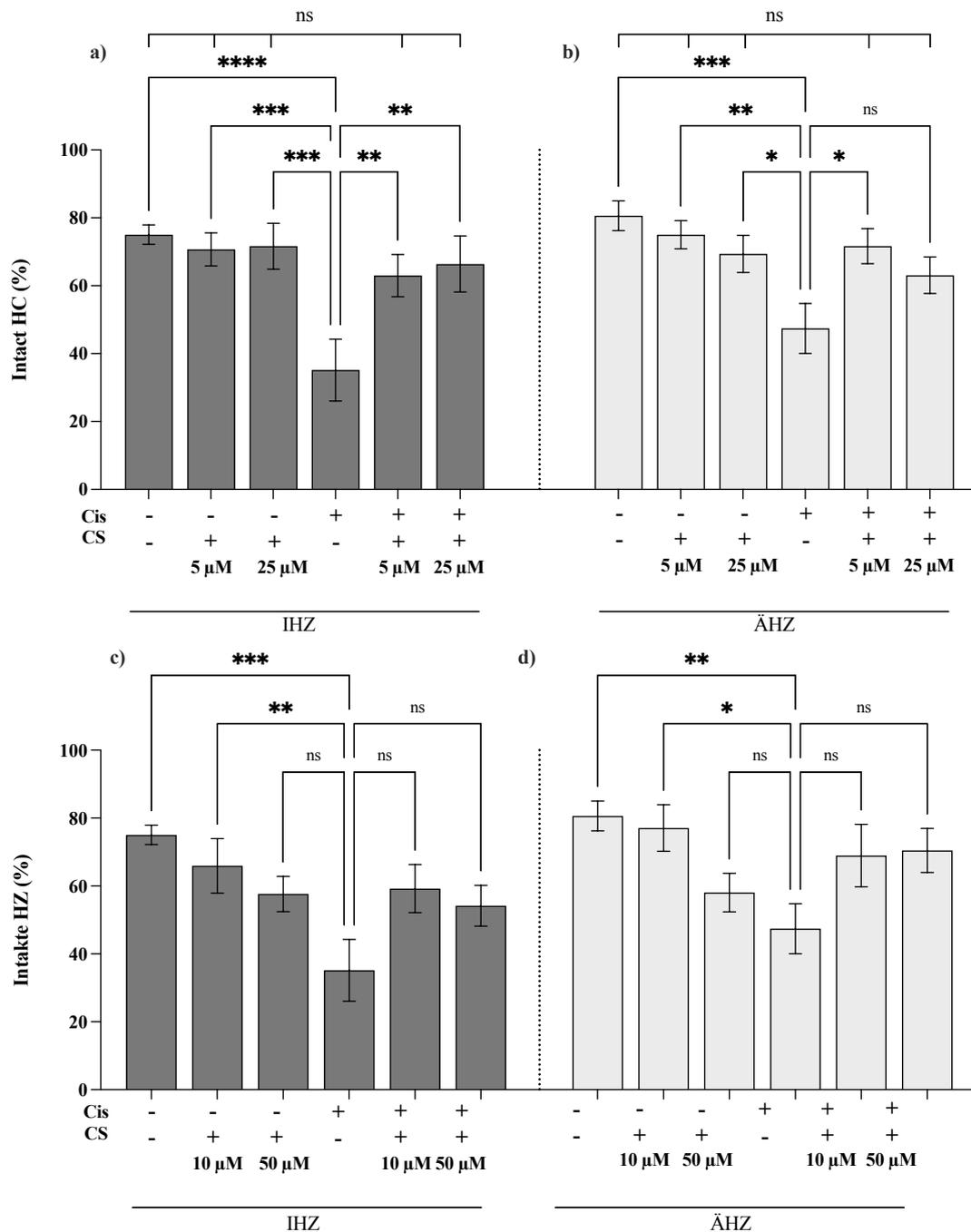


Abbildung 11 Cromoglicinsäure wirkt protektiv gegen den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust.

Der prozentuelle Anteil intakter Haarzellen wurde über die gesamte Cochlea ausgezählt. Die Kontrollgruppen (jeweils n = 4) wurden entweder nicht behandelt (- -) oder 24 h mit CS (- +; 5, 10, 25 50 µM) inkubiert. Die Behandlungsgruppen (jeweils n = 4) wurden 2 h mit 5, 10, 25 und 50 µM CS vorbehandelt und anschließend 24 h mit 15 µM Cisplatin kultiviert (+ +). Sowohl die Kontroll- als auch die Behandlungsgruppen wurden mit der Cisplatin-Gruppe (+ -) verglichen. **Abbildung 11a/b** Der prozentuelle Anteil intakter IHZ und ÄHZ in Kontroll- und Behandlungsgruppen, die mit 5 µM und 25 µM CS behandelt wurden. **Abbildung 11c/d** Der prozentuelle Anteil intakter IHZ und ÄHZ in Kontroll- und Behandlungsgruppen, die mit 10 µM und 50 µM CS behandelt wurden. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. ns > 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (two-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunnett).

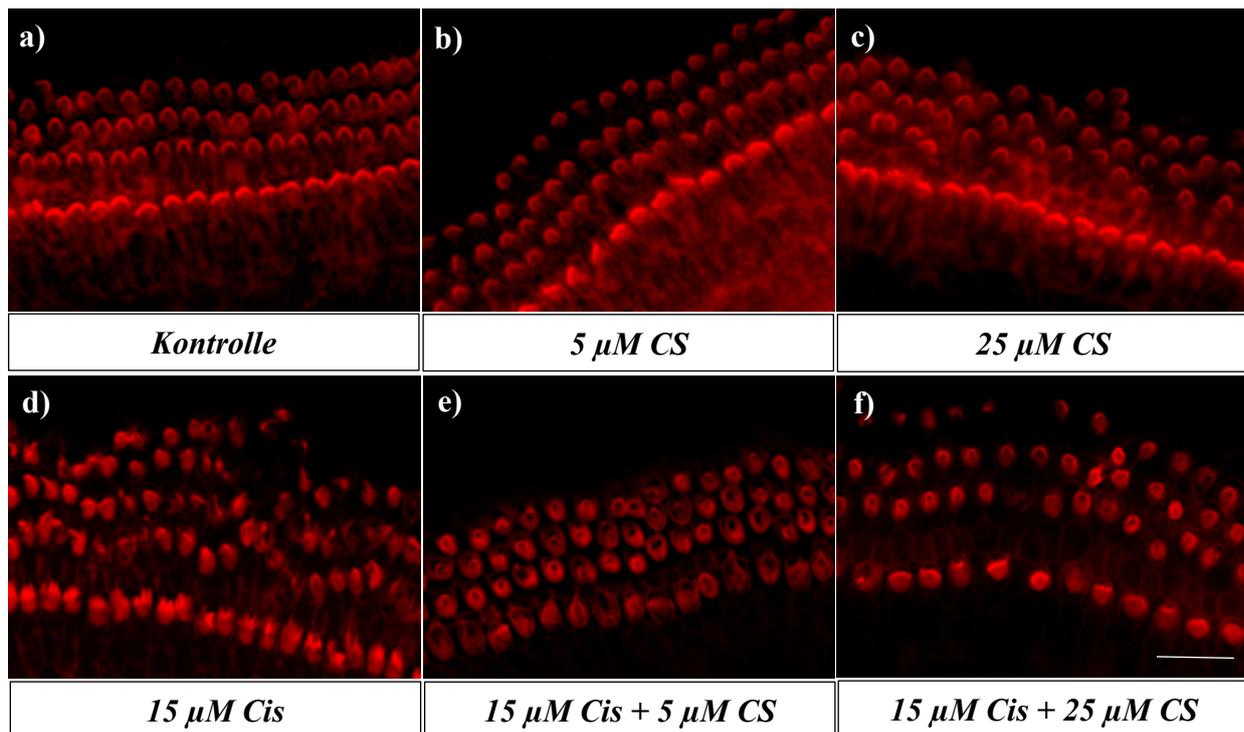


Abbildung 12 Repräsentative Aufnahmen der Haarzellen mit den unterschiedlichen Behandlungskonzepten.

Die Haarzellen wurden mit iFluor® 594-konjugiertem Phalloidin gefärbt und mit dem 40x Objektiv fotografiert. Anschließend wurden die Bilder zugeschnitten, sodass eine Nahaufnahme der Haarzellen erwirkt wurde. **Abbildung 12a** Kontrollgruppe. **Abbildung 12b/c** Haarzellen, die für 24 h mit 5 µM (b) und 25 µM (c) CS behandelt wurden. **Abbildung 12d** Haarzellen, die für 24 h mit 15 µM Cisplatin behandelt wurden. **Abbildung 12e/f** Haarzellen, die mit 5 µM (e) und 25 µM (f) CS für 2 h vorbehandelt wurden und anschließend für weitere 24 h mit 15 µM Cisplatin. Der Maßstab entspricht 10 µm.

4.3.5. Cromoglicinsäure inhibiert die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in Cochlea-Explantaten

Da gezeigt werden konnte, dass der Cisplatin-induzierte Haarzellverlust durch CS signifikant verhindert werden konnte, galt im nächsten Schritt zu klären, ob CS auch einen protektiven Effekt auf die neurotoxische Wirkung von Cisplatin hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Explantate im ersten Versuchsdesign alleinig mit CS ((- +) 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM) behandelt. Im zweiten Versuchsdesign erfolgte eine Vorbehandlung der Explantate mit CS (5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM) für 2 Stunden und anschließend eine Behandlung mit 15 µM Cisplatin für weitere 24 Stunden (+ +). Der Flächenanteil der SGN zwischen der Habenula perforata und IHZ-Reihe (ROI) wurden in einem binären Bild berechnet und mit der Kontrollgruppe verglichen. In **Abbildung 13** ist zu erkennen, dass Cisplatin im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion der SGN initiierte ($p = 0,0193$; two-way ANOVA).

Ergebnisse

Zusätzlich zeigt die Behandlung mit 10 μM CS eine Abnahme von SGN mit einem Signifikanzwert von $p = 0,0034$ (two-way ANOVA). Bei den anderen CS-Konzentrationen (- +) ließ sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe (- -) feststellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Explantate mit 5 μM , 10 μM und 50 μM CS (+ +) keinen signifikanten Unterschied zur alleinig mit Cisplatin behandelten Gruppe (+ -) aufwiesen. Eine höchst signifikante Zunahme der SGN ließ sich nur bei der Vorbehandlung mit 25 μM CS erzielen ($p < 0,0001$; two-way ANOVA).

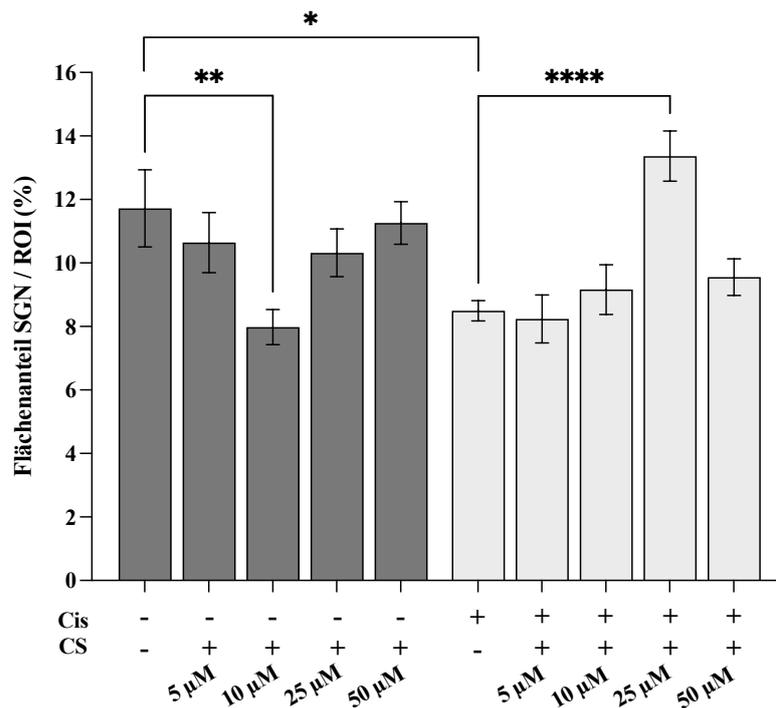


Abbildung 13 Die Vorbehandlung der Cochlea-Explantate mit 25 μM Cromoglicinsäure führt zu einer Zunahme der SGN Dichte.

Der Flächeninhalt der SGN wurden entlang der gesamten OC Explantate je 100 μm bestimmt. Hierzu wurde der Flächeninhalt zwischen der Habenula perforata und der IHZ-Reihe (ROI) gemessen und als prozentueller Anteil angegeben. Die Kontrollgruppen (jeweils $n = 4$) wurden entweder nicht behandelt (- -) oder 24 h mit CS (- +; 5, 10, 25 50 μM) inkubiert. Die Behandlungsgruppen (jeweils $n = 4$) wurden 2 h mit 5, 10, 25 und 50 μM CS vorbehandelt und anschließend 24 h mit 15 μM Cisplatin kultiviert (+ +). Sowohl die Kontroll- als auch die Behandlungsgruppen wurden mit der Cisplatin-Gruppe (+ -) verglichen. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (two-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunnett).

4.4. Die Rolle des Histamin-Rezeptors in Cisplatin-induzierter Ototoxizität

Da bereits gezeigt wurde, dass CS die ototoxische Wirkung von Cisplatin signifikant verhindern konnte, galt als Nächstes zu klären, inwiefern Histamin eine Rolle in diesem Prozess spielt. Es ist bekannt, dass Histamin einer der Hauptmediatoren in den Granula der MZ darstellt und diese während des Degranulationsprozesses ausgeschüttet wird (15, 175). Aufgrund der zuvor beschriebenen Erkenntnisse, dass Cisplatin zur Degranulation von MZ führt, galt daraufhin zu untersuchen, ob Cisplatin auch die Genexpression des Hrh1 und Hrh3 verändert. Darüber hinaus sollte geklärt werden, inwiefern Histamin bei diesen pathologischen Prozessen beteiligt ist. Hierzu wurden die Explantate mit Agonisten und Antagonisten des Hrh1 und Hrh3 behandelt.

4.4.1. Die Expression des Hrh1 und Hrh3 Gens wird in der Cochlea durch Cisplatin moduliert

In **Abbildung 14** ist die zeitabhängige Expression der untersuchten Hrh1 und Hrh3 Gene nach der Behandlung mit Cisplatin aufgezeigt. Es wurden OC, LW und Modiolus Explantate aus C57BL/6-Mäusen genutzt. Die Gewebe wurden nach der Präparation für 24 Stunden in Kulturmedium inkubiert und anschließend mit 15 μ M Cisplatin behandelt. Die Expression der Gene wurde nach 2, 4, 6 und 24 Stunden gemessen. In **Abbildung 14a** ist die Expression des Hrh1 und Hrh3 Gens in den OC Explantaten im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,00-fach \pm 0,01 SEM) verdeutlicht. Es ist zu erkennen, dass die Expression des Hrh3 Gens nach 4 (0,47-fach \pm 0,04 SEM), 6 (0,54-fach \pm 0,01 SEM) und 24 Stunden (0,32-fach \pm 0,18 SEM) signifikant runterreguliert wurde (von links nach rechts: $p = 0,0190$; $p = 0,0320$; $p = 0,0064$; one-way ANOVA). Die Hrh1 Expression hingegen wies über alle Inkubationszeiten keinen messbaren Unterschied zur Kontrollgruppe auf. In den LW Explantaten konnte eine signifikante Herunterregulierung des Hrh1 Gens (von links nach rechts: $p = 0,0016$; $p = 0,0012$; $p = 0,0006$; $p = 0,0006$; one-way ANOVA) und des Hrh3 (von links nach rechts: $p = 0,0113$; $p = 0,0113$; $p = 0,0075$; $p = 0,0058$; one-way ANOVA) beobachtet werden (**Abbildung 14b**). In der Kontrollgruppe wurde das Hrh1 Gen 1,00-fach \pm 0,14 SEM exprimiert und in den Behandlungsgruppen jeweils 0,24-fach \pm 0,05 SEM nach 2 Stunden, 0,19-fach \pm 0,04 SEM nach 4 Stunden, 0,07-fach \pm 0,04 SEM nach 6 Stunden und 0,05-fach \pm 0,00 SEM nach 24 Stunden. Die Expression des Hrh3 Gens in der LW wies ein ähnliches Muster auf. So konnte in der Kontrollgruppe eine 1,03-fach \pm 0,23 SEM Expression gemessen werden und in den Behandlungsgruppen jeweils 0,19-fach \pm 0,00 SEM nach 2 Stunden, 0,19-fach \pm 0,11 SEM nach 4 Stunden, 0,10-fach \pm 0,01 SEM nach 6 Stunden und 0,04-fach \pm 0,00 SEM nach 24 Stunden.

Ergebnisse

In **Abbildung 14c** kann festgestellt werden, dass die Expression des *Hrh1* in den Modioli nach 2 ($p = 0,0047$; one-way ANOVA) und 6 Stunden ($p = 0,0105$; one-way ANOVA) signifikant hochreguliert wurde, während nach 4 bzw. 24 Stunden eine unveränderte oder eine leicht nach unten regulierte Expression nachgewiesen werden konnte. In der Kontrollgruppe wurde das *Hrh1* Gen 1,04-fach $\pm 0,27$ SEM exprimiert in den Behandlungsgruppen jeweils 4,57-fach $\pm 0,81$ SEM nach 2 Stunden, 1,38-fach $\pm 0,13$ SEM nach 4 Stunden, 3,98-fach $\pm 0,18$ SEM nach 6 Stunden und 1,31-fach $\pm 0,15$ SEM nach 24 Stunden. Auch in den Modioli wies die *Hrh3* Expression über alle Inkubationszeiten keinen messbaren Unterschied zur Kontrollgruppe auf.

