

**Aus der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde mit
Poliklinik Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H.-P. Zenner

Sektion Physiologische Akustik und Kommunikation

Leiter: Professor A. W. Gummer

**Calciumabhängige Fluoreszenzsignale im
Stereozilienbündel der äußeren Haarsinneszellen des
Meerschweinchens**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

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

vorgelegt von

Barbara Nam Ok Hainich, geb. Müller

aus

Seoul, Korea

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. W. Gummer
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. F. Schick

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Die Grundlagen des Hörvorgangs.....	3
1.1.1. Der Weg von der Ohrmuschel bis zum Innenohr	3
1.1.2. Das Innenohr	4
1.1.3. Funktionelle Verbindung der Strukturen des Innenohrs.....	7
1.1.4. Der Transduktions- und Verstärkungsmechanismus	9
1.2. Calcium – ein Kation mit großem Einfluss.....	11
1.2.1. Die Regulation und Funktion des freien intrazellulären Calciums der äußeren Haarsinneszellen	12
1.3. Lokalisation der Transduktionskanäle	14
1.4. Calciumindikatoren.....	16
1.5. Fluoreszenzentstehung.....	17
1.6. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	19
1.7. Aufgabenstellung	22
2. Methoden und Material	23
2.1. Tiere.....	23
2.2. Vorbereitung der physiologischen Lösungen	23
2.3. Allgemeine Vorbereitung.....	24
2.4. Zellpräparation	25
2.5. Calciumindikatorfarbstoff.....	25
2.6. Farbstoffinkubation.....	27
2.7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	28
2.8. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	29
2.9. Datenanalyse	32
2.10. Statistik	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Deflektion der Stereozilien	33
3.1.1. Bildliche Darstellung des Calciumsignals.....	33
3.1.2. Calciumsignal des gesamten Stereozilienbündels	36

3.1.3.	Lokalisierte Calciumsignale im Stereozilienbündel	36
3.2.	DHSM Experiment	37
3.2.1.	Bildliche Darstellung des Calciumsignals.....	37
3.2.2.	Calciumsignal des gesamten Stereozilienbündels	39
3.2.3.	Lokale DHSM-Wirkung	39
3.3.	Der Einfluss von DHSM auf die gemittelte intrazelluläre Calciumkonzentration	42
4.	Diskussion	44
4.1.	Physiologischer Zustand der äußeren Haarsinneszellen	45
4.2.	Intrazelluläre Calciumkonzentration und fluo-3-Konzentration	47
4.3.	Mechanische Stabilität der Zellen	49
4.4.	Calciumhomöostase.....	49
4.5.	Fluoreszenzintensitätsverlauf.....	51
4.6.	Lokalisation der Transduktionskanäle und der Tip links.....	53
4.7.	Reversibilität	54
4.8.	Ausblick.....	55
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literatur	59
7.	Danksagung	73
8.	Lebenslauf	74

1. Einleitung

1.1. Die Grundlagen des Hörvorgangs

Der Schall, welcher den adäquaten Reiz für das Ohr darstellt, ist von physikalischer Seite aus betrachtet eine Druckschwankung der Luft. Die Druckwelle ist durch drei Eigenschaften charakterisiert: i) durch die Frequenz, ii) durch die Amplitude oder Intensität und iii) durch die Phase. Je höher die Frequenz, desto höher empfinden wir den Ton. Die Amplitude hingegen sagt etwas über die Lautstärke aus, sie wird als Schalldruck gemessen. Umso größer der Schalldruck, umso lauter wird der Ton empfunden.

1.1.1. Der Weg von der Ohrmuschel bis zum Innenohr

Zuerst passiert der Schall die Ohrmuschel (*Auricula*) und wird durch den äußeren Gehörgang (*Meatus acustici externi*) zum Trommelfell (*Membrana tympani*) geleitet. Das Trommelfell stellt die Grenze zwischen dem Außenohr und dem mit Luft gefüllten Mittelohr dar. Der Hammer (*Malleus*), der dem Trommelfell aufsitzt, steht über den Amboss (*Incus*) mit dem Steigbügel (*Stapes*) in Kontakt. Die Fußplatte des Steigbügels wiederum liegt frei beweglich an der Membran des ovalen Fensters (*Fenestra vestibuli*) des Innenohrs. Das Mittelohr (*Cavum tympani*) als Ganzes (mit Hammer Amboss und Steigbügel) dient als Impedanzwandler (Møller, 1963; Khanna und Tonndorf, 1969). Durch schallinduzierte Vibrationen des Trommelfells wird die Schallenergie aus dem lufthaltigen äußeren Gehörgang über die Gehörknöchelchenkette auf die flüssigkeitsgefüllten Räume des Innenohrs übertragen. Träfe der Schall direkt von der Luft auf die Flüssigkeit, würde fast der gesamte Schall reflektiert werden, da die Flüssigkeit des Innenohrs nicht kompressibel ist und somit einen viel höheren Schallwellenwiderstand besitzt.

1.1.2. Das Innenohr

Das Innenohr umfasst bei Säugetieren zwei verschiedene Organe: die Cochlea und das Gleichgewichtsorgan. Für die Schallverarbeitung ist jedoch nur die Cochlea verantwortlich.

Die knöchernen Cochlea ist spiraling aufgewunden und beim Menschen aus 2,5 Windungen aufgebaut. Im Querschnitt der Cochlea lassen sich drei übereinander gelegenen Kanäle unterscheiden, wobei der oberste, die *Scala vestibuli* und der unterste Gang, die *Scala tympani* an der Schneckenspitze, dem Helikotrema, miteinander in Verbindung stehen. Sie sind beide mit Perilymphe gefüllt, deren Zusammensetzung einer extrazellulären Flüssigkeit mit niedrigem Kaliumgehalt (3,5 - 7 mM (Konishi *et al.*, 1979; Silverstein 1972)) entspricht. Der mittlere Gang, die *Scala media*, ist mit Endolymphe gefüllt und enthält das Corti'sche Organ. Die Endolymphe mit ihrem hohen Gehalt an Kalium (150 mM (Smith *et al.*, 1954; Silverstein, 1972; Bosher und Warren, 1978)) hat gegenüber der Perilymphe ein stark positives Potential, +85mV (von Békésy, 1952) – das sog. endocochleäre Potential - das durch eine Na^+/K^+ -ATPase der *Stria vascularis* (Mees, 1983), einem Blutgefäßgeflecht an der Außenseite der *Scala media*, erzeugt wird (Melichar und Syka, 1987; Offener *et al.*, 1987; Furukawa *et al.*, 1996). Die Grenze zu den beiden anderen *Scalae* wird von der Reissner'schen Membran und der Basilarmembran gebildet.

Der Druck, der durch die Gehörknöchelchenkette auf das ovale Fenster übertragen wird, führt zu einem Druckunterschied zwischen *Scala vestibuli* und *Scala tympani*. Dadurch werden die Membranen und die mit ihnen verbundenen Strukturen wie das Corti'sche Organ ausgelenkt.

Das Corti'sche Organ (Abb. 1.1) des adulten Säugetiers besteht aus Rezeptor- und Stützzellen, wobei zwei verschiedene Rezeptorzelltypen unterschieden werden können: die inneren Haarsinneszellen (IHZ) und die äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ). Am apikalen Ende besitzen beide Rezeptor- bzw. Haarsinneszellen Ausstülpungen, die Stereozilien (Übersicht: Spöndlin, 1994; Raphael und Altschuler, 2003), die für die mechano-elektrische Transduktion verantwortlich sind (Hudspeth und Jacobs, 1979). Die IHZ stehen in einer Reihe, die der knöchernen Achse, dem Modiolus am nächsten steht.

Die ÄHZ sind in drei Reihen angeordnet und über Deiterszellen (Stützzellen) mit der Basilarmembran dort verbunden, wo die größten Basilarmembranschwingungen stattfinden (Nilsen und Rusell, 1999). Über den Zellen erstreckt sich eine azelluläre, gelatinöse Masse, die Tektorialmembran. Diese steht in direktem Kontakt mit den längsten Stereozilien der ÄHZ, die Stereozilien der IHZ stehen dagegen frei (Kimura, 1966; Hoshino, 1974, 1977; Lim, 1972). Zwischen Tektorialmembran und Zellen befindet sich der mit Endolymphe gefüllte subtektoriale Spalt.