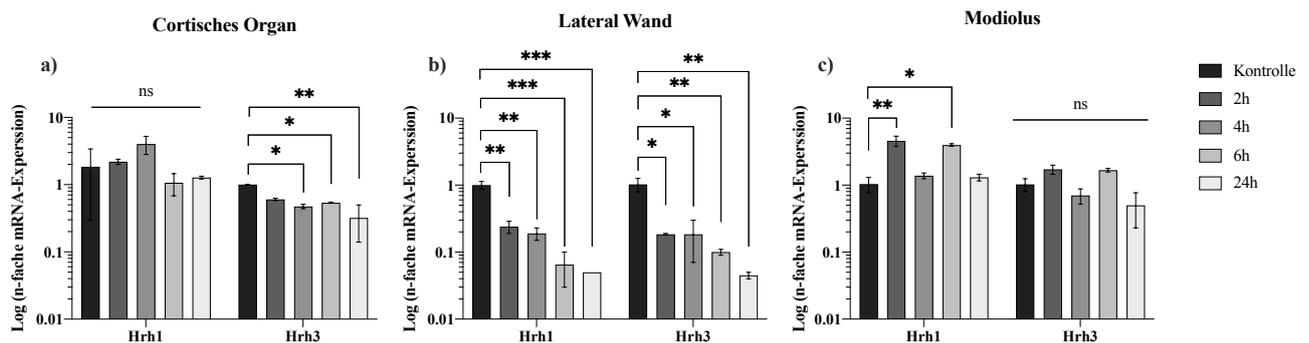


Abbildung 14 Relative Expression des *Hrh1* und *Hrh3* Gens nach der Behandlung mit 15 μM Cisplatin.

Die RNA-Proben aus OC (**Abbildung 14a**), LW (**Abbildung 14b**) und Modioli (**Abbildung 14c**) Explantate stammen aus C57BL/6-Mäusen, die mit 15 μM Cisplatin für 2, 4, 6 und 24 h behandelt wurden. Die Kontrollen wurden jeweils mit Kulturmedium ohne Zusätze behandelt. Die n-fache mRNA-Expression nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde mit der n-fachen mRNA-Expression in den Kontrollgruppen verglichen. Die n-fache mRNA-Expression (Ordinate) wurden in einem logarithmischen Maßstab vorgegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. ns $> 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunnett).

4.4.2. Der Histamin-Rezeptor 1/3 Agonisten und Antagonisten weist einen Effekt auf die Anzahl intakter Haarzellen auf

Um den Effekt von Histamin auf die Haarzellen dazustellen, wurden die OC Explantate mit dem *Hrh1* Agonist (2-Pyridylethylamine dihydrochloride), *Hrh1* Antagonisten (S-(+)-Chlorpheniramine maleate salt), *Hrh3* Agonisten (Immethridine dihydrobromide) und *Hrh3* Antagonisten (Ciproxifan maleate) in den Konzentrationen 10 μM , 50 μM und 100 μM für 24 Stunden behandelt. In **Abbildung 15** ist die Auswirkung des *Hrh1* und *Hrh3* Agonisten als auch Antagonisten auf den prozentuellen Anteil intakter IHZ und ÄHZ dargestellt.

Ergebnisse

Evaluert man die in der **Abbildung 15a** aufgezeigten Werte der IHZ-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, so ist zu beobachten, dass die Behandlung mit dem Hrh1 Agonisten (50 μM) eine signifikante Abnahme der intakten IHZ zufolge hatte ($p = 0,0024$; two-way ANOVA). Dahingegen konnte kein Unterschied in der Anzahl intakter IHZ nach der Behandlung mit dem Hrh1 Antagonist beobachtet werden. Auch wiesen die ÄHZ nach der Behandlung mit dem Hrh1 Agonisten und Antagonisten keinen messbaren Unterschied zur Kontrollgruppe auf.

In **Abbildung 15b** ist zu beobachten, dass die Behandlung der Explantate mit dem Hrh3 Agonisten zu einer signifikanten Zunahme intakter IHZ (10 μM : $p = 0,0063$ und 100 μM : $p = 0,0357$; two-way ANOVA) führte, während die Behandlung mit dem Hrh3 Antagonisten (50 μM : $p = 0,0206$; two-way ANOVA) eine signifikante Reduktion der intakten IHZ erzielte. Zusätzlich leitete die Behandlung der Explantate mit dem Hrh3 Antagonisten (10 μM : $p = 0,0167$ und 50 μM : $p = <0,0001$; two-way ANOVA) eine signifikante Reduktion der intakten ÄHZ ein. Die Kultivierung der Cochlea-Explantate mit dem Hrh3 Agonisten zeigte keinen messbaren Unterschied in der Anzahl der intakten ÄHZ. Sowohl in den IHZ als auch ÄHZ konnte die 100 μM -Gruppe des Hrh3 Antagonisten nicht ausgewertet werden, da mehr als 80 % der Haarzellen degeneriert waren und somit keine Basis für eine zuversichtliche Quantifizierung gegeben war.

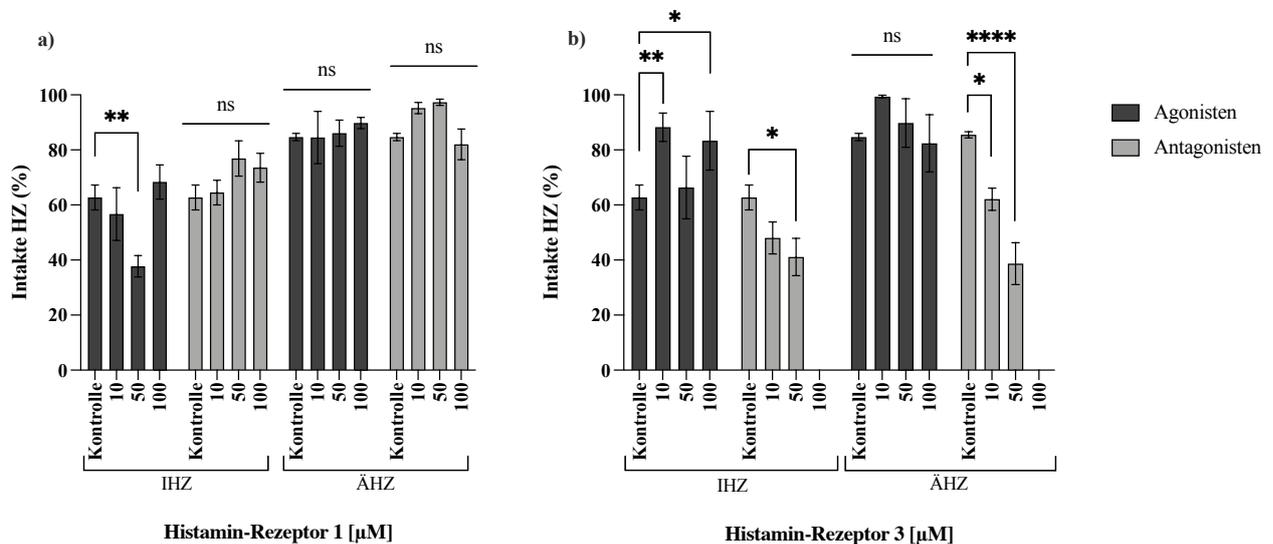


Abbildung 15 Der Einfluss des Hrh1/3 Agonisten und Antagonisten auf den prozentuellen Anteil intakter Haarzellen.

Die intakten Haarzellen wurden entlang der gesamten OC Explantate je 100 μm ausgezählt. Die Kontrollgruppen (je $n = 4$) wurden mit Kulturmedium ohne Zusätze für 24 h behandelt. Die Behandlungsgruppen (je $n = 4$) erfuhren entweder eine Behandlung mit dem Hrh1 Agonisten/Antagonisten oder dem Hrh3 Agonisten/Antagonisten in den Konzentrationen 10 μM , 50 μM und 100 μM .

Abbildung 15a Der prozentuelle Anteil intakter Haarzellen nach der Behandlung mit dem Hrh1 Agonisten und Hrh1 Antagonisten.

Abbildung 15b Der prozentuelle Anteil intakter Haarzellen nach der Behandlung mit dem Hrh3 Agonisten und Hrh3 Antagonisten.

Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. ns $> 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (two-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunnett).

4.5. Charakterisierung der Cochlea im C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodell

Neben den Einflüssen der MZ in pathologischen Prozessen der Cochlea galt als weiteres Ziel, die physiologischen Funktionen der Cochlea-MZ zu charakterisieren. Hierzu wurde die Morphologie der Haarzellen und SGN im C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodell untersucht. Demzufolge sollten im Rahmen dieser Versuche die Rolle der MZ auf die Entwicklung der Cochlea analysiert werden.

4.5.1. Die Haarzellen in *Mcl-1* modifizierten Cochlea-Explantaten weisen eine physiologische Form und Anzahl auf

Die OC Explantate wurden entlang der 2 ½ Windung in drei Fragmente eingeteilt: apikal, medial und basal. Diese Fragmente wurden mit dem fluoreszenzmarkierten Phalloidin gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Hierzu wurden heterozygote (*Mcl-1*^{+/*fl*}) und homozygote (*Mcl-1*^{*fl/fl*}) sowie die C57BL/6 Wildtyp (*Mcl-1*^{+/+}) Geschwister verwendet. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte erst nach der Präparation, somit konnte eine statistisch verblindete Präparation stattfinden.

In **Abbildung 16a, 16b und 16c** sind die Haarzellen von *Mcl-1*^{+/+}, *Mcl-1*^{+/*fl*} und *Mcl-1*^{*fl/fl*} Mäusen im visuellen Vergleich dargestellt. Die Haarzellen in heterozygoten *Mcl-1*^{+/*fl*} und homozygoten *Mcl-1*^{*fl/fl*} OC Explantaten wiesen im direkten Vergleich zu den Wildtyp- *Mcl-1*^{+/+} OC Explantaten normale und intakte IHZ und ÄHZ auf. Es ließ sich zwischen den Gruppen kein morphologischer Unterschied ermitteln. Zusätzlich wurden die intakten, defekten und fehlenden Haarzellen je 100 µm ausgezählt (Daten für defekte und fehlende Haarzellen sind nicht gezeigt). In **Abbildung 17a** ist dargestellt, dass die Anzahl der intakten IHZ in *Mcl-1*^{+/*fl*} und *Mcl-1*^{*fl/fl*} OC Explantaten keinen signifikanten Unterschied zur Wildtyp-Gruppe aufzeigte. Betrachtete man jedoch den prozentuellen Anteil der intakten ÄHZ in *Mcl-1*^{+/+}, *Mcl-1*^{+/*fl*} und *Mcl-1*^{*fl/fl*} OC Explantaten, so ließ sich im apikalen und medialen Fragment signifikante Unterschiede kalkulieren (**Abbildung 17b**). Im apikalen Fragment konnte zwischen der *Mcl-1*^{+/*fl*} und *Mcl-1*^{*fl/fl*} Gruppe ein Unterschied mit dem Signifikanzwert von $p = 0,0010$ (Kruskal-Wallis Test) errechnet werden, während ein signifikanter Unterschied im medialen Abschnitt zwischen der *Mcl-1*^{+/+} und *Mcl-1*^{+/*fl*} Gruppe beobachtet werden konnte ($p = 0,0377$; Kruskal-Wallis Test). Zusammenfassend konnte durchschnittlich je 100 µm 12 intakte ÄHZ und 6 intakte IHZ beobachtet werden. Die Anzahl der defekten Haarzellen erstreckte sich von durchschnittlich 4 IHZ auf 0,5 ÄHZ (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Summiert man alle defekten Haarzellen über alle Gruppen hinweg so wurde deutlich, dass 37,24 % der IHZ defekt waren und 2,58 % der ÄHZ. Diese Beobachtung ließ sich dadurch erklären, dass die IHZ generell empfindlicher auf die Kultivierung reagieren und somit keine Besonderheit der *Mcl-1* modifizierten OC Explantate darstellt.

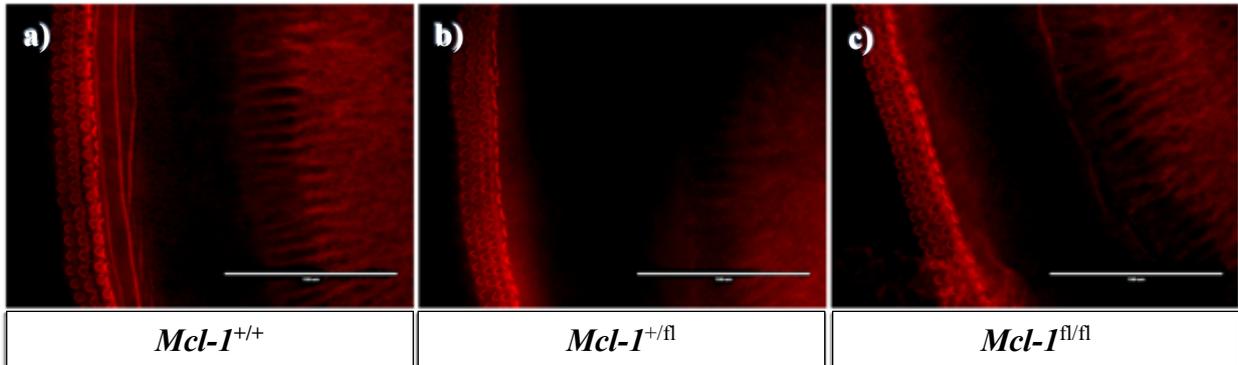


Abbildung 16 Repräsentative Aufnahmen der Haarzellen in *Mcl-1^{+/+}*, *Mcl-1^{+/fl}* und *Mcl-1^{fl/fl}* modifizierten Cochlea-Explantaten.

Dargestellt sind Draufsichtsaufnahmen der Haarzellen, die mit iFluor® 594 konjugiertem Phalloidin markiert wurden. Abgebildet sind jeweils nur mediale Abschnitte der OC Explantate. **Abbildung 16a** Haarzellen in einem Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantat. **Abbildung 16b** Haarzellen in einem heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* Explantat. **Abbildung 16c** Haarzellen in einem homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantat. Maßstab entspricht 100 µm.

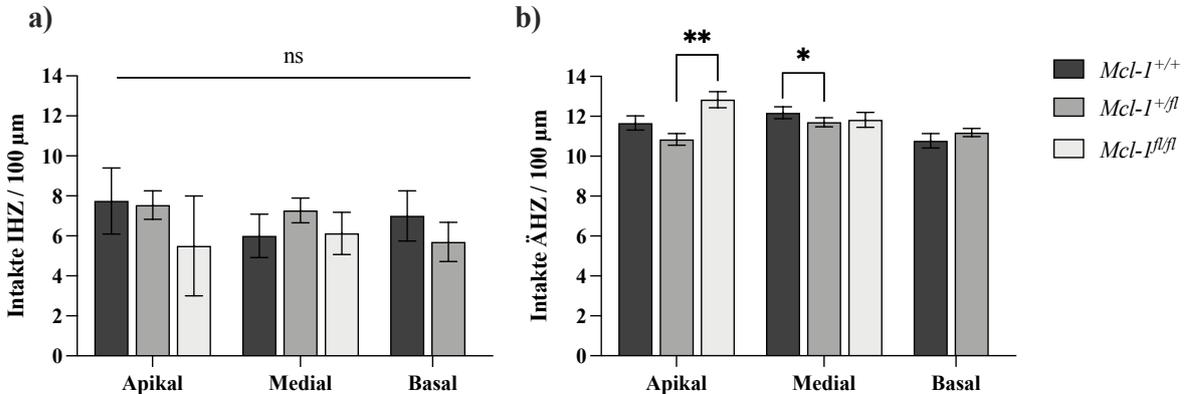


Abbildung 17 Die Anzahl intakter Haarzellen je 100 µm in *Mcl-1^{+/+}*, *Mcl-1^{+/fl}* und *Mcl-1^{fl/fl}* modifizierten Cochlea-Explantaten.

Die intakten Haarzellen wurden in fünf repräsentative Abschnitte der jeweiligen Fragmente ausgezählt. **Abbildung 17a** Darstellung der intakten IHZ in *Mcl-1^{+/+}* (n = 9), *Mcl-1^{+/fl}* (n = 23) und *Mcl-1^{fl/fl}* (n = 5) Explantaten. **Abbildung 17b** Darstellung der intakten ÄHZ in *Mcl-1^{+/+}* (n = 9), *Mcl-1^{+/fl}* (n = 23) und *Mcl-1^{fl/fl}* (n = 5) Explantaten. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. ns > 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01 (Kruskal-Wallis-Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's und Mann-Whitney-Test in den basalen Abschnitten zwischen *Mcl-1^{+/+}* und *Mcl-1^{+/fl}*).

4.5.2. Die Anzahl und Dichte der Spiral Ganglion Neurone ist in *Mcl-1* modifizierten Cochlea-Explantaten reduziert

Neben den Sinneszellen wurde auch die SGN analysiert und quantifiziert. Das Ziel hierbei war es, die SGN der MZ-Defizienten Mäuse auf morphologische Unterschiede zu untersuchen. Hierzu wurden die SGN mit dem Primärantikörper NF200 markiert und anschließend mit Alexa Fluor™ 488 konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt.

In **Abbildung 18** sind repräsentative Aufnahmen der SGN in den MZ-Defizienten Mäusen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass homozygote *Mcl-1^{fl/fl}* Explantate eine geringere Dichte an SGN aufwiesen als die heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* und Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantate (**Abbildung 18g-i**). Auch in heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* Explantaten konnte eine Reduktion der SGN verzeichnet werden (**Abbildungen 18d-f**).

Neben der visuellen Prüfung wurden zusätzlich zwei quantitative Methoden zur Analyse verwendet. Im Rahmen der ersten Methode erfolgte die Auszählung der SGN zwischen der Habenula perforata und der IHZ-Reihe (**Abbildung 19**). In **Abbildung 19a** konnte im Vergleich zu Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantaten eine 10-fache Reduktion der SGN in homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantaten verzeichnet werden, was einem Signifikanzwert von $p < 0,0001$ entsprach (Kruskal-Wallis Test). Auch zwischen den homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* und heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* OC Explantaten konnte eine höchst signifikante Reduktion der SGN Anzahl errechnet werden ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis Test). Verglich man die einzelnen OC-Fragmente miteinander, so konnte in den medialen als auch basalen Abschnitten der homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantate ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantaten errechnet werden (**Abbildung 19b**, medial: $p = 0,0033$; basal: $p < 0,0001$; two-way ANOVA). Zusätzlich wurde über alle Fragmente hinweg ein signifikanter Unterschied zwischen den heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* und homozygoten-*Mcl-1^{fl/fl}* Explantaten beobachtet (**Abbildung 19b**, apikal: $p < 0,0001$; medial: $p = 0,0013$; basal: $p < 0,0001$; two-way ANOVA). Auch zwischen Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* und heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* Explantaten konnte im apikalen ($p = 0,0019$; two-way ANOVA) als auch basalen ($p = 0,0026$; two-way ANOVA) Abschnitt ein Unterschied in der SGN Anzahl errechnet werden. Die signifikante Reduktion der SGN im apikalen Bereich der Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantate kann jedoch einer präparationsbedingten Läsion zugeschrieben werden, da der apikale Anteil der membranösen Cochlea sehr empfindlich ist.

Die zweite Methode umfasste eine semi-quantitative Auswertung der Daten. Hierzu wurde der Flächenanteil der SGN zwischen der Habenula perforata und IHZ-Reihe (ROI) in einem binären Bild berechnet und verglichen.

Ergebnisse

In **Abbildung 20b-d** sind repräsentativ die binären Bilder von Wildtyp $Mcl-I^{+/+}$, heterozygoten $Mcl-I^{+/\Delta}$ und homozygoten $Mcl-I^{\Delta/\Delta}$ OC Explantaten dargestellt, die zur Auswertung der SGN Dichte genutzt wurden. In **Abbildung 20a** ist der prozentuelle Flächeninhalt der SGN/ROI angegeben. Mit $9,07\% / \text{ROI} \pm 1,20 \text{ SEM}$ konnte die höchste Dichte an SGN in Wildtyp $Mcl-I^{+/+}$ Explantaten errechnet werden, während der Flächeninhalt in homozygoten $Mcl-I^{\Delta/\Delta}$ Explantaten eine 3-fache Reduktion aufwies, was dem Signifikanzwert von $p = 0,0008$ entsprach (Kruskal-Wallis-Test).

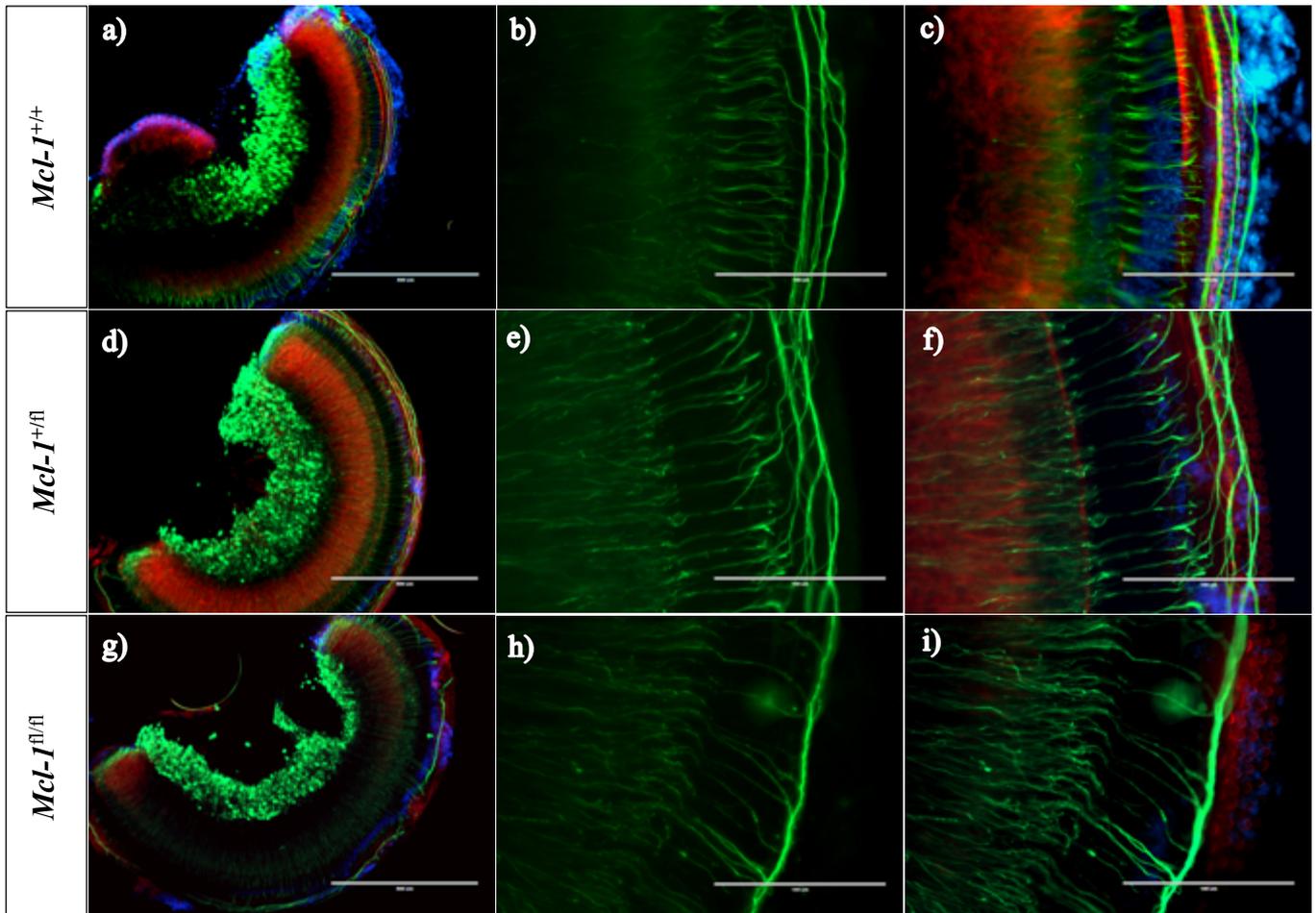


Abbildung 18 Repräsentative Aufnahmen der SGN in $Mcl-I^{+/+}$, $Mcl-I^{+/\Delta}$ und $Mcl-I^{\Delta/\Delta}$ modifizierten Cochlea-Explantaten.

Die Explantate wurden mit NF200 markiert und mit dem Alexa Fluor™ 488 konjugiertem Sekundärantikörper, Phalloidin und DAPI gefärbt. Es sind nur die medialen Abschnitte der OC Explantate abgebildet. **Abbildung 18a-c** Darstellung der SGN in Wildtyp $Mcl-I^{+/+}$ Explantaten. **Abbildung 18d-f** Darstellung der SGN in heterozygoten $Mcl-I^{+/\Delta}$ Explantaten. **Abbildung 18g-i** Darstellung der SGN in homozygoten $Mcl-I^{\Delta/\Delta}$ Explantaten. Die Abbildungen 18a, 18d und 18g weisen eine 100-fache Vergrößerung auf, was einem Maßstab von $400 \mu\text{m}$ entspricht. Die Abbildungen 18b-c, 18e-f und 18h-i wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen, was einem Maßstab von $100 \mu\text{m}$ entspricht.

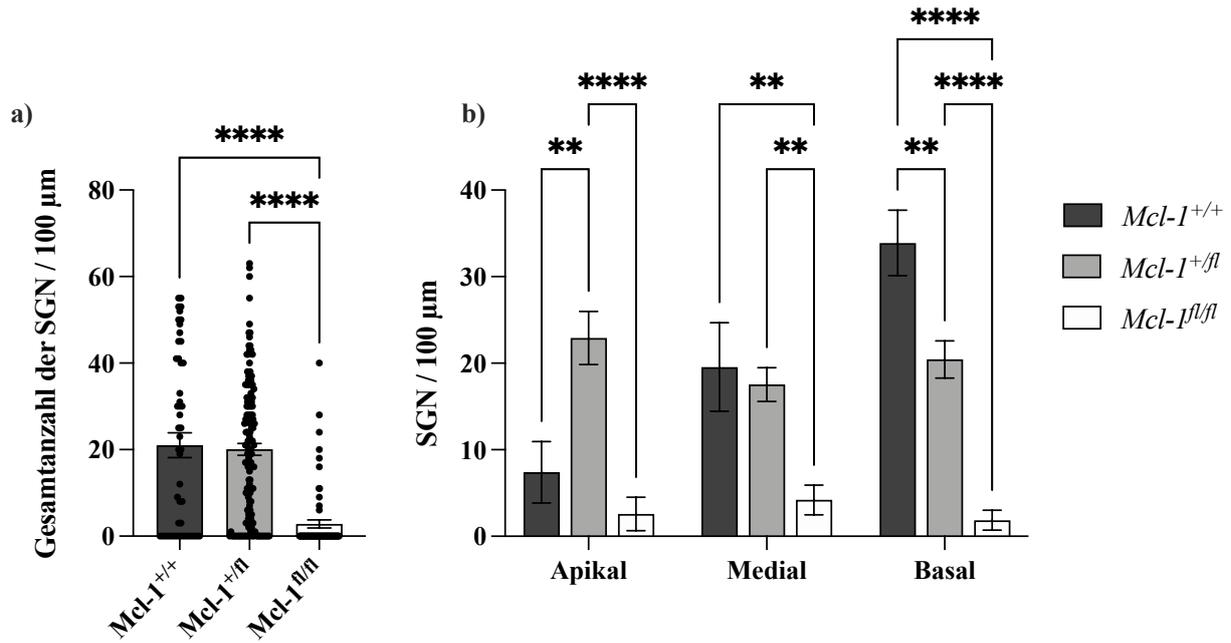


Abbildung 19 Quantifizierung der SGN in $Mcl-1^{+/+}$, $Mcl-1^{+/n}$ und $Mcl-1^{n/n}$ modifizierten Cochlea-Explantaten.

Die SGN wurden in fünf repräsentativen Abschnitten der apikalen, medialen und basalen Fragmente je 100 μm ausgezählt ($Mcl-1^{+/+}$ (n = 5), $Mcl-1^{+/n}$ (n = 14) und $Mcl-1^{n/n}$ (n = 5)). Die Auszählung der SGN erfolgte zwischen der Habenula perforata und der IHZ-Reihe. **Abbildung 19a** Die Gesamanzahl der SGN/100 μm innerhalb der $Mcl-1^{+/+}$, $Mcl-1^{+/n}$ und $Mcl-1^{n/n}$ Explantate. **Abbildung 19b** Die Anzahl der SGN/100 μm je apikalen, medialen und basalen Abschnitt. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. **p < 0,01; ****p < 0,0001 (Abbildung 19a: Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's. Abbildung 19b: two-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Tukey).

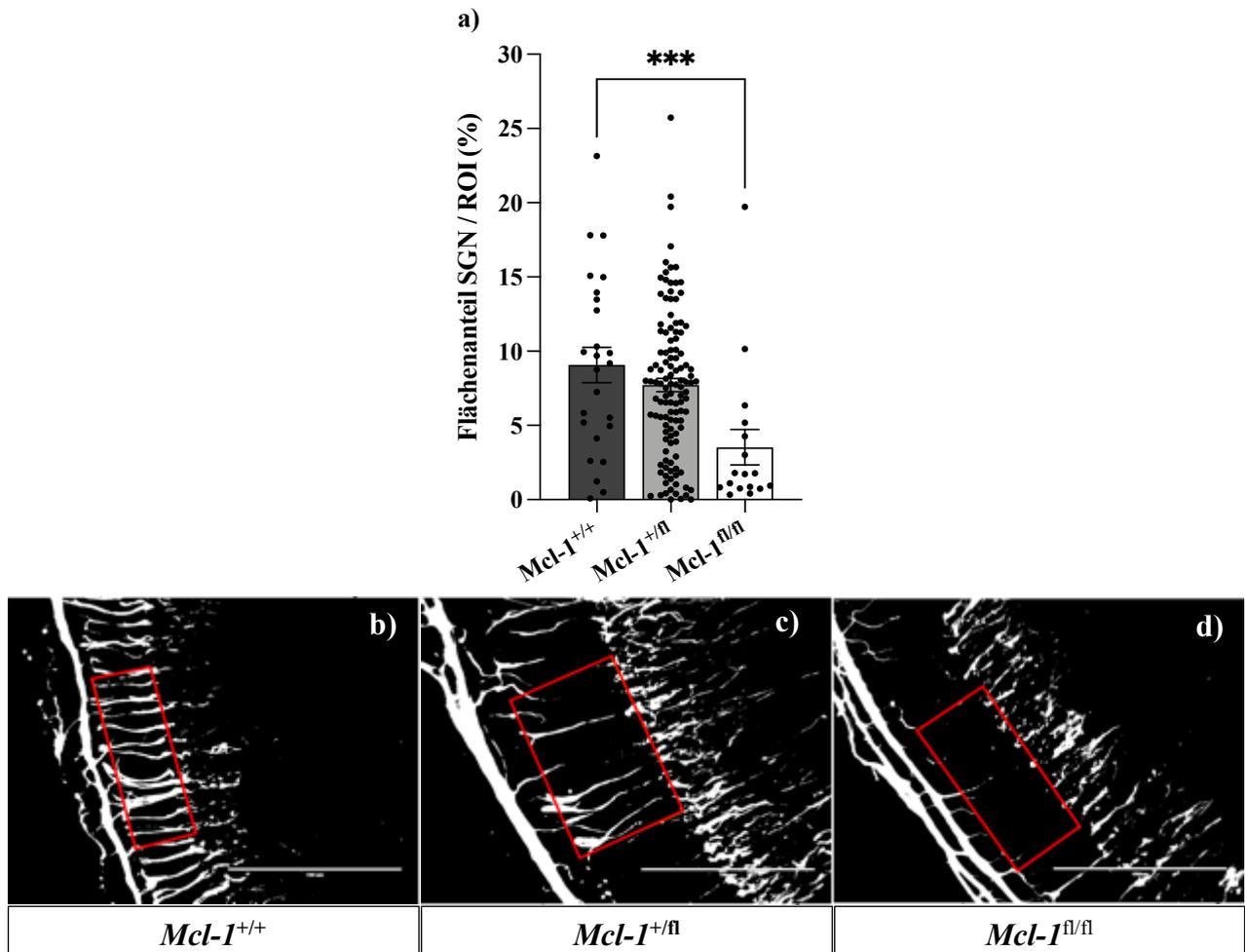


Abbildung 20 Die relative Dichte der SGN in *Mcl-1*^{+/+}, *Mcl-1*^{+/fl} und *Mcl-1*^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten.

Der Flächeninhalt der SGN wurde in fünf repräsentative Abschnitte der apikalen, medialen und basalen Fragmente je 100 µm quantifiziert. Der Flächeninhalt wurde zwischen der Habenula perforata und der IHZ-Reihe (ROI) gemessen und als prozentueller Anteil angegeben. **Abbildung 20a** Der Flächeninhalt der SGN/ROI innerhalb der *Mcl-1*^{+/+} (n = 5), *Mcl-1*^{+/fl} (n = 14) und *Mcl-1*^{fl/fl} (n = 5) Explantate. **Abbildung 20b-d** Repräsentative Aufnahmen der binären Bilder. Die rot hervorgehobene Bereiche stellen die ROI dar. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's). Der Maßstab entspricht 100 µm.

4.5.3. Die inneren Haarzellen werden in *Mcl-1* modifizierten Cochlea-Explantaten nicht durch Typ I Spiral Ganglion Neurone innerviert

Neben der reduzierten Dichte an SGN in homozygoten *Mcl-1*^{fl/fl} und heterozygoten *Mcl-1*^{+/fl} Explantaten wurde zusätzlich beobachtet, dass die Typ I SGN nach dem Durchtritt durch die Habenula perforata nicht bis zur IHZ-Reihe reichen. Somit konnte beobachtet werden, dass einige IHZ der *Mcl-1*^{+/fl} und *Mcl-1*^{fl/fl} Explantate nicht durch Typ I SGN innerviert wurden.

Ergebnisse

In **Abbildung 21** sind repräsentative Aufnahmen der verkürzten Typ I SGN dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Typ I SGN in Wildtyp-*Mcl-I^{+/+}* Explantaten eine Eins-zu-eins Innervation der IHZ eingingen (**Abbildung 21a/b**), während die Typ I SGN in heterozygoten *Mcl-I^{+/fl}* (**Abbildung 21c/d**) und homozygoten *Mcl-I^{fl/fl}* Explantaten (**Abbildung 21e/f**) verkürzt erschienen (weiße Pfeile). Zusätzlich wurden in *Mcl-I^{+/fl}* und *Mcl-I^{fl/fl}* Explantaten beobachtet, dass einige Typ I SGN einen kreuzenden Verlauf aufwiesen (rote Pfeile), die in Wildtyp Explantaten nicht identifiziert werden konnten. Da gezeigt wurde, dass die Typ I SGN in heterozygoten *Mcl-I^{+/fl}* und homozygoten *Mcl-I^{fl/fl}* Explantaten nicht bis zur IHZ-Reihe reichten, galt es weiterführend die Länge der Typ I SGN zu messen. Hierzu wurden die Typ I SGN nach dem Durchtritt durch die Habenula perforata ausgemessen. In **Abbildung 22a** ist gezeigt, dass die Länge der Typ I SGN in homozygoten *Mcl-I^{fl/fl}* Explantaten signifikant kürzer war als in den Wildtyp *Mcl-I^{+/+}* Explantaten ($p = 0,0244$; one-way ANVOA). Die durchschnittliche Länge der Typ I SGN, nachdem sie durch die Habenula perforata durchtraten, betrug in *Mcl-I^{+/+}* Explantaten $40,98 \mu\text{m} \pm 2,54 \text{ SEM}$, in *Mcl-I^{+/fl}* Explantaten $37,37 \mu\text{m} \pm 1,16 \text{ SEM}$ und in *Mcl-I^{fl/fl}* Explantaten $30,69 \mu\text{m} \pm 3,17 \text{ SEM}$. Wie **Abbildung 22b** verdeutlicht, nimmt die Typ I SGN Länge in allen Gruppen von apikal nach basal ab. In den apikalen Fragmenten ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp *Mcl-I^{+/+}* und den heterozygoten *Mcl-I^{+/fl}* Explantaten ($p = 0,0095$; two-way ANOVA) sowie den homozygoten *Mcl-I^{fl/fl}* Explantaten ($p = 0,0193$; two-way ANOVA) errechnen. Jedoch konnte kein messbarer Unterschied zwischen den medialen und basalen Fragmenten beobachtet werden.