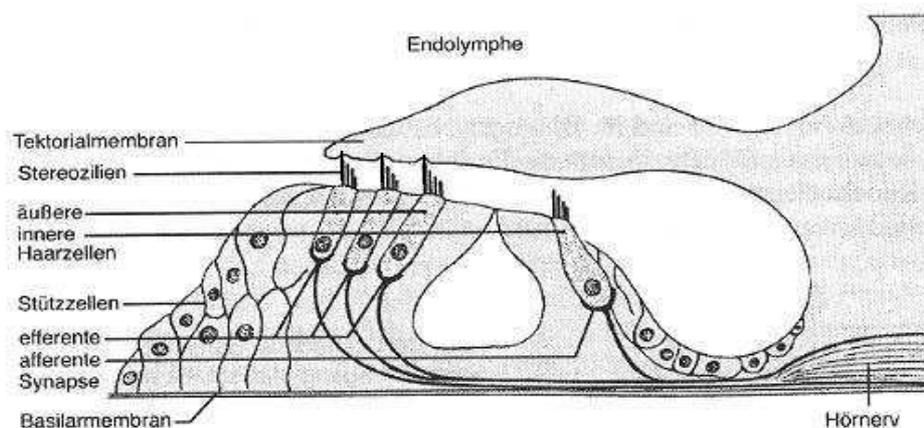


Abb 1.1: Querschnitt durch das Corti'sche Organ. Das Schema zeigt die Anordnung von Sinneszellen, afferenten und efferenten Nervenfasern. Die längsten Stereozilien der äußeren Haarsinneszellen haben Kontakt mit der Tektorialmembran, die der inneren Haarsinneszellen stehen frei. Außerdem ist noch die Basilarmembran (BM) gekennzeichnet. (Naumann, H.H., J. Helms *et al.*: ORL in Klinik und Praxis, Band I Ohr. Thieme Stuttgart 1994)

Die ÄHZ sind zylinderförmig, wobei ihre Länge in Richtung Apex kontinuierlich zunimmt. Basal können sie eine Länge von ca. 11 μm besitzen wohingegen ÄHZ an der Spitze eine Länge von ca. 90 μm aufweisen können (Dannhof, 1991; Preyer *et al.*, 1996). Die ÄHZ verfügen über viele Mitochondrien, einen basal gelegenen Kern und ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum (Lim, 1986). Die wichtigste Besonderheit stellt ihre Fähigkeit zur Zellängenänderung dar. Diese ist elektrisch (Brownell *et al.*, 1985), chemisch in Anwesenheit von ATP und Calcium (Zenner, 1984, 1985) oder durch eine Kaliumintoxikation (Zenner, 1986a) induzierbar. Die elektrisch induzierte Bewegung wird Elektromotilität genannt. Das Ruhemembranpotential

der ÄHZ beträgt -70 mV (Dallos *et al.*, 1982; Russell *et al.*, 1986; Gitter *et al.*, 1986). Nur 5-10% der afferenten Nervenfasern innervieren an den ÄHZ. Sie sind dünn und unmyelinisiert (Spoendlin, 1972; Kiang *et al.*, 1982; Brown, 1987). Desweiteren werden die ÄHZ von myelinisierten efferenten Fasern innerviert (Spoendlin, 1994). Transmitter des efferenten Systems an der basalen Seite der Zellen ist Acetylcholin (Altschuler *et al.*, 1985; Eybalin und Pujol, 1985; Eybalin, 1993).

Die IHZ sind flaschenförmig mit einem zentral gelegenen Kern. Sie sind der eigentliche sensorische Rezeptor, da ihre Funktion hauptsächlich darin besteht, die akustischen Informationen über den Hörnerv zum Gehirn weiterzuleiten. Aus diesem Grund sind sie mit 90-95 % der afferenten Nervenfasern über Synapsen an ihrem basalen Ende verbunden. Eine IHZ wird von bis zu 20 dicken myelinisierten Fasern innerviert (Spoendlin, 1972; Kiang *et al.*, 1982; Brown, 1987) und besitzt ein Ruhemembranpotential von -70 (Kros und Crawford, 1989; Russell *et al.*, 1986). Sie steht außerdem mit efferenten Fasern über dessen Dendriten indirekt in Kontakt, da die efferenten Fasern nicht die Zelle selbst, sondern deren afferenten Nervenendigungen kontaktieren, axodentritischer Kontakt (Smith, 1961; Spoendlin, 1968).

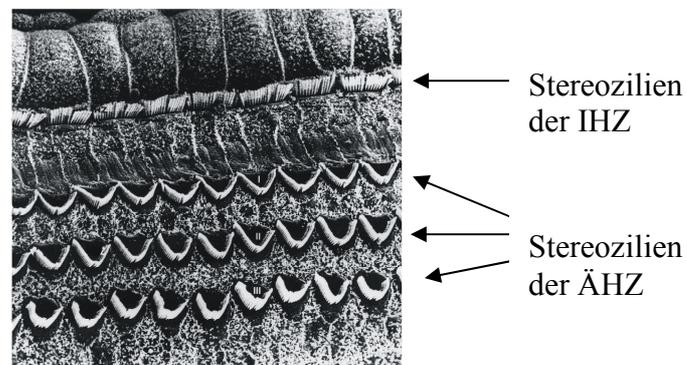


Abb 1.2: Auf der Rasterelektronenaufnahme sind die w-förmig angeordnete Stereozilien der ÄHZ und die linien-förmig angeordneten Stereozilien der IHZ zu sehen. (Reiss *et al.*, 1989. Das stato-akustische Organ. Duphar-Verlag.)

Wie bereits erwähnt verfügen die Haarsinneszelltypen an ihrem apikalen Ende über aktinfilamenthaltigen **Stereozilien** (Flock und Cheung, 1977; Tilney *et al.*, 1980), welche auf dem apikalen Pol der ÄHZ w-förmig bzw. der IHZ linien-förmig angeordnet sind (Lim, 1980) (Abb. 1.2).

Am basalen Ende der Cochlea sind die Stereozilien etwa 1 μm lang, am apikalen Ende dagegen sind sie etwa 6 μm lang (Wright, 1984). Die Stereozilien eines Bündels weisen untereinander verschiedene Verbindungen auf. Diese befinden sich sowohl zwischen den einzelnen Stereozilien derselben Reihe, sog. Side Links (Furness und Hackney, 1985) als auch zwischen Stereozilien verschiedener Reihen, sog. Tip Links (Pickles *et al.*, 1984; Osborne *et al.*, 1984; Furness und Hackney, 1985; Lim, 1986) und gestatten somit eine gleichgerichtete Bewegung im niedrigen Frequenzbereich. Die Tip Links, verlaufen von der Spitze des kürzeren Stereoziliums zum oberen Ende des aus der nächsten Reihe stammenden längeren Stereoziliums (Pickles *et al.*, 1984).

1.1.3. Funktionelle Verbindung der Strukturen des Innenohrs

Die durch die Druckdifferenz zwischen der *Scala vestibuli* und der *Scala tympani* entstandene Auslenkung der Basilarmembran pflanzt sich als Wanderwelle von der Basis der Cochlea in Richtung Apex fort (von Békésy, 1943, 1960). Im Verlauf ihrer Ausbreitung nimmt die Amplitude der Welle bis zum Erreichen eines Maximums zu und fällt anschließend rasch wieder ab. Der Ort des Maximums ist von der Frequenz und der Schallintensität abhängig, die wiederum durch die hydrodynamischen und mikromechanischen Eigenschaften der Cochlea bestimmt sind. Der Ort des Maximums wird als erstes durch eine passive Resonanzeigenschaft bedingt, welche sich aus der unterschiedlichen Steifigkeit der Basilarmembran entlang der Cochlea ergibt. Dabei ist die Basilarmembran am Eingang der Cochlea schmaler und daher steifer als weiter apikal, so dass hohe Frequenzen basal und tiefe Frequenzen in der Nähe des Helikotrema abgebildet werden (Békésy, 1943, 1944, 1947, 1960). Die Basilarmembranauslenkung ist in Abhängigkeit vom Schalldruck nichtlinear für mittlere Schalldrücke (30 – 90 dB SPL) und linear für niedrige (< 30 dB SPL) und hohe Schalldrücke (> 90 dB SPL) (Sellick *et al.*, 1982). Der passive Mechanismus reicht jedoch für die Gewährleistung der nichtlinearen scharfen Frequenzabstimmung dem sog. „Tuning“ (Khanna und Leonard, 1982), welches

auf der Basalmembran, in den Neuronen und den Zellen stattfindet, nicht aus. Einen Beitrag zur Aufklärung über die Entstehung der scharfen Frequenzabstimmung leisteten Sellick und Kollegen (1982). Mit Hilfe der Mössbauer-Methode führten sie Messungen der Basalmembranbewegungen durch und zeigten, dass die Frequenzselektivität auf einem stoffwechselabhängigen Verstärkungsmechanismus beruht. Hierfür verantwortlich ist die Elektromotilität der ÄHZ (Zenner *et al.*, 1985a; Brownell *et al.*, 1985), welche durch die zusätzlich erzeugte Schwingungsenergie eine scharf lokalisierte Verstärkung der Wanderwelle bedingt (Übersicht: Zenner, 1986).

Die Notwendigkeit der ÄHZ für die Frequenzselektivität und hohe Empfindlichkeit wurde unter anderem von Dallos und Harris (1978) und Kiang und Kollegen (1970) bewiesen. Sie zeigten, dass eine Zerstörung der ÄHZ von Katzen mit Kanamycin zum Verlust der hohen Frequenzselektivität führte. Diese selektive Zerstörung der ÄHZ, ohne morphologische Veränderung der IHZ, würde also mit einer Reduzierung der Verstärkung des Signals bzw. des „Tuning“ (Dallos und Harris, 1978; Liberman und Dodds, 1984) und damit mit einem deutlichen Hörverlust einhergehen (Ryan und Dallos, 1975).