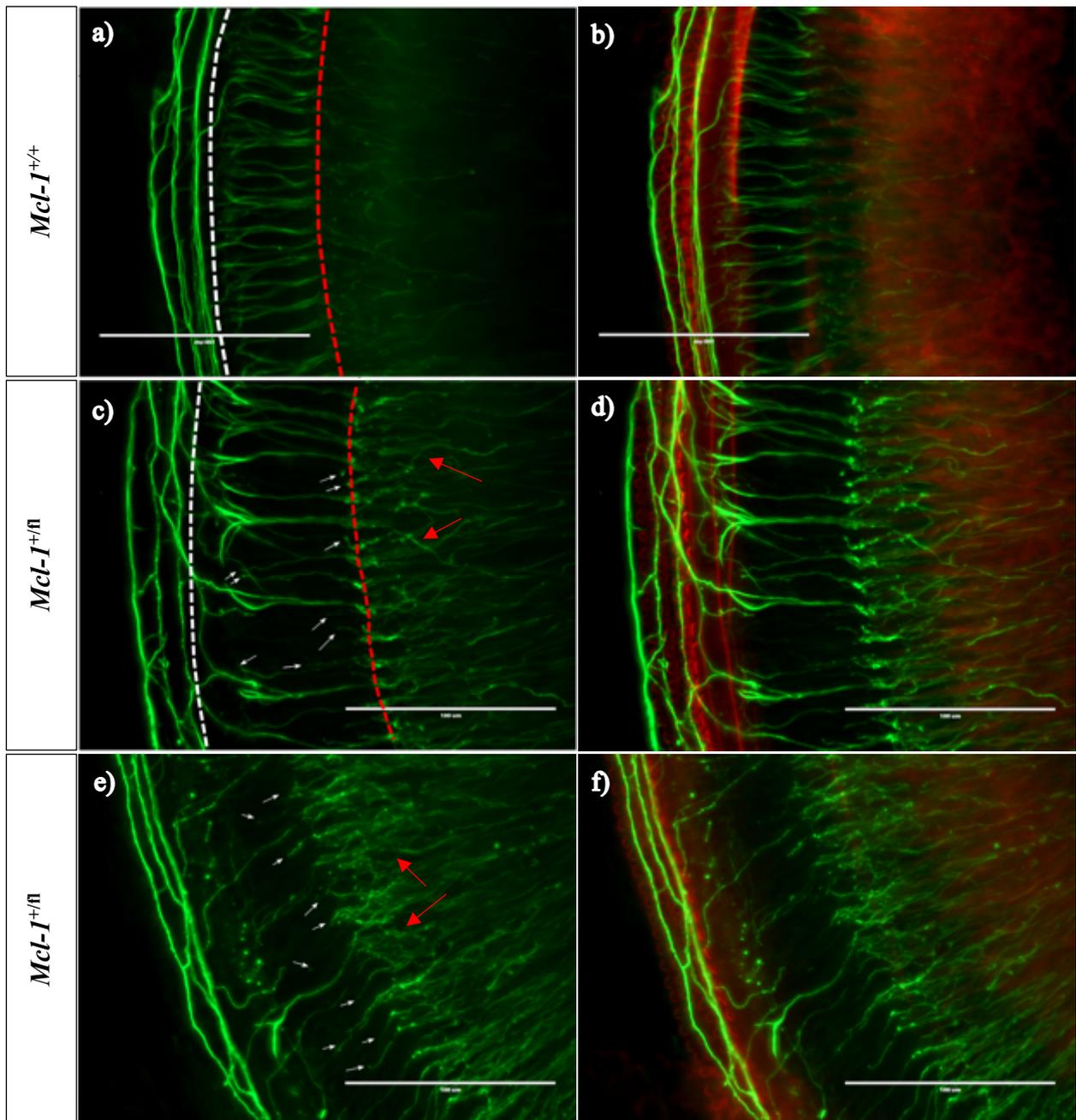


Abbildung 21 Repräsentative Aufnahmen der verkürzten Typ I SGN in *Mcl-I*^{+/+}, *Mcl-I*^{+/n} und *Mcl-I*^{n/n} modifizierten Cochlea-Explantaten.

Die Explantate wurden mit NF200 markiert und anschließend mit dem Alexa Fluor™ 488 konjugiertem Sekundärantikörper und Phalloidin gefärbt. **Abbildung 21a/b** Darstellung der SGN in einem Wildtyp *Mcl-I*^{+/+} Explantat. **Abbildung 21c/d** Darstellung der SGN in einem heterozygoten *Mcl-I*^{+/n} Explantat. **Abbildung 21e/f** Darstellung der SGN in einem homozygoten *Mcl-I*^{n/n} Explantat. Die weißen Pfeile weisen auf verkürzte Typ I SGN hin, während die roten Pfeile auf sich kreuzende Typ I SGN gerichtet sind. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Ergebnisse

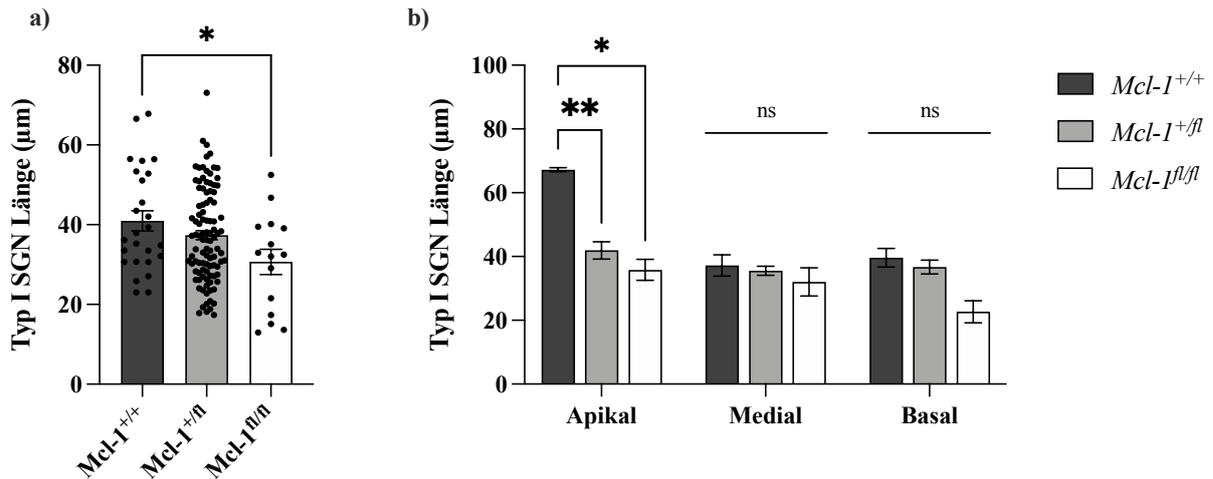


Abbildung 22 Quantifizierung der Typ I SGN Länge in *Mcl-1*^{+/+}, *Mcl-1*^{+/fl} und *Mcl-1*^{fl/fl} modifizierten Cochlea-Explantaten. Die Länge der Typ I SGN wurde in fünf repräsentative Abschnitte der apikalen, medialen und basalen Fragmente gemessen (*Mcl-1*^{+/+} (n = 5), *Mcl-1*^{+/fl} (n = 14) und *Mcl-1*^{fl/fl} (n = 5)). Die Länge der Typ I SGN wurde zwischen der Habenula perforata und der IHZ-Reihe ausgemessen. **Abbildung 22a** Die Gesamtlänge der Typ I SGN innerhalb der jeweiligen *Mcl-1* modifizierten Gruppe. **Abbildung 22b** Die Länge der Typ I SGN je Cochlea-Abschnitt (apikale, medial, basal). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. ns > 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; (Abbildung 22a: one-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Tukey. Abbildung 22b: two-way ANOVA, multiple post-hoc Vergleiche mit Tukey).

4.5.4. Die Typ II Spiral Ganglion Neurone weisen in *Mcl-1* modifizierten Cochlea-Explantaten eine abnormale neuronale Führung auf

Neben den Typ I SGN wurden auch die Typ II SGN auf Auffälligkeiten untersucht. So ließ sich eine Abnormität im Verlauf der Typ II SGN beobachten. In den hierzu repräsentativen Bildern ist zu erkennen, dass die Typ II SGN in den Wildtyp *Mcl-1*^{+/+} Explantaten sich zum basalen Abschnitt der Cochlea wenden (**Abbildung 23a**, weiße Pfeile). Vergleicht man jedoch den Verlauf der Typ II SGN in heterozygoten *Mcl-1*^{+/fl} (**Abbildung 23b**) und homozygoten *Mcl-1*^{fl/fl} Explantaten (**Abbildung 23c**) mit den Wildtyp-*Mcl-1*^{+/+} Explantaten, so ist deutlich zu erkennen, dass einige Typ II SGN sich nicht nur zur basalen Windung wenden, sondern auch zur apikalen Windung der Cochlea (rote Pfeile).

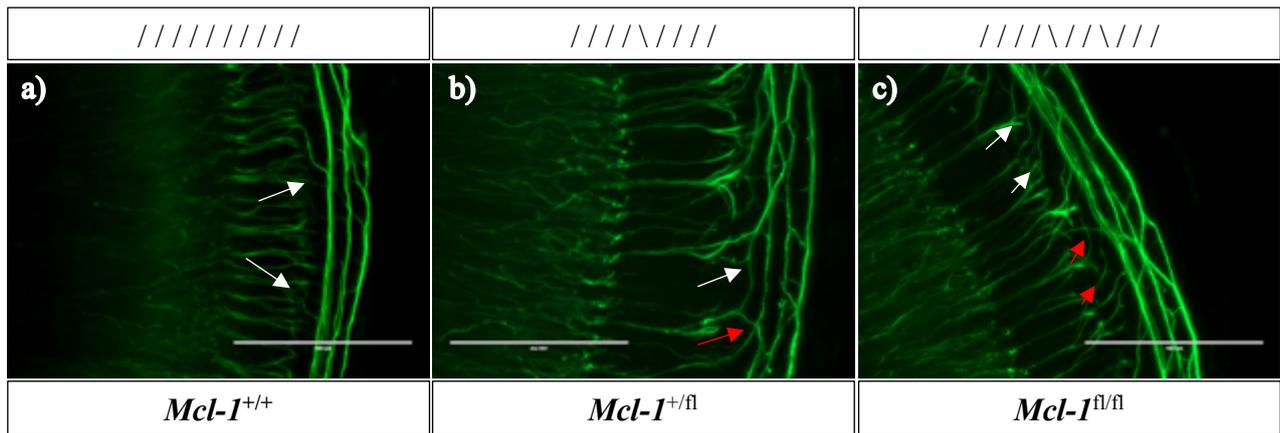


Abbildung 23 Repräsentative Aufnahmen der Typ II SGN in *Mcl-1^{+/+}*, *Mcl-1^{+/fl}* und *Mcl-1^{fl/fl}* modifizierten Cochlea-Explantaten.

Die Explantate wurden mit dem Primärantikörper NF200 markiert und daraufhin mit dem Alexa Fluor™ 488 konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt. **Abbildung 23a** Die Darstellung der Typ II SGN in einem Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantat. **Abbildung 23b** Die Darstellung der Typ II SGN in einem heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* Explantat. **Abbildung 23c** Die Darstellung der Typ II SGN in einem homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantat. Die weißen Pfeile weisen auf normal verlaufende Typ II SGN hin, während die roten Pfeile auf abnormal verlaufende Typ II SGN gerichtet sind. Die Kästen über den Aufnahmen soll grafisch den Verlauf der Typ II SGN in den jeweiligen Gruppen verdeutlichen. Der Maßstab entspricht 100 µm.

4.5.5. In der Lateralwand der Cochlea sind in homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantaten keine Mastzellen aufzufinden

Um beweisen zu können, dass die aufgezeigten Ergebnisse auch auf die Abwesenheit von MZ zurückzuführen ist, wurden die LW der Explantate auf MZ untersucht. Die LW Explantate wurden hierzu mit fluoreszenzmarkiertem Avidin gefärbt.

In **Abbildung 24a** ist deutlich zu erkennen, dass die homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantate im Vergleich zu den Wildtyp *Mcl-1^{+/+}* Explantaten eine 100%ige Reduktion der MZ aufzeigten, was einem Signifikanzwert von $p < 0,0001$ (Kruskal-Wallis Test) entsprach. Auch ließ sich eine signifikante Abnahme der MZ zwischen heterozygoten *Mcl-1^{+/fl}* und homozygoten *Mcl-1^{fl/fl}* Explantaten feststellen ($p = 0,0005$; Kruskal-Wallis Test). Diese Ergebnisse wurden in **Abbildung 24b-d** visuell mit repräsentativen Aufnahmen untermauert.

Ergebnisse

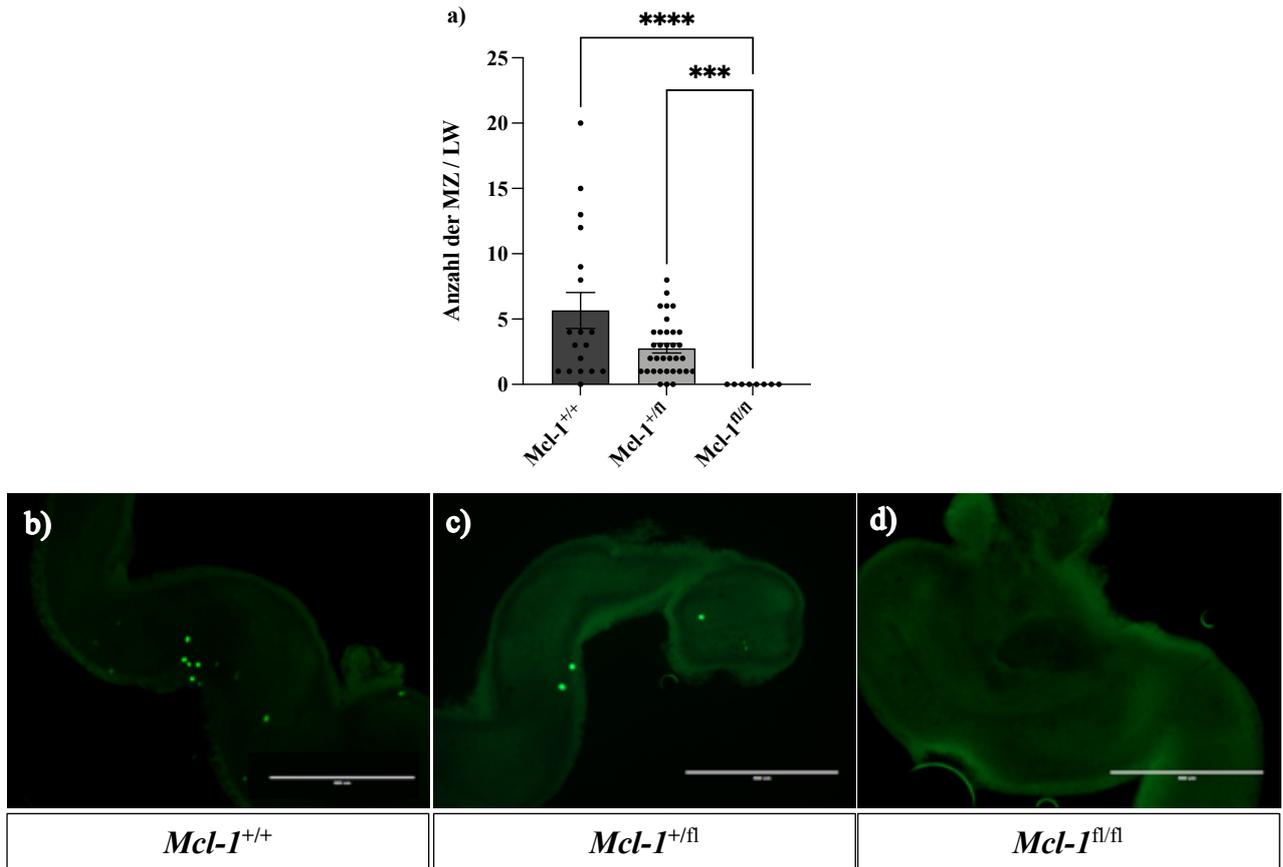


Abbildung 24 Quantifizierung der Mastzellen in der Lateralwand von *Mcl-1*^{+/+}, *Mcl-1*^{+/fl} und *Mcl-1*^{fl/fl} modifizierten LW Explantaten.

Die MZ wurden mit fluoreszenzmarkiertem Avidin gefärbt und in der gesamten LW ausgezählt. **Abbildung 24a** Die MZ-Anzahl je LW innerhalb der *Mcl-1*^{+/+} (n=5), *Mcl-1*^{+/fl} (n=14) und *Mcl-1*^{fl/fl} (n=5) Explantate. **Abbildung 24b-d** Repräsentative Aufnahmen der LW. Die grün fluoreszierenden Zellen stellen MZ dar. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *p < 0,05; **p < 0,01 (Kruskal-Wallis-Test, multiple post-hoc Vergleiche mit Dunn's). Der Maßstab entspricht 100 µm.

5. Diskussion

Bis heute beschränkt sich in der Literatur die Funktion der MZ auf ihre bekannteste Eigenschaft, und zwar ihre Rolle in der Initiierung von allergischen Reaktionen. Es wurde jahrzehntelang angenommen, dass die Funktionen der MZ nur schädlicher Natur sei. Erst durch die Einführung diverser MZ-Defizienter Mausmodellen konnte der MZ weitere nützliche Eigenschaften zugeschrieben werden. Somit erfolgte eine Umwälzung in der Mastzellforschung, die das Ansehen der MZ in ein viel komplexeres Bild wandelte. Das Mysterium um die MZ wirft jedoch weiterhin Unklarheiten und klärungsbedürftig Fragen auf. Das HNO-Forschungslabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin konnte erstmalig MZ in der Cochlea von Nagetieren identifiziert, was vermutlich eine neue Ära der Innenohrimmunologie einleiten könnte und dem alten Dogma des immunprivilegierten Innenohrs widerspricht. Diese Arbeit soll zwei essenzielle Beiträge zu dem näheren Verständnis dieser Cochlea-MZ bringen. Als Erstes wurde am Beispiel der Cisplatin-induzierten Ototoxizität der Einfluss von MZ in pathologischen Prozessen des Innenohrs untersucht. Hierzu wurden die Wechselwirkungen zwischen CS und Cisplatin auf die Lebensfähigkeit von Haarzellen und SGN eingehend analysiert. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Rolle der MZ in physiologischen Prozessen der Cochlea charakterisiert. Dabei erfolgte die Analyse der neuronalen Zellen sowie der Haarzellen in MZ-Defizienten Mäusen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Cisplatin die Degranulation von Cochlea-MZ induziert und dieser Prozess durch den Mastzellstabilisator CS inhibiert werden kann. Zusätzlich konnte CS ein protektiver Einfluss auf den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust und seine neurotoxische Wirkung zugeschrieben werden. Weiterführend wurde der potenzielle Einfluss von Histamin auf die untersuchten pathologischen Prozesse aufgezeigt, indem die Explantate mit einem Antagonisten und Agonisten des Hrh1 und des Hrh3 behandelt wurden. Die Expression des Hrh1 und Hrh3 Gens in Anlehnung auf die Cisplatin Behandlung in diversen Strukturen der Cochlea wurde mit Hilfe von quantitativer RT-qPCR nachgegangen, wobei Hoch- und Herunterregulierungen der Genexpression beobachtet werden konnte. Darüber hinaus wurde verdeutlicht, dass in heterozygoten und homozygoten MZ-Defizienten Mäusen die Dichte der SGN deutlich reduziert war, die Typ I SGN sichtlich verkürzt und die Typ II SGN einen abnormalen Verlauf aufwiesen, während die Haarzellen normal ausdifferenziert vorlagen. Die absolute Aussagekraft dieser Ergebnisse, bezogen auf den Nutzen *in vivo*, gilt es jedoch kritisch zu betrachten.

5.1. Limitationen der verwendeten Methoden

Aus den angewandten Methoden und den verschiedenen Versuchsdesigns ergeben sich folgende Limitationen. Die Erstellung organotypischer Kulturen aus Jungtieren, dessen Alter zwischen dem dritten und fünften postnatalen Tag lag, stellt ein unreifes Modell dar. Der Grund hierfür ist, dass die Haarzellen *in vivo* bereits zum 14. embryonalen Tag eine terminale Differenzierung aufweisen, die jedoch in ihrer Funktionalität im frühen postnatalen Stadium eine Ruhephase eingeht (176, 177). Das Hörvermögen tritt folglich erst um den 12. postnatalen Tag ein, was dazu führt, dass in Jungtieren und adulten Mäusen die Proteinexpression als auch die Proliferationsrate der Cochlea unterschiedlich ist (178). Daher stellt das Entwicklungsalter des Gewebes bei der Analyse der Ergebnisse einen wichtigen Faktor dar, der in *in vitro* Explantaten berücksichtigt werden sollte. So zeigen kultivierte Haarzellen eine gewisse Regenerationskapazität auf, während die Proteinexpression zwischen dem 1. und 5. postnatalen Alter variieren kann (179, 180). Da im Rahmen dieser Arbeit p3-p5 Mäuse genutzt wurden und das Alter nicht in der Bewertung berücksichtigt wurde, limitiert dieser Sachverhalt die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf adulte Mäuse. Dennoch gilt als Vorteil hervorzuheben, dass aufgrund der noch knorpeligen Kapsel in diesen Jungtieren das Zielgewebe besser zugänglich war und dadurch unweigerlich entstehende Präparationsläsionen reduziert werden konnten.

Darüber hinaus enthält die Cochlea neben den aufgezeigten MZ auch andere ansässige Immunzellen, wie z. B. Makrophagen. Makrophagen können *in vitro* sowohl Überlebens- als auch apoptotische Signale initiieren (181). So konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung verschiedener Zelllinien mit serumhaltigem Medium die Aktivität von Makrophagen *in vitro* steigert, sodass experimentell erzielte Ergebnisse untereinander variieren können (182, 183). Da auch unser Kulturmedium aus 10 % fetalem Rinderserum bestand, kann die Interaktion der Cochlea-Makrophagen in den Explantaten nicht ausgeschlossen werden.

Wie bereits angeführt, stellen MZ eine sehr empfindliche Zellpopulation dar, die sowohl auf physikalische Reize als auch auf Umgebungseinflüsse mit einer Degranulation reagieren können (57). Zwar stellt die Verwendung des Glykoprotein Avidin eine etablierte Färbemethode zur Identifizierung von MZ-Granula dar (169) jedoch befinden sich die Granula nach erfolgter Degranulation verstreut im extrazellulären Raum, was dazu führen kann, dass einige MZ unentdeckt bleiben können und somit während der Quantifizierung vernachlässigt wurden. Dies könnte ein Grund für die geringe Anzahl an MZ sowie die enorme Streuung in den Explantaten verantworten. Die Quantifizierung der Sinneszellen und SGN erfolgte hinsichtlich ihrer Morphologie.

Diskussion

Die Analyse fand unter standardisierten Bedingungen statt, jedoch kann nicht sicher geprüft werden, ob eine morphologisch als defekt charakterisierte Zelle auch funktionell defekt war und vice versa mit den als intakt kategorisierten Zellen. Daher können im *in vitro* Modell keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der Zellen gezogen werden, es sei denn, die Zelle ist so weit geschädigt, dass sie ihre strukturelle Integrität nicht mehr wahren konnte. So können modellhafte Schlussfolgerungen bezüglich der Funktion gezogen werden, was im Cisplatin-induzierten Modell weitgehend etabliert ist. Darüber hinaus wurden in den aufgezeigten Ergebnissen vorwiegend die Analyse der intakten Haarzellen aufgezeigt und nicht der defekten sowie fehlenden Haarzellen. Ein Grund hierzu war es, dass die Anzahl der defekten Haarzellen meist kongruent zur Anzahl der intakten Haarzellen verlief und somit dieselbe Aussage hervorgerufen hätte (z. B. der Anstieg intakter Haarzellen führte zum Abfall defekter Haarzellen). Die fehlenden Haarzellen waren in ihrer Quantifizierung so minimal, dass auch diese Werte ausgelassen wurden.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die LD₅₀ Konzentration von Cisplatin nur anhand der Anzahl intakter Haarzellen ermittelt wurde, was bedeutet, dass für die Sinneszellen zwar 15 µM Cisplatin als mittlere letale Dosis entsprach, aber ob dies auch für SGN galt, wurde nicht untersucht. Der Grund hierzu war, dass SGN, SG und Haarzellen als komplette zelluläre Einheit kultiviert und analysiert wurde und es methodisch nicht möglich war, diese Einheiten getrennt zu untersuchen. Daher wurde in allen Versuchen eine einheitliche Cisplatin Konzentration verwendet.

Zusätzlich ist anzumerken, dass die hier durchgeführten Experimente nur indirekt die Funktion der Cochlea-MZ in physiologischen und pathologischen Prozessen dargestellt werden konnten und nicht spezifisch der MZ zugeordnet werden können. Grund hierzu ist die fehlende Isolation der MZ im Zellverband als auch die noch nicht etablierten Methoden diesbezüglich. Dadurch, dass das gesamte OC und LW genutzt wurden, können Kausalitäten nur erahnt werden und nicht individuellen Zelltypen zugeordnet werden. Trotz der hier aufgeführten Limitationen ist zusammenfassend festzuhalten, dass die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellen im Gewebeverband der Cochlea realitätsgetreu *in vitro* dargestellt werden konnte.

5.2. Die Mastzellstabilisierende Wirkung von Cromoglicinsäure

Die mastzellaktivierende Wirkung von CP48/80 wurde schon oft in der Literatur beschrieben und lässt sich auch in dieser Arbeit bestätigen (56, 184). So konnte gezeigt werden, dass CP48/80 die Degranulation von PCMCs induziert und CS diese Degranulation *in vitro* hemmt. Hierbei wies die Behandlung mit einer niedrigeren Dosis (10 µM) CP48/80 die signifikanteste Abnahme der Fluoreszenzintensität auf und somit den größten Degranulationseffekt.

Wie bereits angeführt, spielt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei der MZ-Degranulation eine wichtige Rolle (59, 100). Durch die membranstabilisierende Wirkung von CS wird die MZ-Membran undurchlässiger für Ca^{2+} , was die Degranulation von MZ hindern soll (54). Um diesen Effekt auch in PCMCs wiederzugeben, wurden die PCMCs mit CS vorbehandelt und anschließend mit CP48/80 kultiviert. Höhere Konzentrationen (50 μM) von CS bewirkten nach 15 Minuten weiterhin eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität, während die Vorbehandlung mit 1 μM und 10 μM keinen Unterschied mehr zur Kontrollgruppe aufwies. Ein Erklärungsansatz für die nicht Hemmung der Degranulation bei einer Konzentration bei 50 μM CS könnte sein, dass die gewählte Inkubationszeit von 15 Minuten nicht für die Ausfaltung der Wirkung von CS ausgereicht hat. Die Inkubationszeit stellt eine Momentaufnahme der MZ dar, was dazu führt, dass die Aktivität der MZ während dem Zeitraum nicht beobachtet werden kann.

Diese Vorversuche dienten dazu, um die Wirkung von CS auf die bei uns verwendete Spezies zu testen, da in der Literatur beschrieben wurde, dass CS eine speziesabhängige Reaktion aufweist und in Mäusen wesentlich weniger MZ-Degranulationshemmende Eigenschaften besitzt als in Ratten (185). Jedoch kann mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass CS die Degranulation von PCMCs aus Mäusen *in vitro* hemmt und dessen Fluoreszenzintensität auf das Niveau der Kontrollgruppe bringen kann.

5.3. Die Wechselwirkung zwischen Cisplatin und Cochlea-Mastzellen

Die hier beschriebenen Cochlea-MZ weisen eine starke Variabilität in ihrer Verteilung und Anzahl auf. Betrachtet man die Verteilung der MZ in der Cochlea so konnte festgestellt werden, dass sich quantitativ mehr MZ in der LW aufhielten als im Spiral Limbus (setzt sich aus OC, SGN und SG zusammen). Im Schnitt konnte eine Avidin-positive MZ im Spiral Limbus und 2 Avidin-positive MZ in der LW identifiziert werden. Allerdings muss beachtet werden, dass bereits degranulierte MZ (z. B. während des Gewebegewinnung- und Präparationsprozesses) sich nicht mit Avidin färben lassen, was sich auch in der enormen Streuung je Explantat widerspiegeln lässt (**Abbildung 4**). Wie bereits geschildert, besitzen MZ neben den hochaffinen $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ eine Vielzahl weiterer Rezeptoren, über welche sie aktiviert werden können (44-49). So wurde beschrieben, dass niedrige Temperaturen zur Aktivierung von MZ führt (186, 187). Daher kann eine mögliche Ursache für die niedrige Anzahl der MZ die methodische Herangehensweise der Experimente sein. Jedes Gewebe wurde in 4 °C kaltem Medium präpariert, was zur Degranulation hätte führen können. Da jedoch jedes Explantat für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde, ist anzunehmen, dass in dieser Zeit die MZ sich von den physikalischen und mechanischen Reizen erholt haben könnten.

Diskussion

Die Lokalisation der MZ in der Cochlea korreliert möglicherweise mit ihrer Funktion. Es konnte beobachtet werden, dass die Mehrzahl der MZ sich in der LW der Cochlea befanden. Ein Teil der LW ist die SV, welche sich aus einem Kapillarnetzwerk zusammensetzt, zu denen drei Zellschichten gehören: Marginal-, Intermediär- und Basalzellen (106, 109, 110, 113, 114). Zu der Intermediärzellschicht werden die perivaskulären residenten Makrophagen (PVMs) gezählt, die für die Kontrolle, Stabilität und Integration der Blut-Lymph-Schranke verantwortlich sind (150, 151). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die vermehrte Lokalisation der MZ in der LW einen modulierenden Einfluss auf die Blut-Lymph-Schranke haben könnte. Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass MZ in der Lage sind, Histamin zu produzieren und zu sezernieren, somit kann Histamin eine vasodilatierende Wirkung auf die Blut-Lymph-Schranke haben (74). Im Spiral Limbus hielten sich die MZ vorzugsweise im Bereich der SGN und SG auf. In keinem der untersuchten Fälle konnten MZ um die IHZ und ÄHZ identifiziert werden. Durch die Lokalisation von MZ in der unmittelbaren Umgebung von Blutgefäßen und Nervenfasern (81) macht diese Beobachtung weitaus Sinn, denn im Modiolus sind die Perikaryon des 1. Neurons des auditorischen Systems, Fasern des N. cochlearis sowie Blutgefäße und SG eingebettet (110). Somit wäre eine neuroimmune Wechselwirkung zwischen den MZ-Mediatoren und Neuronen annehmbar, welche durch Histamin und Serotonin vermittelt werden könnte. In der Literatur wurde solch ein Zusammenhang innerhalb des somatosensorischen Systems bereits beschrieben (83). Auch werden in der Cochlea sowohl Serotoninrezeptoren (5-HTR) (188) als auch Histamin-Rezeptoren (80) exprimiert. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass das von MZ stammende Serotonin zur Neurogenese im Hippocampus beiträgt (82, 87), was vermutlich auch in der Neurogenese der SGN eine Rolle spielen könnte. Ferner wurde beschrieben, dass MZ die Eigenschaft besitzen, das Neuropeptid NGF synthetisieren zu können, welches für die Entwicklung und Aufrechterhaltung peripherer und zentraler Neuronenzellen von besonderer Bedeutung sind und voraussichtlich auch für die Entwicklung der SGN sei (88, 91). Die Rolle der MZ in dem physiologischen Ablauf des Hörens konnte bereits durch klinische Studien indirekt beobachtet werden. So wiesen Patienten/Patientinnen, die mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor (TKI) Imatinib behandelt wurden, einen bilateralen irreversiblen sensorineuralen Hörverlust auf (189, 190). Da Imatinib an den c-kit-Rezeptor bindet, der auch auf der Zelloberfläche von MZ exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass Imatinib auch an den Cochlea-MZ eine Wirkung aufwies, der jedoch nicht untersucht wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die gezielte TKI-Therapie einen vielversprechenden Behandlungsansatz für Mastozytose Patienten/Patientinnen darstellt.

Diskussion

So konnten in *in vitro* Experimenten verdeutlicht werden, dass Imatinib das Wachstum von MZ in MZ-Linien und humanen MZ hemmt (191, 192).

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Cisplatin auf die Cochlea-MZ aufgedeckt werden. Cisplatin ist ein weitverbreitetes Chemotherapeutikum, was zur Behandlung verschiedener maligner Neoplasien eingesetzt wird (131). Dabei verursacht Cisplatin irreversibel Schäden im Innenohr, die durch die Degeneration der Haarzellen initiiert wird (135). In den organotypischen Kulturen des Spiral Limbus und der LW konnte beobachtet werden, dass Cisplatin zur signifikanten Reduktion der nicht-degranulierten MZ führte, was darauf hinweist, dass Cisplatin entweder die Apoptose oder die Degranulation von MZ induziert. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis stieg die Anzahl der degranulierten MZ bei der Behandlung mit 10 μM Cisplatin, was jedoch keine Signifikanz aufwies. Die Exposition der Explantate gegenüber 20 μM und 30 μM Cisplatin führte zu einer signifikanten Abnahme der gesamten MZ-Anzahl, was auf eine dosisabhängige Wirkung des Cisplatins hinweist. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Brzezińska-Błaszczyk et al. (1996), der zeigte, dass PCMCs in der Anwesenheit von Cisplatin mit Histaminsekretion reagieren (58). Des Weiteren konnten Experimente mit der humanen MZ-Linie HMC-1 verdeutlichen, dass Cisplatin in höheren Konzentrationen die Apoptose von HMC-1 induzierte (193). Diese Erkenntnisse könnten erklären, dass die Behandlung der Explantate mit 20 μM und 30 μM Cisplatin zur Apoptose oder Degranulation der MZ geführt haben könnte. Eine weitere Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass die Behandlung der Explantate mit 20 μM Cisplatin zu einer Zunahme von Cochlea-MZ führte (159). In den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt wurden, konnte jedoch eine signifikante Abnahme in der MZ-Anzahl bei 20 μM beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die Verwendung unterschiedlicher Tierarten sein. So wurden in dieser Arbeit p3 C57BL/6 Mäuse verwendet, während für die Veröffentlichung p5 Wistar Ratten genutzt wurden. Auch spielt vermutlich die Beobachtung von Takagi et al. (1990) eine wichtige Rolle bei dieser Gegebenheit. So beschrieb Takagi et al. (1990), dass die MZ-Anzahl nach IgE-Aktivierung anstieg, welche er auf das Vorhandensein undifferenzierter MZ zurückführte, die sich nach der Stimulation zu differenzieren begannen (23). Die MZ-Proliferation und -Differenzierung erfolgt in der Gegenwart von SCF (14, 15). Makrophagen sind eine bekannte Quelle für SCF (194) und bei der Exposition gegenüber Cisplatin (195) könnte es sein, dass residente Cochlea-Makrophagen SCF freisetzen und somit zur MZ-Proliferation von undifferenzierte MZ beitragen. Jedoch müsste diese Vermutung genauer erforscht werden.

5.4. Der protektive Effekt von Cromoglicinsäure auf Cisplatin-induzierte Ototoxizität

Es werden mehrere Ursachen zur Cisplatin-induzierten Ototoxizität vermutet. So soll die Behandlung mit Cisplatin die ROS-Produktion und -Akkumulation sowie das Herunterfahren des Antioxidationsystems induzieren, was oxidativen Stress verursacht und zur Apoptose von Haarzellen, Stützzellen und SV führt (139, 196-198). Darüber hinaus reichert sich Cisplatin im Cochlea-Gewebe an und bildet Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges, was die Replikation und Transkription von Proteinen und Enzymen beeinträchtigt (132, 133). Aufgrund der anatomischen Position und Isolation vom peripheren Gewebe stellt die Cochlea ein praktisch geschlossenes System dar, was dazu führt, dass Toxine akkumulieren können. Ein weiterer Mechanismus der Cisplatin-induzierten Toxizität wurde in der Niere beschrieben. Summers et al. (2011) beobachtete, dass das Cisplatin-induzierte Nierenversagen auf die Freisetzung von TNF- α aus den residenten MZ in der Niere zurückzuführen sei (199).