Ein weiterer indirekter Beweis für die Existenz eines aktiven mechanischen Mechanismus und die Wichtigkeit der ÄHZ hierfür sind die otoakustischen Emissionen (Kemp, 1978; Probst, 1991; Liberman *et al.*, 2004). Die otoakustischen Emissionen sind Druckwellen im äußeren Gehörgang, die der Cochlea entspringen. Als Nebenprodukt der elektromechanischen Bewegung der ÄHZ wird eine Wanderwelle erzeugt, die retrograd zum cochleären Eingang läuft und über das Mittelohr zum äußeren Gehörgang geleitet wird. Man unterscheidet dabei zwischen spontanen und evozierten Emissionen, d. h. zwischen Emissionen, die spontan in der Cochlea ohne exogenen Stimulus entstehen und Emissionen, die durch einen Schallstimulus erzeugt werden. Die evozierten Emissionen lassen sich abhängig vom Frequenzinhalt des Reizes in verschiedene Untergruppen unterteilen. Eine davon sind die Distorstionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE), die erzeugt werden, wenn mit zwei Tönen stimuliert wird. Von den DPOAEs wird aufgrund

verschiedener Experimente, wie zum Beispiel die Modulation der DPOAEs durch einen Tiefton angenommen, dass sie auf den nichtlinearen Verstärkungsmechanismus der Cochlea, oder genau genommen auf das nichtlineare Verhältnis zwischen Rezeptorstrom und Stereozilienauslenkung zurückzuführen sind (Frank und Kössl, 1996, 1997).

1.1.4. Der Transduktions- und Verstärkungsmechanismus

Durch die in Schwingung versetzte cochleäre Trennwand entstehen aufgrund unterschiedlicher Drehpunkte von Basilar- und Tektorialmembran radiale Bewegungen zwischen der Tektorialmembran und Retikularlamina, die eine unterschiedliche Größe besitzen. Dadurch kommt es zu einer sog. Scherbewegung zwischen beiden Strukturen (ter Kuile, 1900; Davis, 1958; von Békésy, 1960). Da die Tektorialmembran mit den längsten Stereozilien der ÄHZ direkt in Kontakt steht, kommt es zu einer Abscherung dieser Stereozilien. Wenn die Deflektion in die positive Richtung, bzw. in Richtung des größten Stereoziliums erfolgt, kommt es zu einer mechanischen Spannung der Tip Links. Bis vor kurzem wurde noch ein direkter Einfluss der Tip Links auf die Öffnungswahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle angenommen (Assad *et al.*, 1991; Denk *et al.*, 1995; Lumpkin und Huspeth, 1995; Preyer *et al.*, 1995). Zum heutigen Zeitpunkt erscheint die direkte Steuerung der Transduktionskanäle durch die Tip Links jedoch als unwahrscheinlich (Meyer *et al.*, 1998, 2005), wobei deren genaue Rolle beim Transduktionsmechanismus noch ungeklärt ist.

Die positive Deflektion wirkt als erregender Stimulus (Abb. 1.3) und hat eine Öffnung von Transduktionskanälen und damit eine Depolarisation der Zelle zur Folge (Hudspeth und Corey, 1977; Hudspeth, 1982; Russell *et al.*, 1986; Corey und Hudspeth, 1983a; Russell *et al.*, 1986; Denk *et al.*, 1995; Lumpkin und Hudspeth, 1995). Würde die Deflektion der Stereozilien in die entgegengesetzte Richtung erfolgen, käme es zur Schließung der Kanäle und infolgedessen zur Hyperpolarisation der Zelle (Hudspeth und Corey, 1977; Russell *et al.*, 1986) (Abb.1.3).

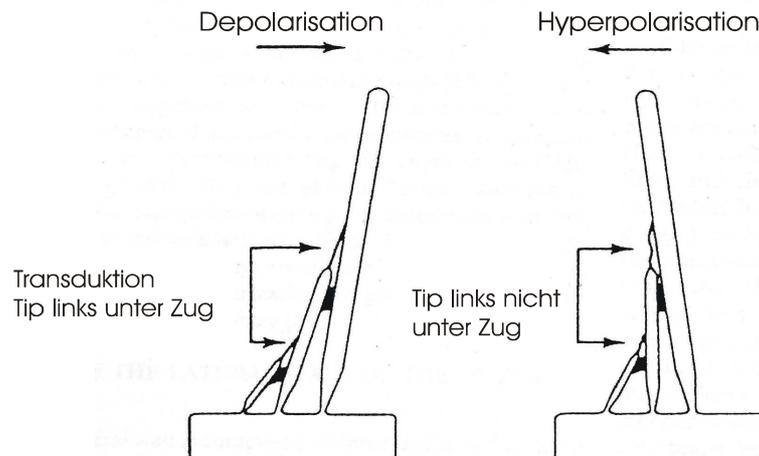


Abb.1.3: Jedes Stereozilienbündel besteht aus Stereozilien mit unterschiedlicher Länge, wobei Stereozilien gleicher Länge in einer Reihe angeordnet sind. Die unterschiedlich langen Stereozilien sind durch Tip Links miteinander verbunden. Die Deflektion in Richtung des längsten Stereoziliums führt zur Kanalöffnung und somit zur Depolarisation (modifiziert aus Lim, 1991).

Die Öffnung der Kanäle ermöglicht einen Einstrom von Ionen, wobei es sich hauptsächlich um Kalium- aber auch Calciumionen handelt (Corey und Hudspeth, 1979b; Ohmori, 1985). Treibende Kraft für den Einstrom ist die Potentialdifferenz (Elektrisches Potential) zwischen dem intrazellulären Raum der Sinneszelle und der Endolymphe. Durch diesen Vorgang wird das mechanische Signal (Deflektion) in ein bioelektrisches Signal (Rezeptorstrom) umgewandelt (Mechanoelektrische Transduktion). Die durch diese mechanoelektrische Transduktion verursachte Veränderung des Transmembranpotentials ermöglicht z. B. eine Längenänderung der ÄHZ. Die Längenänderung wird durch das Motorprotein Prestin (Zheng *et al.*, 2000) geregelt, das sich in der lateralen Zellmembran befindet (Belyantseva *et al.*, 2000). Eine Verkürzung des Zellkörpers erfolgt bei Depolarisation, eine Verlängerung bei Hyperpolarisation (Ashmore, 1987; Brownell *et al.*, 1984; Kachar *et al.*, 1986; Santos-Sacchi, 1989).

Da die Längenänderung der ÄHZ auf einer Ionenverlagerung beruht, kann die ÄHZ auch hohen Frequenzen bis zu 100 kHz folgen (Frank *et al.*, 1999). Durch die dabei entstehende mechanische Kraft kann die Wanderwelle an einem eng umschriebenen Ort (Nilsen und Russell, 2000) bis zu tausendfach verstärkt

werden (Sellick *et al.*, 1982; Nilsen und Russell, 2000). Hieraus resultiert eine Zunahme der relativen radialen Bewegung zwischen Tektorialmembran und Retikular lamina, die dann wiederum eine Abscherung und damit Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Stereozilien der IHZ mit sich bringt (Russell und Kössl, 1992; Übersicht: Raphael und Altschuler, 2003). Die auf dieselbe Weise wie bei den ÄHZ hervorgerufene Potentialänderung beruht auf einem Kaliumeinstrom und bewirkt eine Transmitterfreisetzung (Glutamat) am basalen Pol der IHZ (Klinke, 1986; Ottersen *et al.*, 1998). Der Transmitter bindet auf der postsynaptischen Seite an AMPA-Rezeptoren der afferenten Nervenzellmembran (Ruel *et al.*, 1999; Puel *et al.*, 2002) und löst ein Aktionspotential aus, welches dann über den Hörnerv zum Gehirn weitergeleitet wird.

Die Weitergabe der Informationen, die der Schallreiz enthält erfolgt also ausschließlich durch die IHZ.

1.2. Calcium – ein Kation mit großem Einfluss

Der Ionenstrom, der während der Abscherung der Stereozilien durch die Transduktionskanäle fließt, besteht hauptsächlich aus Kaliumionen. Dies beruht vor allem auf der kaliumreichen Endolymphe und dem damit verbundenen elektrischen Gradienten zwischen dem Intrazellulärraum und dem Endolymphraum beruht (Pickles und Corey, 1992). Da die Transduktionskanäle jedoch nicht Ionenspezifisch sind, können auch andere Kationen wie zum Beispiel Calciumionen durch die Kanäle einströmen (Corey und Hudspeth, 1979b; Ohmori, 1985).