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass CS die Haarzellen vor Cisplatin-induziertem Haarzellverlust schützt. CS unterbindet die Degranulation von MZ und wird zur Behandlung von allergischem Asthma, Mastozytose und allergische Konjunktivitis angewendet (94, 95). Die Behandlung mit CS stabilisiert die MZ-Membran und reduziert die Aktivierung, Degranulation und Histaminfreisetzung aus MZ (94). In einem Meerschweinchen-Modell des akuten Lungenschadens konnte gezeigt werden, dass CS zu einer Abnahme von ROS Bildung in alveolaren Makrophagen führte (200). Auch zeigten PCMCs von Ratten, dass sie in der Lage sind, auf verschiedene Stimuli wie NGF, Substanz P und CP48/80, die intrazelluläre ROS-Synthese hochregulieren (201). Daher liegt die Vermutung nahe, dass durch die mastzellstabilisierende Wirkung des CS intrazellulär gebildete ROS in Cochlea-MZ nicht in den extrazellulären Raum freigesetzt wurden. Zukünftige Experimente sollten den Zusammenhang zwischen der Cisplatin-induzierten Ototoxizität, der ROS-Produktion und CS untersuchen. Darüber hinaus reduziert CS auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (99). MZ besitzen zahlreiche Granula, die eine Vielzahl von synthetisierten und gespeicherten Mediatoren beinhalten, zu denen auch TNF- α gehört (15, 26). Wie bereits angeführt, konnte im Mausmodell des akuten Nierenversagens beobachtet werden, dass CS die Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität signifikant reduzierte, was darauf hindeutet, dass die Degranulation von MZ eine wesentliche Rolle in diesem Prozess spielt (199). Auch wurde im *in vitro* Modell gezeigt, dass die Behandlung von Cochlear-Präparate mit hoher Konzentration an TNF- α die Apoptose von Haarzellen induzierte (202).

Diskussion

Dies deutet daraufhin, dass CS im Cochlea-Modell die TNF- α -Freisetzung aus den Cochlea-MZ reduzieren könnte. In diesem Zusammenhang müssen genauer Studien mit TNF- α -Defizienten Modell erfolgen, die eine Korrelation zwischen Cochlea-MZ und TNF- α -induzierten Ototoxizität belegen könnte.

Des Weiteren wird angenommen, dass CS ein selektiver Agonist des GPR35 sei (101). Welche Rolle die Expression des GPR35 im beschriebenen protektiven Effekt des CS jedoch spielt, kann nur vermutet werden. GPR35 wird sowohl auf humanen MZ als auch ubiquitär im ZNS exprimiert (101, 203). Jedoch wurde nicht erforscht, ob GPR35 auch im auditiven System exprimiert wird, daher kann zum aktuellen Stand der Forschung nur davon ausgegangen werden, dass CS auf den MZ des Innenohrs gewirkt haben könnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in chronisch entzündliche Darmerkrankung die Behandlung mit einem GPR35 Agonisten die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6) inhibiert (204). Jedoch ist der zelluläre Mechanismus, wie der GPR35 Agonist die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert, unbekannt.

Cisplatin kann auch neurotoxisch wirken (143, 144) und zur Abnahme von SGN führen (145). Es konnte gezeigt werden, dass Cisplatin bei kultivierten sensorischen Neuronen von Ratten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Zelltodes führte (146). So konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass CS den Cisplatin-induzierten SGN-Verlust vor der neurotoxischen Wirkung von Cisplatin schützt, jedoch nur bei einer Konzentration von 25 μ M. Es bleibt unklar, warum nur diese spezielle CS-Konzentration wirksam war, und sollte daher weiter untersucht werden. Zuvor wurde CS eine neuroprotektive Fähigkeiten zugeschrieben, denn durch die hemmende Wirkung an zerebralen MZ konnten die kognitive Funktion nach hypoxisch-ischämischen Hirnschäden verbessert werden (96). Kempuraj et al. (2020) konnte verdeutlichen, dass die Behandlung von Mäusen mit CS vor schwerwiegenden Hirnschäden schützt (97). Infolgedessen könnte CS auch als neuroprotektive Substanz bei Neuroinflammation und Neurotrauma angesehen werden. Auch wurde die Expression des GPR35 im Rückenmark von Ratten sowie in den SGN beobachtet (205). Die Expression des GPR35 wurde jedoch nicht in Nerven des sensorischen Systems beschrieben, somit nicht im auditiven System. Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass durch die mastzellstabilisierende Wirkung von CS die Cisplatin-induzierte Oto- und Neurotoxizität in der Cochlea signifikant verhindert werden konnte. Weitere Untersuchungen mit CS müssen erfolgen, um Möglichkeiten neuer therapeutischer Ansätze zur Dämpfung von Cisplatin-induzierter Ototoxizität und zur Behandlung von Hörverlust zu bieten.

In diesem Kontext konnte erstmals in dieser Arbeit CS eine protektive Funktion in Cisplatin-induzierter Ototoxizität zugeordnet werden. Allerdings ist es unklar, ob diese protektive Wirkung aufgrund der Stabilisierung von MZ zustande gekommen ist oder ob CS an sich diesen Mechanismus beherbergt und somit an den Sinneszellen gewirkt hat.

5.5. Der modulierende Einfluss von Cisplatin auf die Genexpression des Histamin-Rezeptors 1 und 3

Histamin ist ein biogenes Amin, was weitreichende Auswirkungen auf biologische als auch pathologische Prozesse hat. Es wird präformiert in den Granula der MZ gespeichert (15, 72, 73) und übt seine verschiedenen Funktionen durch die Aktivierung von vier G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Hrh1, Hrh2, Hrh3 und Hrh4) aus (75). Die Expression aller vier Histamin-Rezeptoren konnte in der Cochlea von Mäusen nachgewiesen werden (80). Von Relevanz für diese Arbeit war der Hrh1 und Hrh3, die sich an den IHZ und ÄHZ des OC sowie an den SG und der LW identifizieren ließen (80). Es wurde untersucht, ob Cisplatin die Genexpression des Hrh1 und Hrh3 moduliert und inwiefern Histamin die Cochlea-Morphologie beeinflusst.

Die Experimente zeigten, dass die Expression des Hrh1 und Hrh3 Gens sowohl in unbehandelten als auch mit Cisplatin behandelten OC, LW und Modiolus Explantaten nachgewiesen werden konnten. Die Behandlung der Explantate mit Cisplatin führten zur signifikanten Abnahme der Expression des Hrh1- und Hrh3-Gens, was eine Abhängigkeit zur Inkubationszeit aufwies. Im Modiolus konnte jedoch eine signifikante Zunahme der Expression des Hrh1 Gens ermittelt werden. Das OC und die LW sind besonders empfindlich auf die ototoxische Wirkung von Cisplatin, was zu Zellschäden und Apoptose führt, welche wahrscheinlich die signifikante Abnahme begründet (140-142, 196-198). Des Weiteren können Differenzen in der Präparation und Kultivierung Gründe für das Expressionsverhalten sein. Die signifikante Zunahme der Expression des Hrh1 Gens im Modiolus kann eventuell die ototoxische Wirkung von Cisplatin begünstigen. Studien konnten zeigen, dass Histamin in Mikroglia die Freisetzung von IL-1 β , TNF- α , IL-6 und Stickoxide initiiert und die Produktion von ROS moduliert (206-208). Dies beweisend wurde beschrieben, dass Histamin über die Hrh1-Aktivierung die ROS-Produktion induziert (209). Der Hrh1 aktiviert intrazellulär die Phospholipase C (PLC) (210), welches entweder die Aktivierung des PLC-Inositoltriphosphats, was zu einem intrazellulären Kalziumanstieg führt, oder des PLC-Proteinkinase C, die wiederum den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und eine erhöhte Gentranskription der Stickoxidsynthase initiiert (211, 212).

Diese Signalkaskade könnte eventuell die Produktion von Stickoxidsynthase und ROS induzieren, die infolgedessen zur Cisplatin-induzierten Ototoxizität beisteuern könnte. Basierend auf dieser Hypothese könnte spekuliert werden, dass neben Cisplatin die Aktivierung des Hrh1 durch Histamin zur ototoxischen Auswirkung beitragen kann. Diese Annahme könnte dadurch untermauert werden, dass die Behandlung der Cochlea-Explantate mit einem Hrh1-Agonisten zur signifikanten Abnahme von intakten IHZ führte und die Behandlung mit dem Hrh1-Antagonisten keinen Einfluss auf die IHZ aufwies.

Die Explantate wurden mit einem Hrh3-Agonisten als auch Antagonisten behandelt. So zeigte die Behandlung mit einem Hrh3-Agonisten eine signifikante Zunahme des prozentuellen Anteils intakter IHZ, während die Behandlung mit dem Hrh3-Antagonisten zur signifikanten Abnahme führte. Ein Erklärungsansatz hierzu könnte sein, dass dem Hrh3 eine protektive Wirkung zugewiesen wird, der jedoch noch nicht ganz geklärt werden konnte. So zeigt die Stimulation des Hrh3 mit Histamin eine neuroprotektive Wirkung während epileptischer Anfälle (213) sowie einen schützenden Effekt auf neuronalen Schäden, die durch Kainsäure-induziert wurden (214). Darüber hinaus wird angenommen, dass die Expression des Hrh3 das Zellüberleben von malignen Zellen aufrecht erhält, indem es die Proliferationsaktivität erhöht und die Zellapoptose inhibiert (215), während die Hrh3-Antagonisten die Proliferationsrate hemmt (216). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, wie sich das Expressionsverhalten des Hrh1 und Hrh3 Gens in Abhängigkeit auf Cisplatin verhält und welche Auswirkungen die Behandlung mit einem Agonisten als auch Antagonisten des Hrh1 und Hrh3 auf die Strukturen der Cochlea haben kann. Inwiefern die Cochlea-MZ in der cochleären Histamin-Rezeptor Integrität eine Rolle spielen, müsste jedoch weitreichendere untersucht werden.

5.6. Die Bedeutung der Cochlea-Mastzellen auf die neuronale Entwicklung im Innenohr

Während der Embryonalentwicklung folgt die Reifung der Cochlea-Innervation spezifischen und diskreten Schritten. Unter Verwendung des C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodells (160) konnte der Einfluss von MZ auf die frühen Entwicklungsstadien untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine neuartige Rolle der MZ beobachtet werden: MZ scheinen eine besondere Bedeutung bei der neuronalen Leitung und Entwicklung der SGN zu haben. So wiesen MZ-Defiziente Mäuse eine geringere SGN Dichte, eine Verkürzung der Neurone sowie eine abnormale Führung der Typ II SGN auf.

Diskussion

MZ und Neuronen wurde bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (81, 83, 217). So konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine, welche aus PCMCs freigesetzt wurden, das Überleben von kultivierten embryonalen Ganglion Neuronen in Hühnern und die embryonale Entwicklung von Ganglion Neuronen in Ratten unterstützt (218). Darüber hinaus sind Neurotrophine, wie BDNF und Neurotrophin-3, für das Überleben von SGN und ihre Führung zu den Haarzellen im sich entwickelnden Innenohr erforderlich (219, 220). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mutationen im BDNF und Neurotrophin-3 Gen oder im TrkB- und TrkC-Rezeptor einen Verlust an SGN während der embryonalen Entwicklung verursachten (221). Diese Beobachtungen werden dadurch unterstützt, dass MZ in der Lage sind eine Reihe neurogenwirkender Mediatoren freizusetzen, darunter Serotonin, Histamin, TNF- α und NGF (15, 82, 87, 88). Diese Daten lassen die Vermutung nahe, dass Cochlea-MZ durch die vermutliche Freisetzung von biologisch aktiven NGF, die Entwicklung der SGN unterstützt und aufrechterhält, während im MZ-Defizienten Modell dieser Stimulus nicht oder verringert erhalten. Die MZ können somit eine Schlüsselfunktion in der physiologischen Entwicklung des neuronalen Systems übernehmen (222), aber auch in pathologischen Prozessen. So konnte nachgewiesen werden, dass sowohl MZ als auch NGF an chronisch-entzündlichen oder autoimmunen Erkrankungen beteiligt sind, darunter Asthma bronchiale (65, 66, 223) und entzündliche Darmerkrankungen (70, 71, 224). Weiter Untersuchungen müssten erfolgen, um den Zusammenhang zwischen der biochemischen Funktion von NGF im MZ-Defizienten Modell und ihre Folgen in der Cochlea-Entwicklung zu erschließen. Im sich entwickelnden Innenohr wurden neben NGF auch die Expression verschiedener neurotroph wirkender Substanzen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass eine komplexe Reihe von Signalmechanismen die Innervation von Haarzellen steuert. Zu diesen Substanzen zählen Ephrine und die Eph-Rezeptoren. So konnte gezeigt werden, dass Ephrin/Eph-Rezeptor zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung der Cochlea exprimiert werden (225). Besonders interessant erscheint hierbei die Ephrin-A3-vermittelte EphA-Rezeptoraktivierung. Ephrin-A3 binden an Heparin, was für die biologische Aktivität von Ephrin-A3 essenziell ist (226). MZ stellen exklusive Zellen dar, die Heparin synthetisieren, in den Granula speichern und freisetzen können (227). Daher liegt die Vermutung nahe, dass im MZ-Defizienten Modell für das Ephrin-A3 benötigte Heparin fehlt und somit die neuronale Leitung der SGN nicht mehr gewährleistet werden konnte. Die SGN in der Cochlea umfassen ein hochkomplexes und präzises Innervationsmuster, die trotz jahrelanger Erforschung nicht gänzlich geklärt wurde. Die Cochlea-Innervation soll hierbei zwischen der Embryonalwoche 15.5 und 16.5 erfolgen (176, 177).

Diskussion

In Anbetracht dieser Tatsache, ist es nicht überraschend, dass in diesem Zeitraum sehr dynamischen Prozesse stattfinden. Hierbei sollen Subklassen der Semaphorine bei der Leitung von SGN und der Bildung von Synapsen behilflich sein (177, 228, 229). MZ besitzen eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren, zu denen auch der CD72-Rezeptor, dessen natürliche Liganden Semaphorin 4D ist, gezählt wird (230, 231). CD72 reguliert die B-Zell-Aktivierung (232) und reduziert in humane MZ die SCF-vermittelte Proliferation sowie die Chemotaxis (231). Welchen Effekt jedoch Semaphorine auf Cochlea-MZ haben, ob sie von MZ synthetisiert werden und dies ein Grund für die Fehlinnervation der Haarzellen in MZ-Defizienten Mäusen ist, muss noch erforscht werden.

Neben den Abnormitäten in den SGN konnten in heterozygoten und homozygoten MZ-Defizienten Mäusen auch morphologische Differenzen in den Typ II SGN beobachtet werden. In diesem Fall wurde die Drehung der Fasern zur Basis (233) stark gestört und wiesen eine Wendung zum apikalen Abschnitt der Cochlea auf. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Veröffentlichung von Fritsch et al. (2010) beschrieben (120). So untersuchten sie die Rolle des Prox1 Gens im sich entwickelnden Innenohr (120). Es konnte festgestellt werden, dass die Haarzellen sich in Prox1 mutierten Mausstämmen zwar differenziert hatten, jedoch die Innervation der Typ II SGN stark gestört war, was sich durch die Wendung der Fasern entweder zur Basis oder zum Apex der Cochlea äußerte (120). Auch konnte in dieser Arbeit eine nahezu normale Haarzellmorphologie in MZ-Defizienten Mäusen beobachtet werden, was die Vermutung nahelegt, dass in diesen Mäusen die neuronale Leitung der Typ I und Typ II SGN nicht normalgemäß ablief und die MZ in diesem noch ungeklärten Zusammenhang eine Rolle übernehmen könnte.

Darüber hinaus wurde erstmalig im C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1* Mausmodell (160) die MZ-Anzahl in der LW der Cochlea geprüft. So konnte in C57BL/6-Cpa3-Cre; *Mcl-1*^{fl/fl} Mäusen eine 100%ige Reduktion der LW-MZ festgestellt werden, während man in der Veröffentlichung von Lilla et al. (2011) eine Reduktion zwischen 92%-100% in diversen Geweben beobachtete (160). Somit suggeriert diese Beobachtung, dass die oben beschriebenen Ergebnisse darauf basieren, dass die MZ in der Cochlea zu 100% depletiert waren. Um die präsentierten Ergebnisse zu festigen, laufen im HNO-Forschungslabor der Charité – Universitätsmedizin weitere Experimente mit dem MZ-Defizienten Mausmodell, die zur Untersuchung der aufgestellten Hypothesen beitragen soll.

5.7. Schlussfolgerung und Ausblick

Um die vorliegende Arbeit inhaltlich abzuschließen, möchte ich die aufgezeigten Ergebnisse rekapitulieren und die eigens gesteckten Ziele als erreicht abzeichnen.