1.2.1. Die Regulation und Funktion des freien intrazellulären Calciums der äußeren Haarsinneszellen

Viele Transduktionsvorgänge und Signalübertragungen zwischen den Zellen werden durch die Konzentration von freien Calciumionen geregelt, weshalb eine genaue Kontrolle der intrazellulären Calciumkonzentration notwendig ist. Der größte Anteil des Calciums liegt in gebundener Form vor. Die Konzentration des ungebundenen Calciums in den ÄHZ des Meerschweinchens beträgt nur 80 - 200 nM (Ashmore und Ohmori, 1990; Dulon *et al.*, 1990; Ikeda *et al.*, 1992b). Dafür verantwortlich sind calciumspeichernde Organellen und calciumbindende Proteine. Letztere haben Einfluss auf die Pufferung von Calcium, den Transport und die Aktivität der Enzyme, da sie aufgrund einer unterschiedlichen Affinität zu Calcium durch verschiedene Calciumkonzentrationen aktiviert werden. Um das zu gewährleisten, muss die Ruhekonzentration auf einem niedrigen Niveau gehalten werden, damit die Signalfunktion der Änderung effektiv bleibt. Auch fixe und mobile Puffer begrenzen die räumliche und zeitliche Diffusion der Calciumionen (Lumpkin und Hudspeth, 1998).

Die **Regulation der Calciumkonzentration** wird von verschiedenen Mechanismen getragen. Von großer Bedeutung sind hierfür Calcium-Pumpen (Calcium-ATPasen) in der Plasmamembran sowie in den Stereozilien der ÄHZ, die Calcium aus der Zelle pumpen (Maurer *et al.*, 1992; Crouch und Schulte, 1995; Yamoah *et al.*, 1998).

Ebenfalls Einfluss auf die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration hat ATP, welches über P2X-Rezeptoren die cytoplasmatische Calciumkonzentration erhöhen kann (Housley *et al.*, 1992; Mockett *et al.*, 1994). Zum Transport von Calcium aus der Zelle tragen außerdem Ionenaustauschmechanismen bei, welche drei Natriummoleküle gegen ein Calciummolekül austauschen (Maurer *et al.*, 1992).

Desweiteren existieren in den Stereozilien noch so genannte fixe Puffer bestehend aus Aktin (de Rossier *et al.*, 1980), und mobile Puffer bestehend aus Parvalbumin β (Sakaguchi *et al.*, 1997). Da sie unterschiedlich im Stereozilienbündel und dem Zellkörper verteilt sind (Slepecky und Ulfendahl, 1993; Sakaguchi *et al.*, 1997), beschränken sie sowohl die räumliche

Ausbreitung von Calciumionen, die während der mechanoelektrischen Transduktion einströmen (Lumpkin und Hudspeth, 1998), als auch Calciumionen, die durch spannungsabhängige Kanäle an der präsynaptisch aktiven Region von Haarsinneszellen eintreten (Roberts, 1993, 1994).

Eine der wohl wichtigsten **Funktionen von Calcium** ist die Regulierung des Adaptationsprozesses. Unter Adaptation der Sensitivität der Stereozilien versteht man die Fähigkeit, dass die Zelle auch dann noch mit uneingeschränkter Empfindlichkeit reagieren kann, wenn die Stereozilien einer ständigen Abscherung unterliegen. Für die Erklärung des Regulationsmechanismus existieren zwei Modelle. Die Deflektion in positiver Richtung verursacht eine Öffnung der Kanäle. Gleichzeitig kommt es zu einer mechanischen Relaxation (verminderte Steifigkeit des Stereozilienbündels), welche denselben Zeitverlauf wie der Adaptationsvorgang hatte (Howard und Hudspeth, 1987). Diese könnte durch eine Veränderung der Position der oberen Anheftungspunkte der Tip Links in Richtung Zellkörper zustande kommen. Dadurch würde sich die Spannung der Tip Links vermindern, wodurch auf bisher nicht geklärte Weise die Schließung der Kanäle gefördert wird. Bei Deflektion in negativer Richtung werden die Anheftungsstellen in entgegengesetzter Richtung verschoben.

Diese Verschiebung wird durch einen sich in der Nähe der Tip Links befindenden (Garcia *et al.*, 1998) molekularen Motor gewährleistet, der aus Myosin Ic (früher I-beta) Molekülen besteht (Gillespie *et al.*, 1993; Hasson *et al.*, 1997) und dessen Aktivität durch den Calciumeinstrom beeinflusst wird (langsame Adaptation). Verschiedene Experimente untermauern den Einfluss von Calcium beim Adaptationsvorgang: eine Abnahme der extrazellulären Calciumkonzentration während des Transduktionvorgangs führte zu einem verringerten Calciumeinstrom und damit zu einer Verlangsamung der Adaptationsgeschwindigkeit (Eatock *et al.*, 1987; Hacohen, *et al.*, 1989; Holt *et al.*, 1997). Den gleichen Effekt verursachte eine Zunahme von Calciumpuffern innerhalb der Zelle, die das eintretende Calcium schnell banden (Crawford *et al.*, 1989; Ricci und Fettiplace, 1997). Hier wird jedoch von einem zweiten Model bezüglich der Adaptation ausgegangen: das einströmende Calcium kann

den Adaptionsvorgang außer durch den Myosin-Motor auch durch direkte Interaktion mit den Transduktionskanälen beeinflussen (schnelle Adaptation) (Crawford *et al.*, 1989; Ricci *et al.*, 1998). Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch z. B. eine erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentration oder durch niedrige Calciumpufferkonzentrationen innerhalb der Zelle hatte eine Beschleunigung des Adaptionsvorganges mit der Zeitkonstante von 0,3 ms zur Folge (Ricci und Fettiplace, 1997). Dies wäre zu schnell, als dass es durch das calciumabhängige Motor-Model erklärt werden könnte. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass beide Modelle nebeneinander existieren (Wu *et al.*, 1999).

Weitere calciumabhängige Mechanismen sind die Endozytosevorgänge an der apikalen Seite der ÄHZ (Meyer *et al.*, 2001). Griesinger und Kollegen (2004) demonstrierten die Calciumabhängigkeit der apikalen Endozytoseprozesse anhand von Experimenten mit dem Protein-Endozytose-Marker „Wheat-germ agglutinin-fluorescein isothiocyanate (WGA-FITC) und dem Farbstoff FM 1-43. Eine Verminderung der extrazellulären Calciumkonzentration (5 μM) bei gleichzeitiger Applikation von FM 1-43 oder WGA-FITC resultierte in einer starken Reduktion der Endozytoserate. Nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration (1 mM) stieg die Endozytoserate wieder rasch an. Der Mechanismus, der diesem Vorgang zugrunde liegt, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Allerdings hat das durch die Transduktionskanäle eintretende Calcium keinen Einfluss auf diesen Endozytosevorgang (Griesinger *et al.*, 2004).

1.3. Lokalisation der Transduktionskanäle

Auf dem Weg zur Aufklärung des Transduktionsmechanismus ist die Untersuchung der Lokalisation der Transduktionskanäle ein wichtiger Schritt. Hierfür war unter anderem die Nichtselektivität der Transduktionskanäle gegenüber Anionen von Nutzen, die den Eintritt von Calciumionen möglich machte (Corey und Hudspeth, 1979b; Ohmori, 1985), wobei dessen Eintritt mit

Hilfe eines Farbstoffindikators sichtbar gemacht werden konnte (Lumpkin und Hudspeth, 1995).

Schon viele Jahre zuvor vermuteten Pickles und Kollegen (1984), dass die Tip Links einen direkten Einfluss auf die Kanäle haben und deshalb mehr oder weniger direkt mit diesen in Verbindung stehen müssten. Unterstützt wurde die Hypothese durch die Tatsache, dass sich die Kanäle mit einer Zeitverzögerung von weniger als 40 μ sec nach Stimulation öffnen, was viel zu schnell für ein involviertes second messenger abhängiges System wäre (Corey und Hudspeth, 1979a). Weitere Experimente zeigten, dass bei einer Blockade der Transduktionskanäle mit Aminoglykosidantibiotika die schnellste und vollständigste Blockade erreicht wurde, wenn das Aminoglykosid (Gentamicin) an den Spitzen der Stereozilien appliziert wurde (Jaramillo und Hudspeth, 1991). Außerdem verursachten Experimente mit Calcium-Green angefärbten Zellen Signale, die nach Stimulation zuerst in der Spitze der Stereozilien zu sehen waren und sich dann in Richtung Basis ausbreiteten. Dabei konnte sowohl im längsten als auch im kürzesten Stereozilium ein solches Signal nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führten deshalb zu dem Schluss, dass sich die Kanäle in der Nähe der Spitze des Stereoziliums befinden müssen und dass sie an beiden Seiten der Tip Links vorkommen (Denk *et al.*, 1995). Bestätigt wurden diese Vermutungen durch Lumpkin und Hudspeth (1995), die mit fluo-3 gefärbten Zellen ähnliche Ergebnisse erhielten.