Diskussion

MZ mögen scheinbar einen signifikanten Einfluss auf pathologische als auch physiologische Prozesse in der Cochlea ausüben. Dies konnte mit *in vitro* Experimenten und MZ-Defizienten Mäusen gezeigt werden. Der Mastzellstabilisator Cromoglicinsäure wies nicht nur einen protektiven Effekt auf den Cisplatin-induzierten Haarzellverlust auf, sondern auch auf die neurotoxische Wirkung von Cisplatin. Noch tiefgründiger hierbei zu erforschen gilt der tatsächliche Mechanismus von MZ in Cisplatin-induzierter Ototoxizität, indem die freigesetzten Mediatoren und der biochemische Prozess näher untersucht werden müssen, wobei durch diese Arbeit eine gute Grundlage geschaffen wurde. Daraus könnten sich vielversprechende therapeutische Ansätze für die Behandlung von Cisplatin-induzierten Hörverlust ergeben. Auch die Darlegung der Erkenntnis, dass MZ-Defiziente Mäuse Abnormitäten in der neuronalen Innervation der Haarzellen aufwiesen, zeigt einen bis dahin noch nicht beschriebenen Einfluss von MZ in der Neurogenese von SGN. Es konnte somit die Beteiligung der MZ in pathologischen als auch physiologischen Prozessen aufgezeigt werden, der sowohl durch weitere *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten in Jungtieren, aber auch adulten Tieren untermauert werden muss. Daher laufen im HNO-Forschungslabor der Charité – Universitätsmedizin zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit weitere Versuche, wodurch die aufgekomenen Hypothesen im Laufe dieser Arbeit bestätigt oder revidiert werden können. Somit stellt diese Arbeit eine fundierte Basis für das Erforschen weiterer Kausalitäten in diesem bis dato noch wenig erforschten Forschungsgebiet der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde dar. Mögliche Ansatzpunkte wären klinische Studien, in denen Patienten/Patientinnen vor einer Cisplatin Behandlung Cromoglicinsäure erhalten und anschließend das Hörvermögen im Verlauf der Therapie geprüft wird. Darüber hinaus sollten neurothrophe Mediatoren in MZ-Defizienten Mäusen geprüft werden oder die Interaktion von MZ mit anderen Zellen in der Cochlea, um nur einige Ansatzpunkte zu nennen. Eine intensivere Zusammenarbeit der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde mit der Immunologie und der Dermatologie, wie diese Arbeit als Beispiel vorangeht, könnte möglicherweise weitere ungeklärte Fragen beantworten und das Patientenwohl erheblich bessern.

Literaturverzeichnis

1. Recklinghausen Fv. Über Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie*. 1863;28:157-97.
2. Waldeyer W. Über Bindegewebszellen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1875;11:176-94.
3. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1877;13:263-78.
4. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. *Archiv für Anatomie und Physiologie*. 1879;3:166-9.
5. Riley JF. Histamine in tissue mast cells. *Science*. 1953;118(3064):332.
6. Riley JF. The effects of histamine-liberators on the mast cells of the rat. *J Pathol Bacteriol*. 1953;65(2):471-9.
7. Nigrovic PA, Lee DM. Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(1):1-11.
8. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1215-23.
9. Toniato E, Frydas I, Robuffo I, Ronconi G, Caraffa A, Kritas SK, Conti P. Activation and inhibition of adaptive immune response mediated by mast cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017;31(3):543-8.
10. Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11408-13.
11. Kitamura Y, Oboki K, Ito A. Development of mast cells. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2007;83(6):164-74.
12. Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, Matsuda H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci*. 1993;306(3):185-91.
13. Kitamura Y, Sonoda T, Nakano T, Hayashi C, Asai H. Differentiation processes of connective tissue mast cells in living mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985;77(1-2):144-50.
14. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK, Tam SY, Costa JJ. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(1-3):51-3.
15. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997;77(4):1033-79.
16. McNiece IK, Briddell RA. Stem cell factor. *J Leukoc Biol*. 1995;58(1):14-22.
17. Tsai M, Shih LS, Newlands GF, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, Miller HR, Geissler EN, Galli SJ. The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J Exp Med*. 1991;174(1):125-31.
18. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(10):1037-51.
19. Davidson S, Mansour A, Gallily R, Smolarski M, Rofolovitch M, Ginsburg H. Mast cell differentiation depends on T cells and granule synthesis on fibroblasts. *Immunology*. 1983;48(3):439-52.
20. Tsuji K, Nakahata T, Takagi M, Kobayashi T, Ishiguro A, Kikuchi T, Naganuma K, Koike K, Miyajima A, Arai K, et al. Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *Blood*. 1990;75(2):421-7.
21. Hamaguchi Y, Kanakura Y, Fujita J, Takeda S, Nakano T, Tarui S, Honjo T, Kitamura Y. Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J Exp Med*. 1987;165(1):268-73.

22. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res.* 2006;34(2):97-115.
23. Takagi M, Koike K, Nakahata T. Antiproliferative effect of IFN-gamma on proliferation of mouse connective tissue-type mast cells. *J Immunol.* 1990;145(6):1880-4.
24. Ginsburg H. The in vitro differentiation and culture of normal mast cells from the mouse thymus. *Ann N Y Acad Sci.* 1963;103:20-39.
25. Ginsburg H, Sachs L. Formation of Pure Suspensions of Mast Cells in Tissue Culture by Differentiation of Lymphoid Cells from the Mouse Thymus. *J Natl Cancer Inst.* 1963;31:1-39.
26. Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest.* 1990;62(1):5-33.
27. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev.* 2007;217:65-78.
28. Abraham SN, Malaviya R. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun.* 1997;65(9):3501-8.
29. Beaven MA, Metzger H. Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. *Immunol Today.* 1993;14(5):222-6.
30. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):773-86.
31. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012;18(5):693-704.
32. Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity.* 2012;37(1):25-33.
33. Kiernan JA. Production and life span of cutaneous mast cells in young rats. *J Anat.* 1979;128(Pt 2):225-38.
34. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):478-94.
35. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2015;6:620.
36. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):440-52.
37. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(1):53-9.
38. Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog Allergy.* 1984;34:1-141.
39. Beil WJ, Schulz M, Wefelmeyer U. Mast cell granule composition and tissue location--a close correlation. *Histol Histopathol.* 2000;15(3):937-46.
40. Jamur MC, Oliver C. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:1390-406.
41. Huntley JF. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J Comp Pathol.* 1992;107(4):349-72.
42. Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1966;66(3):289-302.
43. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):93-104.
44. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):205-17.
45. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):218-30.
46. Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, Metz M, Maurer M, Bulfone-Paus S. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood.* 2005;106(3):978-87.

47. Redegeld FA, Yu Y, Kumari S, Charles N, Blank U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev.* 2018;282(1):87-113.
48. Sandig H, Bulfone-Paus S. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol.* 2012;3:185.
49. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest.* 2002;109(10):1351-9.
50. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):787-99.
51. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179-90.
52. Johnson D, Krenger W. Interactions of mast cells with the nervous system--recent advances. *Neurochem Res.* 1992;17(9):939-51.
53. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature.* 2004;432(7016):512-6.
54. Chakraborty S, Kar N, Kumari L, De A, Bera T. Inhibitory effect of a new orally active cedrol-loaded nanostructured lipid carrier on compound 48/80-induced mast cell degranulation and anaphylactic shock in mice. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:4849-68.
55. Kashem SW, Subramanian H, Collington SJ, Magotti P, Lambris JD, Ali H. G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *Eur J Pharmacol.* 2011;668(1-2):299-304.
56. Palomaki VA, Laitinen JT. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT1A receptors in rat brain sections. *Br J Pharmacol.* 2006;147(6):596-606.
57. Zhang D, Spielmann A, Wang L, Ding G, Huang F, Gu Q, Schwarz W. Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2. *Physiol Res.* 2012;61(1):113-24.
58. Brzezinska-Blaszczyk E, Mincikiewicz M, Ochocki J. Effect of cisplatin and cis-platinum (II) phosphonate complex on murine mast cells. *Eur J Pharmacol.* 1996;298(2):155-8.
59. Vig M, DeHaven WI, Bird GS, Billingsley JM, Wang H, Rao PE, Hutchings AB, Jouvin MH, Putney JW, Kinet JP. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol.* 2008;9(1):89-96.
60. Burwen SJ. Recycling of mast cells following degranulation in vitro: an ultrastructural study. *Tissue Cell.* 1982;14(1):125-34.
61. Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. Mast cells in health and disease. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(11):473-84.
62. Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(3):298-312.
63. Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y. Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(1 Pt 2):S78-84.
64. Burke SM, Issekutz TB, Mohan K, Lee PW, Shmulevitz M, Marshall JS. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood.* 2008;111(12):5467-76.
65. Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1633-41.
66. Mendez-Enriquez E, Hallgren J. Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. *Front Immunol.* 2019;10:821.

67. Church MK, Kolkhir P, Metz M, Maurer M. The role and relevance of mast cells in urticaria. *Immunol Rev.* 2018;282(1):232-47.
68. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol.* 2004;19(1):259-70.
69. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796(1):19-26.
70. Dvorak AM, Monahan RA, Osage JE, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol.* 1980;11(6):606-19.
71. Roberts-Thomson IC, Fon J, Uylaki W, Cummins AG, Barry S. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;5(6):703-16.
72. Marquardt DL. Histamine. *Clin Rev Allergy.* 1983;1(3):343-51.
73. Riley JF, West GB. Histamine in tissue mast cells. *J Physiol.* 1952;117(4):72P-3P.
74. Lundquist A, Pejler G. Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(6):965-75.
75. Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S127-35.
76. Lieberman P. The basics of histamine biology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;106(2 Suppl):S2-5.
77. Azuma H, Sawada S, Takeuchi S, Higashiyama K, Kakigi A, Takeda T. Immunohistochemical localization of histamine receptors in rat cochlea. *Laryngoscope.* 2004;114(12):2249-51.
78. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305(3):1212-21.
79. O'Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, Gladue RP, Foo S, Trim S, Peter B, Trevethick M, Fidock M. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res.* 2002;22(1-4):431-48.
80. Takumida M, Takumida H, Anniko M. Localization of histamine (H1, H2, H3 and H4) receptors in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol.* 2016;136(6):537-44.
81. Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol.* 2011;32(10):478-85.
82. Hendrix S, Warnke K, Siebenhaar F, Peters EM, Nitsch R, Maurer M. The majority of brain mast cells in B10.PL mice is present in the hippocampal formation. *Neurosci Lett.* 2006;392(3):174-7.
83. Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev.* 2018;282(1):168-87.
84. Williams RM, Bienenstock J, Stead RH. Mast cells: the neuroimmune connection. *Chem Immunol.* 1995;61:208-35.
85. Ogawa K, Nabe T, Yamamura H, Kohno S. Nanomolar concentrations of neuropeptides induce histamine release from peritoneal mast cells of a substrain of Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 1999;374(2):285-91.
86. Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M, Bienenstock J. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. *J Immunol.* 1999;163(5):2410-5.
87. Nautiyal KM, Dailey CA, Jahn JL, Rodriguez E, Son NH, Sweedler JV, Silver R. Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function. *Eur J Neurosci.* 2012;36(3):2347-59.
88. Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi-Montalcini R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(9):3739-43.

89. Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1995;18:223-53.
90. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987;237(4819):1154-62.
91. Skaper SD. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology.* 2017;151(1):1-15.
92. Simons FE. 9. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(2 Suppl):S402-7; quiz S20.
93. Ogawa Y, Grant JA. Mediators of anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(2):249-60, vii.
94. Zhang T, Finn DF, Barlow JW, Walsh JJ. Mast cell stabilisers. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:158-68.
95. Holgate ST. Inhaled sodium cromoglycate. *Respir Med.* 1996;90(7):387-90.
96. Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke.* 2009;40(9):3107-12.
97. Kempuraj D, Ahmed ME, Selvakumar GP, Thangavel R, Raikwar SP, Zaheer SA, Iyer SS, Govindarajan R, Nattanmai Chandrasekaran P, Burton C, James D, Zaheer A. Acute Traumatic Brain Injury-Induced Neuroinflammatory Response and Neurovascular Disorders in the Brain. *Neurotox Res.* 2020.
98. Granucci EJ, Griciuc A, Mueller KA, Mills AN, Le H, Dios AM, McGinty D, Pereira J, Elmaleh D, Berry JD, Paganoni S, Cudkowicz ME, Tanzi RE, Sadri-Vakili G. Cromolyn sodium delays disease onset and is neuroprotective in the SOD1. *Sci Rep.* 2019;9(1):17728.
99. Lohman RJ, Hamidon JK, Reid RC, Rowley JA, Yau MK, Halili MA, Nielsen DS, Lim J, Wu KC, Loh Z, Do A, Suen JY, Iyer A, Fairlie DP. Exploiting a novel conformational switch to control innate immunity mediated by complement protein C3a. *Nat Commun.* 2017;8(1):351.
100. Tanaka S, Mikura S, Hashimoto E, Sugimoto Y, Ichikawa A. Ca²⁺ influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE. *Eur J Immunol.* 2005;35(2):460-8.
101. Yang Y, Lu JY, Wu X, Summer S, Whoriskey J, Saris C, Reagan JD. G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium. *Pharmacology.* 2010;86(1):1-5.
102. Mackenzie AE, Lappin JE, Taylor DL, Nicklin SA, Milligan G. GPR35 as a Novel Therapeutic Target. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:68.
103. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF, Jr., George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics.* 1998;47(2):310-3.
104. Farooq SM, Hou Y, Li H, O'Meara M, Wang Y, Li C, Wang JM. Disruption of GPR35 Exacerbates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Dig Dis Sci.* 2018;63(11):2910-22.
105. Yang Y, Fu A, Wu X, Reagan JD. GPR35 is a target of the loop diuretic drugs bumetanide and furosemide. *Pharmacology.* 2012;89(1-2):13-7.
106. Fettiplace R. Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Compr Physiol.* 2017;7(4):1197-227.
107. Fettiplace R, Kim KX. The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiol Rev.* 2014;94(3):951-86.
108. Ekdale EG. Form and function of the mammalian inner ear. *J Anat.* 2016;228(2):324-37.
109. Pape H KA, Silberagl S. *Physiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2018.
110. Lüllmann-Rauch R AE. *Taschenlehrbuch Histologie* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
111. Dawes P, Emsley R, Cruickshanks KJ, Moore DR, Fortnum H, Edmondson-Jones M, McCormack A, Munro KJ. Hearing loss and cognition: the role of hearing AIDS, social isolation and depression. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119616.

112. Vergleichend-anatomische Untersuchungen über das innere Gehörorgan des Menschen und der Säugethiere [Internet]. Ehrlich. 1845 [cited 02.10.2020]. Available from: <https://digi.ub.uni-heidelberg.de/diglit/hyrtl1845>.
113. Zidanic M, Brownell WE. Fine structure of the intracochlear potential field. I. The silent current. *Biophys J*. 1990;57(6):1253-68.
114. Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*. 2002;165(1-2):1-9.
115. Lim DJ. Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res*. 1986;22:117-46.
116. Sanchez Del Rey A, Sanchez Fernandez JM, Gutierrez N, Martinez A, Santaolalla Montoya F. Morphological and morphometric study on human Scarpa ganglion development. *Acta Otolaryngol*. 2013;133(4):352-60.
117. Carricondo F, Romero-Gómez B. The Cochlear Spiral Ganglion Neurons: The Auditory Portion of the VIII Nerve. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019;302(3):463-71.
118. Rusznak Z, Szucs G. Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. *Pflugers Arch*. 2009;457(6):1303-25.
119. Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T. Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci*. 2009;12(4):444-53.
120. Fritsch B, Dillard M, Lavado A, Harvey NL, Jahan I. Canal cristae growth and fiber extension to the outer hair cells of the mouse ear require Prox1 activity. *PLoS One*. 2010;5(2):e9377.
121. Huang LC, Barclay M, Lee K, Peter S, Housley GD, Thorne PR, Montgomery JM. Synaptic profiles during neurite extension, refinement and retraction in the developing cochlea. *Neural Dev*. 2012;7:38.
122. Weisz CJ, Lehar M, Hiel H, Glowatzki E, Fuchs PA. Synaptic transfer from outer hair cells to type II afferent fibers in the rat cochlea. *J Neurosci*. 2012;32(28):9528-36.
123. Ashmore J, Avan P, Brownell WE, Dallos P, Dierkes K, Fettiplace R, Grosh K, Hackney CM, Hudspeth AJ, Julicher F, Lindner B, Martin P, Meaud J, Petit C, Santos-Sacchi J, Sacchi JR, Canlon B. The remarkable cochlear amplifier. *Hear Res*. 2010;266(1-2):1-17.
124. Lim R, Brichta AM. Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hear Res*. 2016;338:9-21.
125. Yoshioka T, Sakakibara M. Physical aspects of sensory transduction on seeing, hearing and smelling. *Biophysics (Nagoya-shi)*. 2013;9:183-91.
126. Recanzone GH. Perception of auditory signals. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1224:96-108.
127. Wilson BS, Tucci DL, Merson MH, O'Donoghue GM. Global hearing health care: new findings and perspectives. *Lancet*. 2017;390(10111):2503-15.
128. Shi L, Chang Y, Li X, Aiken S, Liu L, Wang J. Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. *Neural Plast*. 2016;2016:6143164.
129. Lanvers-Kaminsky C, Zehnhoff-Dinnesen AA, Parfitt R, Ciarimboli G. Drug-induced ototoxicity: Mechanisms, Pharmacogenetics, and protective strategies. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;101(4):491-500.
130. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205:698-9.
131. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.
132. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(8-9):1229-35.
133. Heiger-Bernays WJ, Essigmann JM, Lippard SJ. Effect of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and related platinum complexes on eukaryotic DNA replication. *Biochemistry*. 1990;29(36):8461-6.