Es erschien jedoch als unwahrscheinlich, dass sich alle Transduktionskanäle in Spitzennähe befinden, da nach der Stimulation von Haarsinneszellen (HZ) des Ochsenfrosches eine Ausbreitung des Signals nicht nur in Richtung Basis, sondern auch in Richtung Spitze zu sehen war. Für Wahrscheinlich wird eine Lokalisation innerhalb 2-3 μ m von der Spitze entfernt gehalten (Hudspeth, 1982; Denk *et al.*, 1995; Lumpkin und Hudspeth, 1995). Die geschätzte Anzahl der Kanäle beträgt 1-5 pro Stereozilium (Howard *et al.*, 1988a).

Allerdings waren Fluoreszenzsignale nicht ausschließlich nach Stimulation, sondern auch in Ruhe als so genannte „Tip blush“, an der Spitze der Stereozilienbündel zu erkennen. Sie werden durch Calciumeintritt durch in Ruhe offen stehende Kanäle verursacht und verschwinden, wenn das

Stereozilienbündel in die negative Richtung abgeschert wird (Lumpkin und Hudspeth, 1995).

Letztendlich ist neben der Lokalisation der Kanäle die tatsächliche Interaktion zwischen den Tip Links und den Transduktionskanälen bisher nicht vollständig aufgeklärt. Obwohl die Tip Links ein essentieller Bestandteil des Transduktionsapparates sind (Preyer *et al.*, 1995), muss davon ausgegangen werden, dass sie die Kanäle nicht direkt steuern, bzw. keinen direkten Einfluss auf die Kanäle haben. Zu diesem Schluss kamen Meyer und Kollegen (1998, 2005) nachdem sie die Tip Links durch eine Behandlung mit 5 mM BAPTA, einem Calcium Chelator, zerstört hatten und anders als erwartet einen gleichmäßigen Rezeptorstrom maßen, dessen Amplitude dieselbe Größe zeigte wie der Rezeptorstrom einer intakten ÄHZ. Die Kanäle waren folglich dauerhaft geöffnet, was sowohl die Behandlung mit DHSM, welches die Kanäle blockiert, als auch die Deflektion in negativer Richtung bewies, da infolgedessen eine starke Reduktion des Rezeptorstroms gemessen werden konnte.

1.4. Calciumindikatoren

Wie bereits erwähnt, kann der Eintritt der Calciumionen durch die Transduktionskanäle mit Hilfe von Farbstoffindikatoren sichtbar gemacht werden. Calciumindikatorfarbstoffe führen nach der Bindung an freie Calciumionen zu einer Steigerung der Fluoreszenzemissionsintensität, weshalb sie zur Registrierung von Änderungen der intrazellulären freien Calciumkonzentration eingesetzt werden. Durch die Bindung der freien Calciumionen können sie als Puffer wirken und daher Einfluss auf das intrazelluläre Calciumgleichgewicht nehmen. Das zelluläre Calciumsignal weist eine geringere Amplitude, und eine langsamere Kinetik auf als unter physiologischen Bedingungen. Der Einfluss ist jedoch von der relativen Farbstoffkonzentration in Bezug zur Konzentration endogener Calciumpuffer abhängig.

Desweiteren unterscheidet man Indikatoren mit hoher und niedriger Affinität gegenüber Calcium. Der Sättigungsgrad von Indikatoren mit hoher Affinität ist stark von der Konzentration des Indikators abhängig. Generell erfolgt eine schnelle Sättigung, wodurch geringe Änderungen gut detektierbar sind.

Indikatoren mit niedriger Affinität hingegen sind gut für Zeitverlaufsmessungen wie zum Beispiel die Messung des Calciumeinstroms geeignet. Je höher die Bindungskonstante, desto niedriger die Affinität.

Die Bindung von Calcium an den Indikator führt zur Ausstrahlung eines Fluoreszenzsignals.

1.5. Fluoreszenzentstehung

Als Fluoreszenz wird die Absorption von Licht mit einer bestimmten Wellenlänge durch verschiedene Moleküle sowie die nahezu gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge bezeichnet. Die Fluoreszenz beginnt mit der Anregung durch eine Lichtquelle.

Der genaue Vorgang lässt sich in drei Schritte unterteilen (Abb. 1.4):

- Stadium 1):
Ein Photon, das aus einer externen Quelle stammt (Laser), wird durch ein Elektron von einem Molekül absorbiert. Dabei wird das Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Dieser Vorgang findet innerhalb von 10 fs statt.
- Stadium 2):
Die Elektronen verweilen ca. 10 ns im angeregten Zustand. Ein Teil der Energie geht durch den Wechsel zwischen den Energiezuständen innerhalb einer Elektronenschale, sowohl innerhalb des angeregten Zustandes oder als auch innerhalb des Grundzustandes, für die Fluoreszenz verloren (Stokes shift).

-
- Stadium 3):
Anschließend fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und setzen dabei die im ersten Stadium aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenzlicht frei. Aufgrund des Verlustes in Stadium 2, ist das emittierte Licht energieärmer und besitzt daher eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht (Abb. 1.4).

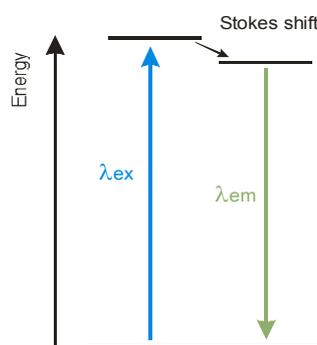


Abb. 1.4: Jablonski Diagramm: Durch die Bestrahlung eines Fluorochroms mit Licht der Wellenlänge λ_{ex} werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Hier verweilen sie sehr kurz, verlieren dabei ein wenig Energie (Stokes-Shift) und fallen dann unter Aussendung von längerwelligen Emissionslicht, d.h. Emissionswellenlänge (λ_{em}) größer als die Anregungswellenlänge (λ_{ex}), auf das ursprüngliche Niveau zurück.

Das Fluoreszenzemissionsspektrum ist unabhängig von der Anregungswellenlänge, aber die Emissionsintensität ist proportional zur Amplitude des Anregungsspektrums der Anregungswellenlänge (Abb. 1.5).

Ein einziges Fluorochrom kann viele tausend detektierbare Photonen erzeugen. Die Fluoreszenzemission eines Farbstoffs hängt von der Effizienz ab, mit der er absorbiert und Photonen emittiert und von seiner Fähigkeit diesen Kreislauf immer wieder durchlaufen zu können.

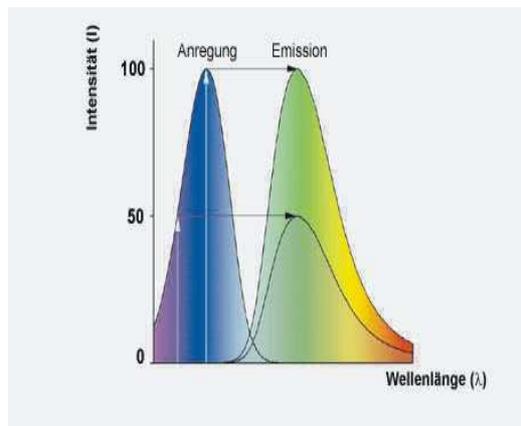


Abb. 1.5 : Schematische Darstellung der Anregungseffizienz in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Ein Fluoreszenzmolekül kann innerhalb seines Anregungs-spektrums mit unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt werden und sendet daraufhin Licht über ein charakteristisches Emissionsspektrum aus. Dessen Höhe wird bestimmt von der Strahlungsintensität und Anregungseffizienz, die von der Wellenlänge des Anregungslichtes abhängt. (<http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/allBySubject/A6D6EAF501C6DEC1256C7D00456DB3#>, 10.12.2004).

1.6. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Der große Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie besteht darin, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln.

Das eigentliche Prinzip der **1-Photonen Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie** (LSM) (Abb. 1.6) ist die punktförmige Beleuchtung und Beobachtung sowie die Bildung dünner optische Schnitte (Tiefendiskriminierung) und die Streulichtunterdrückung (Kontrasterhöhung).

Das Präparat wird Punkt für Punkt und Zeile für Zeile mit dem fokussierten Lichtstrahl abgetastet. Dadurch entstehen die Bilder für die verschiedenen Objektorte nicht gleichzeitig, sondern seriell. Die physikalische Wechselwirkung, die das Laserlicht in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorruft (Fluoreszenz) wird ebenfalls punkt- bzw. pixelweise über einen Sekundärelektronenvervielfacher detektiert. Vor diesem Detektor ist in der Zwischenbildebene eine variable Lochblende (Pinhole) angebracht, die ein Passieren von Fluoreszenzsignalen, welche von außerhalb der Fokusebene

kommen, verhindert. Anschließend erfolgt die Digitalisierung der nach dem Photomultiplier (PMT) als elektrisches Signal vorliegenden Objektinformation.

Da der beugungsbegrenzte fokussierte Lichtstrahl einer punktförmigen Beleuchtung des Objekts entspricht und außerdem Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden (konjugierte Ebenen) spricht man von einem konfokalen Strahlengang. Durch den variablen Durchmesser der Lochblende, der das Ausmaß bestimmt, inwieweit Licht von außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird, ist es möglich die Konfokalität zu verändern.

Ist die Blende voll geöffnet, wird das gesamte Licht detektiert und entspricht damit einer nicht konfokalen Abbildung.

Aus einer dicken Probe kann so nur eine dünne Schicht abgebildet werden, da ausschließlich aus der fokussierten Ebene emittiertes Licht gesammelt werden kann. Durch schrittweise kontrollierte Verschiebung der Fokusebene entstehen viele optische Schnitte, die zu einer dreidimensionalen Struktur zusammengesetzt werden können.

Außerdem ermöglicht die Erstellung von Bildserien die Aufzeichnung von dynamischen Veränderungen im Millisekundenbereich und damit eine quantitative Erfassung in Form von Zeitserien.

Eine entscheidende Rolle in Bezug auf Auflösung und Tiefendiskriminierung spielt die Lochblende. Je kleiner der Durchmesser der Blende, desto besser die Tiefendiskriminierung, die Auflösung und die Streulichtunterdrückung, was in einer Kontraststeigerung resultiert. Allerdings vermindert es auch die Signalintensität (Energieverlust). Desweiteren wird die Auflösung noch von der Anzahl der Abtastungspunkte pro aufzulösende Struktur beeinflusst.

Solange nur ein Punkt fokussiert wird, nimmt die Intensität mit zunehmender Defokussierung ab. Wenn hingegen die gesamte Fläche einer Fokusebene angetastet wird, erhält jeder Punkt in defokussierten Ebenen genauso viel Energie wie ein Punkt in der Fokusebene. Stellt man sich nun das Objekt in einzelne Schnitte unterteilt vor, erzeugt jeder Schnitt die gleiche Menge an Fluoreszenz, unabhängig von der Lokalisation in Bezug zur Fokusebene. Jedoch trägt nur ein kleiner Bruchteil der erzeugten Fluoreszenz, nämlich der welcher dem Fokusvolumen angehört, zur Bildentstehung bei.

Der punktförmig scannende Bildaufbau bedingt zwar eine kurze Belichtungszeit pro Pixel, aber um die Gesamtzeit zur Aufnahme eines Bildes mit ausreichendem Fluoreszenzsignal gering zu halten, muss die Anregungsintensität erheblich erhöht werden, was das Ausbleichen des Fluorochroms zu Folge hat. Hinzu kommt, dass sich toxische Spaltprodukte aus dem Fluorochroms bilden können und die lebenden Zellen durch die hohe Lichtintensität schädigen.

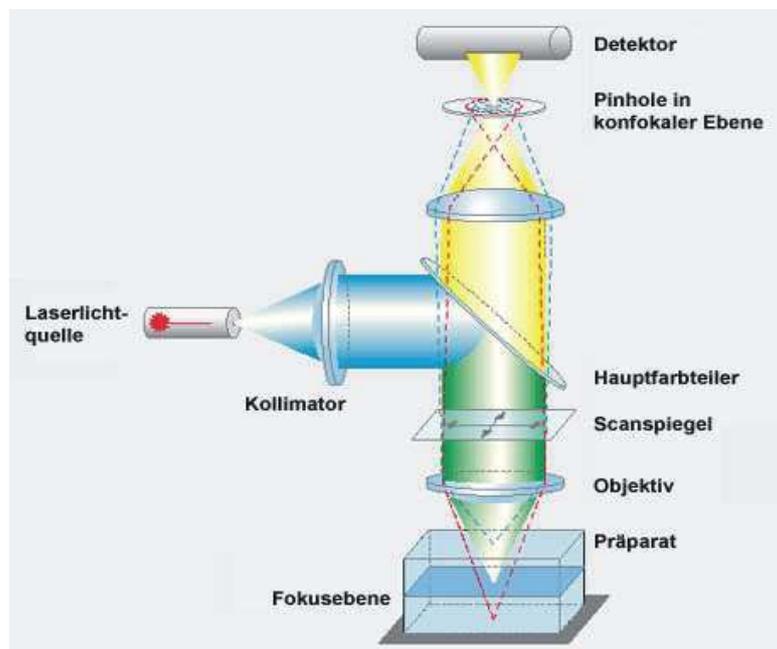


Abb. 1.6: Aufbau eines konfokal arbeitenden LSM. Der Fluoreszenzstrahlengang ist über eine Kombination von Hauptfarbteiler (HFT), Nebenfärteiler (NFT) und Emissionsfilter definierbar, wobei der HFT der Trennung von Anregung und Emission, der NFT der spektralen Aufspaltung verschiedener Fluoreszenzemissionen dient. Der Scanner ist eine Abtasteinheit, der den fokussierten Laserstrahl linienweise über das Objekt bewegt. Die Scangeschwindigkeit legt die Aufnahmezeit und Zeit pro Pixel (Pixelzeit) fest in der Photonen gesammelt werden; je länger die Pixelzeit, desto mehr Photonen/Pixel, desto geringer das Rauschen im Bild. Der Detektor detektiert pixelweise die vom Probenort emittierten Photonen. Vor dem Detektor befindet sich die Lochblende (Pinhole), die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, und dafür sorgt, dass sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst werden kann. Der Durchmesser der Blende bestimmt dabei die Dicke des optischen Schnitts. (<http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/allBySubject/A6D6EAF501C6DEC1256C7D00456DB3#>, 10.12.2004).

1.7. Aufgabenstellung

Den existierenden Daten über die Stereozilienbündel der ÄHZ zufolge, wurde mehrmals versucht, die Transduktionskanäle genauer zu lokalisieren. Denk und Kollegen (1995) sowie Lumpkin und Hudspeth (1995) bedienten sich dabei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. Dennoch ist es trotz aller Bemühungen bis jetzt nicht gelungen, die exakte Position der Kanäle herauszufinden. Da diese Versuche jedoch nicht an Säugetieren durchgeführt wurden (Lumpkin und Hudspeth (1995) sowie Denk und Kollegen (1995) verwendeten die HZ des Ochsenfrosches, Ohmori (1988) untersuchte die HZ von Hühnern) und es bis heute nur wenig Daten über die Calciumhomöostase in Stereozilien von Säugetieren gibt, ist das Ziel meiner hier vorgestellten Arbeit durch die Messung von calciumabhängigen Fluoreszenzsignale im positiv deflektierten Stereozilienbündel von isolierten ÄHZ des Meerschweinchens (*Cavia procellus*) bei offenen und geschlossenen Transduktionskanälen den Entstehungsort dieser Signale zu identifizieren und so weitere Hinweise bezüglich der Lokalisation der Transduktionskanäle zu erhalten.

In den folgenden Experimenten wird mit Hilfe des Calciumindikators fluo-3 die intrazelluläre Calciumkonzentrationsänderung bzw. die dadurch hervorgerufene Fluoreszenzintensitätsänderung während der positiven Deflektion der Stereozilien registriert. Dieser Versuch wird einmal ohne Einwirkung von DHSM (Dihydrostreptomycin), welches offene Transduktionskanäle blockiert, und einmal unter DHSM-Einwirkung durchgeführt. Um die Reversibilität zu testen, wird der Vorgang anschließend nach Beendigung der DHSM-Wirkung noch einmal durchgeführt. Die Fluoreszenzsignalintensitätsänderung wird dabei mit dem konfokal arbeitenden Laser-Scanning-Mikroskop aufgezeichnet und die daraus resultierenden Signalintensitätskurven, bzw. deren Steigungen miteinander verglichen. Schließlich werden die Unterschiede der Steigungen auf Signifikanz geprüft.

2. Methoden und Material

Alle Versuche wurden im Forschungslabor der Sektion Physiologische Akustik und Kommunikation, der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und die Geräte sowie der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung vorgestellt.

2.1. Tiere

Die hier dargestellten Experimente wurden mit ÄHZ von sechs Meerschweinchen durchgeführt. Die ersten drei Meerschweinchen waren Albinomeerschweinchen, wohingegen die restlichen drei pigmentiert waren. Die Meerschweinchen stammten von der Firma Charles River oder aus der Zucht der HNO-Klinik Tübingen. Es wurden ausschließlich adulte gesunde Meerschweinchen mit einem Gewicht von 200 - 400 g verwendet, bei denen der Preyer-Reflex positiv getestet worden war. Alle Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, erfüllten die Anforderungen des „Deutschen Tierschutzgesetzes“.

2.2. Vorbereitung der physiologischen Lösungen

Insgesamt wurden vier verschiedene Lösungen hergestellt. Eine 1 mM Calcium Stock Solution, eine Hanks' balanced Salt Solution (HBSS) mit niedriger und mit normaler Calciumkonzentration, sowie eine HBSS mit hoher Calciumkonzentration

- Zuerst wurde die 1 mM Calcium Stock Solution erstellt, indem CaCl_2 in destilliertem Wasser aufgelöst wurden.