134. Cianfrone G, Pentangelo D, Cianfrone F, Mazzei F, Turchetta R, Orlando MP, Altissimi G. Pharmacological drugs inducing ototoxicity, vestibular symptoms and tinnitus: a reasoned and updated guide. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(6):601-36.
135. Schacht J, Talaska AE, Rybak LP. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec (Hoboken).* 2012;295(11):1837-50.
136. Brock PR, Knight KR, Freyer DR, Campbell KC, Steyger PS, Blakley BW, Rassekh SR, Chang KW, Fligor BJ, Rajput K, Sullivan M, Neuwelt EA. Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new International Society of Pediatric Oncology Boston ototoxicity scale. *J Clin Oncol.* 2012;30(19):2408-17.
137. Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, Edemir B, Pavenstadt H, Lanvers-Kaminsky C, am Zehnhoff-Dinnesen A, Schinkel AH, Koepsell H, Jurgens H, Schlatter E. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1169-80.
138. Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;174(1):27-34.
139. Goncalves MS, Silveira AF, Teixeira AR, Hyppolito MA. Mechanisms of cisplatin ototoxicity: theoretical review. *J Laryngol Otol.* 2013;127(6):536-41.
140. Klis SF, O'Leary SJ, Hamers FP, De Groot JC, Smoorenburg GF. Reversible cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. *Neuroreport.* 2000;11(3):623-6.
141. Meech RP, Campbell KC, Hughes LP, Rybak LP. A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. *Hear Res.* 1998;124(1-2):44-59.
142. Tsukasaki N, Whitworth CA, Rybak LP. Acute changes in cochlear potentials due to cisplatin. *Hear Res.* 2000;149(1-2):189-98.
143. Kanat O, Ertas H, Caner B. Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. *World J Clin Oncol.* 2017;8(4):329-35.
144. Yu X, Man R, Li Y, Yang Q, Li H, Yang H, Bai X, Yin H, Li J, Wang H. Paeoniflorin protects spiral ganglion neurons from cisplatin-induced ototoxicity: Possible relation to PINK1/BAD pathway. *J Cell Mol Med.* 2019;23(8):5098-107.
145. van Ruijven MW, de Groot JC, Klis SF, Smoorenburg GF. The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res.* 2005;205(1-2):241-8.
146. Kelley MR, Jiang Y, Guo C, Reed A, Meng H, Vasko MR. Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. *PLoS One.* 2014;9(9):e106485.
147. Juhn SK, Rybak LP, Fowlks WL. Transport characteristics of the blood--perilymph barrier. *Am J Otolaryngol.* 1982;3(6):392-6.
148. Juhn SK, Rybak LP, Prado S. Nature of blood-labyrinth barrier in experimental conditions. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1981;90(2 Pt 1):135-41.
149. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007;28(1):12-8.
150. Juhn SK, Rybak LP. Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol.* 1981;91(5-6):529-34.
151. Shi X. Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (review). *Hear Res.* 2016;338:52-63.
152. Rask-Andersen H, Stahle J. Lymphocyte-macrophage activity in the endolymphatic sac. An ultrastructural study of the rugose endolymphatic sac in the guinea pig. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1979;41(4):177-92.

153. Lang H, Ebihara Y, Schmiedt RA, Minamiguchi H, Zhou D, Smythe N, Liu L, Ogawa M, Schulte BA. Contribution of bone marrow hematopoietic stem cells to adult mouse inner ear: mesenchymal cells and fibrocytes. *J Comp Neurol.* 2006;496(2):187-201.
154. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J. Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *J Neurosci Res.* 2008;86(8):1758-67.
155. Sato E, Shick HE, Ransohoff RM, Hirose K. Repopulation of cochlear macrophages in murine hematopoietic progenitor cell chimeras: the role of CX3CR1. *J Comp Neurol.* 2008;506(6):930-42.
156. O'Malley JT, Nadol JB, Jr., McKenna MJ. Anti CD163+, Iba1+, and CD68+ Cells in the Adult Human Inner Ear: Normal Distribution of an Unappreciated Class of Macrophages/Microglia and Implications for Inflammatory Otopathology in Humans. *Otol Neurotol.* 2016;37(1):99-108.
157. Poulsen H. Myxoedematose bindevævsforandringer indflydelse på labyrinthens funktion. *Ejnar Munksgaard.* 1959;59-78.
158. Sleekx JP, Shea JJ, Peremans JM. The mast cells of the inner ear. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1976;30(5):443-9.
159. Szczepek AJ, Dudnik T, Karayay B, Sergeeva V, Olze H, Smorodchenko A. Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents. *Brain Sci.* 2020;10(10).
160. Lilla JN, Chen CC, Mukai K, BenBarak MJ, Franco CB, Kalesnikoff J, Yu M, Tsai M, Piliponsky AM, Galli SJ. Reduced mast cell and basophil numbers and function in Cpa3-Cre; Mcl-1fl/fl mice. *Blood.* 2011;118(26):6930-8.
161. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature.* 2003;426(6967):671-6.
162. Serafin WE, Dayton ET, Gravalles PM, Austen KF, Stevens RL. Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as a differentiation marker. *J Immunol.* 1987;139(11):3771-6.
163. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147-59.
164. Meurer SK, Neß M, Weiskirchen S, Kim P, Tag CG, Kauffmann M, Huber M, Weiskirchen R. Isolation of Mature (Peritoneum-Derived) Mast Cells and Immature (Bone Marrow-Derived) Mast Cell Precursors from Mice. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158104.
165. Ribatti D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;176(1):55-60.
166. McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Udem BJ, Kulka M, Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature.* 2015;519(7542):237-41.
167. Sobkowicz HM, Loftus JM, Slapnick SM. Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1993;502:3-36.
168. Parker M, Brugeaud A, Edge AS. Primary culture and plasmid electroporation of the murine organ of Corti. *J Vis Exp.* 2010(36).
169. Bergstresser PR, Tigelaar RE, Tharp MD. Conjugated avidin identifies cutaneous rodent and human mast cells. *J Invest Dermatol.* 1984;83(3):214-8.
170. Bussolati G, Gugliotta P. Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC). *J Histochem Cytochem.* 1983;31(12):1419-21.
171. Wulf E, Deboben A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4498-502.
172. Small J, Rottner K, Hahne P, Anderson KI. Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech.* 1999;47(1):3-17.

173. Coons AH. Antibodies and antigens labelled with fluorescein. *Schweiz Z Pathol Bakteriolog.* 1959;22:693-9.
174. Coons AH. Labelled antigens and antibodies. *Annu Rev Microbiol.* 1954;8:333-52.
175. Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, Church MK, Saluja R. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2018;9:1873.
176. Wu DK, Kelley MW. Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(8):a008409.
177. Coate TM, Spita NA, Zhang KD, Isgrig KT, Kelley MW. Neuropilin-2/Semaphorin-3F-mediated repulsion promotes inner hair cell innervation by spiral ganglion neurons. *Elife.* 2015;4.
178. Sonntag M, Englitz B, Kopp-Scheinflug C, Rubsamen R. Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: an in vivo study in mice. *J Neurosci.* 2009;29(30):9510-20.
179. Cox BC, Chai R, Lenoir A, Liu Z, Zhang L, Nguyen DH, Chalasani K, Steigelman KA, Fang J, Rubel EW, Cheng AG, Zuo J. Spontaneous hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea in vivo. *Development.* 2014;141(4):816-29.
180. Walters BJ, Zuo J. Postnatal development, maturation and aging in the mouse cochlea and their effects on hair cell regeneration. *Hear Res.* 2013;297:68-83.
181. He W, Yu J, Sun Y, Kong W. Macrophages in Noise-Exposed Cochlea: Changes, Regulation and the Potential Role. *Aging Dis.* 2020;11(1):191-9.
182. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One.* 2012;7(8):e42656.
183. Ogier JM, Burt RA, Drury HR, Lim R, Nayagam BA. Organotypic Culture of Neonatal Murine Inner Ear Explants. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:170.
184. Rohlich P, Anderson P, Uvnas B. Electron microscope observations on compounds 48-80-induced degranulation in rat mast cells. Evidence for sequential exocytosis of storage granules. *J Cell Biol.* 1971;51(21):465-83.
185. Oka T, Kalesnikoff J, Starkl P, Tsai M, Galli SJ. Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a 'mast cell stabilizer' in mice. *Lab Invest.* 2012;92(10):1472-82.
186. Graevskaya EE, Akhalaya MY, Goncharenko EN. Effects of cold stress and epinephrine on degranulation of peritoneal mast cells in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2001;131(4):333-5.
187. Trunova GV. Morphofunctional characteristic of mast cells in BALB/c and C57Bl/6 mice during cold exposure. *Bull Exp Biol Med.* 2004;138(2):182-4.
188. Oh CK, Drescher MJ, Hatfield JS, Drescher DG. Selective expression of serotonin receptor transcripts in the mammalian cochlea and its subdivisions. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;70(1):135-40.
189. Wasif K, Wasif N, Saif MW. Imatinib-induced Ototoxicity in a Patient with Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST). *Cureus.* 2016;8(10):e848.
190. Attili VS, Bapsy PP, Anupama G, Lokanatha D. Irreversible sensorineural hearing loss due to Imatinib. *Leuk Res.* 2008;32(6):991-2.
191. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood.* 2004;103(8):3222-5.
192. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, Cross NC, Cavenagh JD. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res.* 2006;30(4):373-8.
193. Samorapoompichit P, Steiner M, Lucas T, Wachtler F, Schedled A, Sperr WR, Valent P. Induction of apoptosis in the human mast cell leukemia cell line HMC-1 by various antineoplastic drugs. *Leuk Lymphoma.* 2003;44(3):509-15.

194. Mazzoldi EL, Pavan S, Pilotto G, Leone K, Pagotto A, Frezzini S, Nicoletto MO, Amadori A, Pasto A. A juxtacrine/paracrine loop between C-Kit and stem cell factor promotes cancer stem cell survival in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(6):412.
195. Bhattacharya U, Gutter-Kapon L, Kan T, Boyango I, Barash U, Yang SM, Liu J, Gross-Cohen M, Sanderson RD, Shaked Y, Ilan N, Vlodaysky I. Heparanase and Chemotherapy Synergize to Drive Macrophage Activation and Enhance Tumor Growth. *Cancer Res.* 2020;80(1):57-68.
196. Clerici WJ, DiMartino DL, Prasad MR. Direct effects of reactive oxygen species on cochlear outer hair cell shape in vitro. *Hear Res.* 1995;84(1-2):30-40.
197. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van de Water TR. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.* 1997;18(5):559-71.
198. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem.* 2004;279(44):46065-72.
199. Summers SA, Chan J, Gan PY, Dewage L, Nozaki Y, Steinmetz OM, Nikolic-Paterson DJ, Kitching AR, Holdsworth SR. Mast cells mediate acute kidney injury through the production of TNF. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(12):2226-36.
200. Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP, Henricks PA, Folkerts G. Sodium cromoglycate and doxantrazole are oxygen radical scavengers. *Eur Respir J.* 2002;20(4):867-72.
201. Brooks AC, Whelan CJ, Purcell WM. Reactive oxygen species generation and histamine release by activated mast cells: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Br J Pharmacol.* 1999;128(3):585-90.
202. Wu Q, Wang GP, Xie J, Guo JY, Gong SS. Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Ototoxicity in Mouse Cochlear Organotypic Culture. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127703.
203. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22021-8.
204. Tsukahara T, Hamouda N, Utsumi D, Matsumoto K, Amagase K, Kato S. G protein-coupled receptor 35 contributes to mucosal repair in mice via migration of colonic epithelial cells. *Pharmacol Res.* 2017;123:27-39.
205. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carla V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology.* 2011;60(7-8):1227-31.
206. Alvarez XA, Franco A, Fernandez-Novoa L, Cacabelos R. Effects of neurotoxic lesions in histaminergic neurons on brain tumor necrosis factor levels. *Agents Actions.* 1994;41 Spec No:C70-2.
207. Dong H, Zhang W, Zeng X, Hu G, Zhang H, He S, Zhang S. Histamine induces upregulated expression of histamine receptors and increases release of inflammatory mediators from microglia. *Mol Neurobiol.* 2014;49(3):1487-500.
208. Rocha SM, Pires J, Esteves M, Graca B, Bernardino L. Histamine: a new immunomodulatory player in the neuron-glia crosstalk. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:120.
209. Rocha SM, Saraiva T, Cristovao AC, Ferreira R, Santos T, Esteves M, Saraiva C, Je G, Cortes L, Valero J, Alves G, Klivanov A, Kim YS, Bernardino L. Histamine induces microglia activation and dopaminergic neuronal toxicity via H1 receptor activation. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):137.
210. Willets JM, Taylor AH, Shaw H, Konje JC, Challiss RA. Selective regulation of H1 histamine receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in uterine smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2008;22(8):1893-907.

211. Galeotti N, Malmberg-Aiello P, Bartolini A, Schunack W, Ghelardini C. H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuropharmacology*. 2004;47(2):295-303.
212. Valtcheva MV, Davidson S, Zhao C, Leitges M, Gereau RWt. Protein kinase Cdelta mediates histamine-evoked itch and responses in pruriceptors. *Mol Pain*. 2015;11:1.
213. Yawata I, Tanaka K, Nakagawa Y, Watanabe Y, Murashima YL, Nakano K. Role of histaminergic neurons in development of epileptic seizures in EL mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;132(1):13-7.
214. Kukko-Lukjanov TK, Soini S, Taira T, Michelsen KA, Panula P, Holopainen IE. Histaminergic neurons protect the developing hippocampus from kainic acid-induced neuronal damage in an organotypic coculture system. *J Neurosci*. 2006;26(4):1088-97.
215. Zhang C, Yu Y, Ma L, Fu P. Histamine H3 Receptor Promotes Cell Survival via Regulating PKA/CREB/CDKN1A Signal Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2020;13:3765-76.
216. Tanaka S, Sakaguchi M, Yoneyama H, Usami Y, Harusawa S. Histamine H3 receptor antagonist OUP-186 attenuates the proliferation of cultured human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;480(3):479-85.
217. Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC. Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Res*. 1999;849(1-2):1-15.
218. Skaper SD, Pollock M, Facci L. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;97(2):177-85.
219. Fritsch B. Development of inner ear afferent connections: forming primary neurons and connecting them to the developing sensory epithelia. *Brain Res Bull*. 2003;60(5-6):423-33.
220. Fritsch B, Tessarollo L, Coppola E, Reichardt LF. Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog Brain Res*. 2004;146:265-78.
221. Liebl DJ, Tessarollo L, Palko ME, Parada LF. Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and TrkC-deficient embryonic mice. *J Neurosci*. 1997;17(23):9113-21.
222. Silver R, Silverman AJ, Vitkovic L, Lederhendler, II. Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci*. 1996;19(1):25-31.
223. Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, Aloe L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):10955-60.
224. di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, Koliopanos A, Bley T, Di Sebastiano P, Innocenti P, Zimmermann A, Buchler MW. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2000;46(5):670-9.
225. Pickles JO. Expression of Ephs and ephrins in developing mouse inner ear. *Hear Res*. 2003;178(1-2):44-51.
226. Irie F, Okuno M, Matsumoto K, Pasquale EB, Yamaguchi Y. Heparan sulfate regulates ephrin-A3/EphA receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(34):12307-12.
227. Elieh Ali Komi D, Wohrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(3):342-65.
228. Jung JS, Zhang KD, Wang Z, McMurray M, Tkaczuk A, Ogawa Y, Hertzano R, Coate TM. Semaphorin-5B Controls Spiral Ganglion Neuron Branch Refinement during Development. *J Neurosci*. 2019;39(33):6425-38.
229. Salehi P, Ge MX, Gundimeda U, Michelle Baum L, Lael Cantu H, Lavinsky J, Tao L, Myint A, Cruz C, Wang J, Nikolakopoulou AM, Abdala C, Kelley MW, Ohyama T, Coate TM, Friedman RA. Role of Neuropilin-1/Semaphorin-3A signaling in the functional and morphological integrity of the cochlea. *PLoS Genet*. 2017;13(10):e1007048.

230. Nkyimbeng-Takwi E, Chapoval SP. Biology and function of neuroimmune semaphorins 4A and 4D. *Immunol Res.* 2011;50(1):10-21.
231. Kataoka TR, Kumanogoh A, Bandara G, Metcalfe DD, Gilfillan AM. CD72 negatively regulates KIT-mediated responses in human mast cells. *J Immunol.* 2010;184(5):2468-75.
232. Wu HJ, Bondada S. CD72, a coreceptor with both positive and negative effects on B lymphocyte development and function. *J Clin Immunol.* 2009;29(1):12-21.
233. Rubel EW, Fritsch B. Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:51-101.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Betül Karayay, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle der Mastzellen in der Physiologie und Pathologie der Cochlea (Englisch: The role of mast cells in the physiology and pathology of the cochlea) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Betül Karayay hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Szczepek AJ, Dudnik T, Karayay B, Sergeeva V, Olze H and Smorodchenko A, *Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents*. Brain Sci. 2020 Oct; 10(10): 697.

Beitrag im Einzelnen:

- Co-Autorenschaft
- Literaturlauswahl
- Mithilfe bei der Hypothesenerstellung (Ergebnis: 3.1.6 in der Publikation)
- Mitwirkung an der Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts im Peer-Review-Prozess
- Erstellung der Tabelle 1

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Szczeppek AJ, Dudnik T, Karayay B, Sergeeva V, Olze H and Smorodchenko A, *Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents*. Brain Sci. 2020 Oct; 10(10): 697.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen herzlich bedanken, die mich auf dem Weg der Entstehung dieser Dissertation mit viel Geduld, Hilfestellungen, Kreativität, Motivation, Ideen und konstruktiver Kritik unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Heidi Olze für die Möglichkeit, in ihrem Labor zu arbeiten und das damit verbundene Vertrauen sowie ihre fachliche Expertise und Betreuung bedanken.

Als meine direkte Betreuerin gebührt Frau Prof. Dr. Agnieszka Szczepek ein besonderer Dank. Zunächst einmal möchte ich mich für die Überlassung dieses einzigartigen Themas bedanken. Frau Prof. Dr. Szczepek wusste immer meine Ideen zu zügeln und in die richtige Richtung zu lenken. Nicht zuletzt gab Sie mir die Freiheit und die Hilfsbereitschaft mich frei wissenschaftlich zu entfalten.

Zudem möchte ich mich beim gesamten Team des HNO-Forschungslabors bedanken. Ich danke euch für die familiäre Zusammenarbeit, Unterstützung und die schöne Zeit, die wir hatten.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Marcus Maure und Dr. Jörg Scheffel sowie dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Maurer für die herzliche Aufnahme, die Zusammenarbeit und das Anvertrauen ihrer Mäuse bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein zutiefst empfundener Dank meiner geliebten Familie, die mich stets in allen Phasen meines Lebens unterstützt und mir die nötige Kraft gibt.

Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Karayay, Betül
E-mailadresse: betuel.karayay@charite.de
Matrikelnummer: 221861
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Heidi Olze
Promotionsinstitution/Klinik: HNO-Klinik

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin
Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Betül Karayay innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 11.10.2019
- Termin 2: 07.10.2020
- Termin 3: 30.10.2020

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Konzentration auf solide graphische Darstellung wegen kleiner Fallzahlen
- Korrekte Testauswahl (Kruskal-Wallis bzw. 2-way ANOVA)
- Adäquates Berichten der Post-Hoc-Tests

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 30.10.2020

Name des Beraters: Dario Zocholl



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Sitz: Reinhardtstr. 58