Anschließend wurden zwei verschiedene HBSS (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) vorbereitet. Die Osmolarität wurde mit Glucose auf 300-310 mosmol, der pH-Wert mit NaOH und HCl auf 7,2 - 7,4 eingestellt.

- HBSS mit normaler Calciumkonzentration (in mM: CaCl_2 1,25; KCL 5,4; KH_2PO_4 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,81; NaCl 137; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,34). Hinzugefügt wurde der Puffer HEPES (10 mM).
- HBSS mit niedriger Calciumkonzentration (in mM: KCl 5,4; KH_2PO_4 0,35; NaCl 137; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,34). Hinzugefügt wurde HEPES (10 mM), MgSO_4 , CaCl_2 . Die Konzentrationen in HBSS betragen in mM: HEPES 10; MgSO_4 1,81; CaCl_2 0,1.

Alle Lösungen wurden bei 8 °C gelagert.

- Aufgrund der sehr geringen benötigten Menge, wurde die HBSS mit hoher Calciumkonzentration erst kurz vor dem Experimentbeginn erstellt. Dafür wurde ein Teil der HBSS mit niedriger Calciumkonzentration verwendet und dessen Calciumkonzentration auf 4 mM erhöht.

Bei Beginn der Experimente betrug die Temperatur der Lösungen 21 - 23 °C.

2.3. Allgemeine Vorbereitung

Die Deckgläser (Durchmesser 20 mm; Assistent, Sondheim, Deutschland), auf denen sich die isolierten ÄHZ später befanden, wurden zuerst 15 min in Aceton gebadet, was der Reinigung diente, und nach einem kurzen Wasserbad von 15 min in Poly-L-Lysin (0,1%; Sigma, Deutschland) für weitere 10 min gelagert. Anschließend wurden sie mit Wasser abgespült und getrocknet. Durch diese Vorbehandlung erreichte man eine bessere Haftung der ÄHZ auf dem Deckglas.

2.4. Zellpräparation

Nach der cervicalen Dislokation des Meerschweinchens, wurde die vollständige Ohrkapsel (Bulla) zügig entnommen und in eisgekühlter HBSS mit normaler Calciumkonzentration bis zur weiteren Präparation überführt.

Die nachfolgenden Präparationsschritte fanden ebenfalls in HBSS mit normaler Calciumkonzentration statt und begannen ca. 20 min nach der Organentnahme. Zuerst eröffnete man die Bulla mit einer Knochenzange, um einen Zugang zur Cochlea zu erhalten. Das so präparierte Gewebe wurde mit frischer HBSS mit normaler Calciumkonzentration bedeckt. Anschließend wurde mit Hilfe eines dreiseitigen Dentalinstruments unter Verwendung des Präparationsmikroskops die knöcherne Wand der Cochlea (Lyca, Schweiz) am apikalen Teil, am Helikotrema eröffnet und danach komplett abgelöst. Die Cochlea bzw. die freigelegten Windungen des Modiolus mit dem Corti'schen Organ löste man mit einem Skalpell vollständig heraus.

Nach der vorsichtigen Ablösung der *Stria vascularis*, isolierte man vorsichtig das Corti'sche Organ mit einem feinen Wolframdraht von der Basilarmembran aller viereinhalb Windungen, hauptsächlich aber der oberen Hälfte und pipettierte es anschließend mittels einer 10 µl Pipette (Eppendorf, Deutschland) auf das Poly-L-Lysin beschichtete Deckglas, auf welchem sich bereits ca. 150 µl HBSS mit niedriger Calciumkonzentration befand. Durch zweimaliges Aufsaugen und Ablassen der HBSS mit der 100 µl Pipette wurde die endgültige Dissoziation der ÄHZ voneinander erreicht. Nach einer Wartezeit von 10 min hatten sich die Zellen auf dem Deckglas abgesetzt. Für die Versuche wurden jeweils Zellen der Länge 65 - 85 µm von einem Ohr verwendet, die aus der apikalen Hälfte der Cochlea stammten.

2.5. Calciumindikatorfarbstoff

In den Versuchen wurde der Calciumindikatorfarbstoff fluo-3 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zur Erzeugung eines Calcium gebundenen Signals

verwendet, welcher als hydrophober ungeladener Acetoxymethyl-Ester (AM-Ester) die Zellmembran passieren kann. Der AM-Rest wird intrazellulär durch Esterasen abgespalten, womit verhindert wird, dass der Indikator die Zelle wieder verlassen kann. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs liegt in einem Bereich von ca. 480 – 530 nm, das Emissionsmaximum bei ca. 525 nm weist eine grüne Farbe auf (Abb. 2.1). Der Farbstoff lässt sich mit dem Argonlaser (488 nm) anregen, wobei eine Bindung mit Ca^{2+} eine vielfache Intensitätssteigerung des emittierten Lichts (Abb. 2.2) bewirkt. In ungebundener sowie in der AM-Form ist fluo-3 im Wesentlichen nicht fluoreszent.

Der in dieser Arbeit verwendete Calciumindikator fluo-3 hatte sich bereits in früher durchgeführten Experimenten bewährt (Lumpkin und Hudspeth, 1995, 1998) und ist aufgrund seiner Bindungskonstante (K_d) ($0,39 \mu\text{M}$) gut geeignet, um hohe vorübergehende Calciumkonzentrationsspitzen zu detektieren.

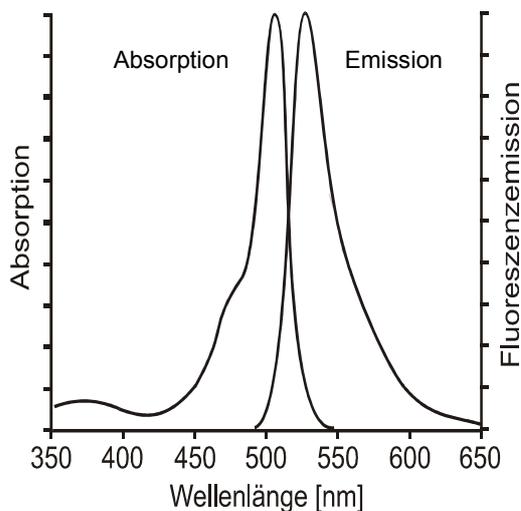


Abb. 2.1: Absorptions- und Emissionsmaximum von fluo-3-AM (<http://www.probes.com/.servlets/Spectra?fileid=1240ca>, 10.12.2004)

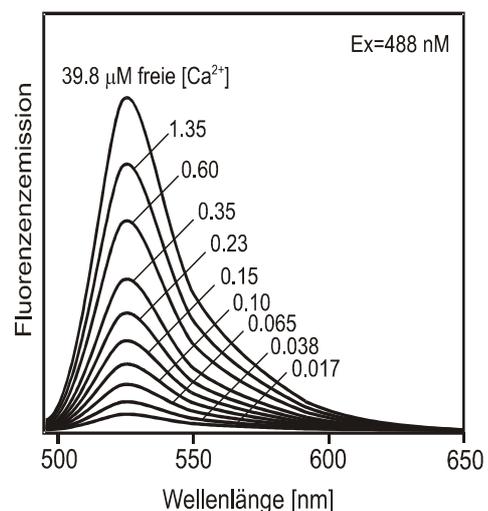


Abb. 2.2: Ca^{2+} -abhängiges Fluoreszenzemissionsspektrum von fluo-3. (Haugland R. P., 2002. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Molecular Probes AM)

2.6. Farbstoffinkubation

Insgesamt 1 mg des Calciumfarbstoffindikators fluo-3-AM wurde in 295 μ l Dimethylsulfoxid (Sigma, Deutschland) aufgelöst, so dass die Stoffmenge/Konzentration 3 mM fluo-3-AM betrug. Diese Stock Solution wurde bei -20 °C gelagert. Direkt vor dem Beginn des Experiments entnahm man daraus mit einer Pipette (Eppendorf, Deutschland) 2 μ l und füllte diese in ein Eppendorfgefäß, welches bereits 1 ml HBSS mit niedriger Calciumkonzentration und Pluronic® F-127 (6 μ M) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) enthielt. Pluronic® F-127 verhinderte die Präzipitation des Calciumindikatorfarbstoffs auf dem Deckglas. Die Endkonzentration von fluo-3-AM war 6 μ M. In etwa 1 ml Farbstofflösung wurde gleichmäßig mittels einer Perfusionspumpe (DESAGA, Heidelberg, Deutschland) auf das Deckglas übertragen, auf welchem sich bislang ca. 160 μ l HBSS mit den isolierten Zellen befanden. Die endgültige Calciumindikatorfarbstoffkonzentration betrug 5 μ M.

Nach ungefähr 30 min Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit, welche die Zellen umgab, unter Verwendung des Pumpensystems vollständig gegen frische HBSS mit niedriger Calciumkonzentration ausgetauscht und somit der restliche Calciumindikatorfarbstoff, der nicht in die Zellen aufgenommen wurde, ausgewaschen. Es wurden unterschiedliche Inkubationszeiten getestet, wobei sich ergab, dass 30 min in optimalem Verhältnis zu Farbstoffaufnahme und Zellzustand (Zellschädigung) standen.

Danach wurde sofort mit dem Experiment begonnen. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) durchgeführt. Es wurden nur intakte Haarsinneszellen mit folgenden Merkmalen verwendet: i) glatte Plasmamembran, ii) unbeschädigtes Stereozilienbündel, iii) keine Brown'sche Molekularbewegung der zytoplasmatischen Organellen, iv) Kern im unteren Drittel der Zelle. Der Unterschied zwischen den intakten und den geschädigten Zellen war auch leicht anhand der Färbung zu erkennen. Obwohl einige Organellen den Farbstoff anzuheften schienen, waren die Stereozilien von Zellen, dessen Membran zum Beispiel nicht intakt war, aufgrund fehlender Färbung nicht darstellbar. Außerdem waren die geschädigten Zellen wenn sie

überhaupt angefärbt waren, nur inhomogen angefärbt, so dass eine Differenzierung leicht möglich war.

2.7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die Detektion der Fluoreszenzsignaländerungen des Calciumindikatorfarbstoffs fluo-3 wurde ein aufrechtes Konfokalarbeitendes Laser-Scanning-Mikroskop von Zeiss (LSM 510, Jena, Deutschland) verwendet. In allen Experimenten dieser Arbeit kam ein Wasser Achroplan IR 40x Objektiv (Numerische Apertur 0,8; Arbeitsabstand 3,61 mm) (Jena, Deutschland) zur Anwendung. Die mit fluo-3 beladenen Zellen wurden durch einen Argonlaser bei 488 nm angeregt. Das emittierte Licht wurde durch einen Long-pass-Filter bei 505 nm aufgetrennt und zwischen 505 - 800 nm detektiert. Mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel wurden die Bilder erstellt, wobei die Pixeltiefe 12 bits und die Scanzeit 983 ms betrug.

Der „Frame Scan“ Modus (der Objektausschnitt wird Zeile für Zeile gescannt) war ausgewählt worden, um die Fluoreszenzänderung in einem optischen Schnitt der Stereozilien verfolgen zu können. Dabei entstand ca. ein Bild pro Sekunde. Die Lochblende (Pinhole) hatte ein Durchmesser von 1,01 Airy Unit. Die Anregungsintensität (ca. 2 % der möglichen Intensität) des Laserlichts wurde so niedrig wie möglich eingestellt, um eine Ausbleichung des Fluorophors sowie die Bildung toxischer Spaltprodukte zu verhindern. Die Quantifizierung und Analysierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit der Zeiss LSM 510 Software (Jena, Deutschland), Excel (Microsoft) und Origin 7 (OriginLab).

2.8. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

In den durchgeführten Experimente wurden Glaskapillaren (Borosilicate, Außendurchmesser 1,5 mm; Innendurchmesser 1,17 mm mit Innenfilament, Harvard Apparatus, UK) für die Erzeugung des Flüssigkeitsstahls verwendet, dessen Enden zuerst in der Gasflamme poliert und anschließend auf dem horizontalen Puller Model P-87 (Sutter Instrument, CO, USA) auf einen Spitzendurchmesser von 2,2 μm ausgezogen wurden.

Es gab zwei verschiedene Versuchsaufbaue und Durchführungen, wobei 50 % (drei) aller beschriebenen Experimente unter Anwendung des Versuchsaufbaus 1 und die anderen 50 % unter Anwendung des Versuchsaufbaus 2 stattfanden.

- **Versuchsaufbau 1**

Eine am Deckglas gut haftenden Zelle wurde ausgewählt. In etwa 6 μm von den Stereozilien entfernt wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Mini 25, Luigs und Neumann, Deutschland) eine der vorbereiteten Kapillaren, die mit HBSS mit hoher Calciumkonzentration gefüllt war, positioniert (Abb. 2.3). Um die Stereozilien zu deflektieren wurde mittels einer Einspritzpumpe (Transjector 5246, Eppendorf, Deutschland) ein Flüssigkeitsstrom (5 s) aus der Kapillare erzeugt. Das Experiment wurde in einer Bildserie dokumentiert und ausgewertet. Zuerst wurden ca. acht Bilder des gesamten Stereoziliums im Ruhezustand der Zelle gemacht, wobei jeweils ein Bild pro Sekunde entstand. Diese Aufzeichnung diente der Registrierung der Signalintensität des Stereoziliums in Ruhe. Während der Scanvorgang kontinuierlich weiterlief, wurde die Deflektion ausgelöst. Nach der Auslenkung der Stereozilien durch den Flüssigkeitsstrom wurden noch weitere 15 Bilder gemacht. (Da die Signalintensität anhand der LSM 510 Software in eine Kurve umgewandelt werden konnte, ließ sich sowohl die Zunahme des Fluoreszenzsignals als auch dessen Rückbildung genau verfolgen.) Anschließend wurde 1 μl DHSM (Sigma, Deutschland) auf den Objektträger pipettiert. DHSM dieser

Konzentration blockiert offene Transduktionskanäle schnell und vollständig. Es wurde verwendet, um zu evaluieren, ob das einströmende Calcium hauptsächlich durch die Transduktionskanäle eintritt oder ob noch andere Wege eine Rolle spielen, bzw. welchen Einfluss die Transduktionskanäle auf das Calciumsignal hatten. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 min wurde der zuvor beschriebene Versuch noch einmal durchgeführt. Wieder wurde die Signalintensität vor, während und nach der Deflektion registriert. (Anhand der gewonnenen Daten war es möglich, den Einfluss von DHSM zu verdeutlichen und gleichzeitig daraus Rückschlüsse über den Weg des einströmenden Calciums zu ziehen.)



Abb 2.3: A) Dartsellung der ÄHZ mit Kapillare. Die Kapillare wurde in der Nähe der Stereozilienspitze positioniert. Maßstab 25 μm . B) Vergrößerung der apikalen Region. Maßstab 5 μm . C) Letztendlich verwendete Vergrößerung für die Beobachtung des Fluoreszenzsignals im Stereozilienbündel. Maßstab 2,5 μm .

- **Versuchsaufbau 2**

Zur Kontrolle wurde die Reversibilität der DHSM-Wirkung überprüft. Dies war unter Versuchsaufbau 1 aufgrund zu kurzer Überlebenszeit und Schädigung der Zellen jedoch nicht möglich, deshalb musste beim zweiten Teil der Versuchsreihe der Aufbau geändert werden. Anstatt einer Kapillare wurden nun zwei Kapillaren mit Hilfe von Mikromanipulatoren in Stereoziliennähe positioniert, wobei der Abstand der zweiten Kapillare 20 μm betrug. Die erste Kapillare enthielt wie im vorigen Versuchsaufbau HBSS mit hoher

Calciumkonzentration, die zweite Kapillare war mit DHSM (100 μM) gefüllt (Abb. 2.4). Die Aufzeichnung des Calciumsignals ohne DHSM-Einfluss war vom Versuchsablauf her identisch wie im Versuchsaufbau 1. Danach wurde der Scanvorgang erneut gestartet, gleichzeitig wurde durch die Einspritzpumpe ein konstanter niedriger Druck erzeugt und damit einen Ausstrom von DHSM aus der Kapillare in Richtung Stereozilien. Dabei war die Stärke des Stroms sehr schwach, damit keine Abscherung der Stereozilien ausgelöst werden konnte. Eine Kontrolle über die Abscherung war durch die kontinuierliche Bildaufzeichnung möglich, da eine Auslenkung eine Signalintensitätsveränderung verursachen würde. Nach 4 s begann während des DHSM-Stroms die Abscherung der Stereozilien durch den aus der ersten Kapillare erzeugten 5 s anhaltenden Flüssigkeitsstrahl. Nach dessen Beendigung wurde der DHSM-Strom noch für 5 s aufrechterhalten. Der Scanvorgang wurde nachfolgend für weitere 13 s fortgesetzt.

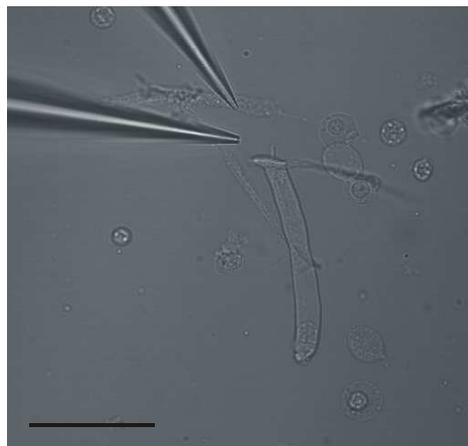


Abb. 2.4: ÄHZ mit zwei Kapillaren, wobei die obere Kapillare mit DHSM, die untere mit HBSS mit hoher Calciumkonzentration gefüllt war. Maßstab 50 μm .

Anschließend wartete man ca. 40 s, was ungefähr denselben Effekt hatte wie der Austausch der Flüssigkeiten in Versuchsaufbau 1 (Auswaschung des DHSM) (jedoch ohne Bewegung der die Zellen umgebenden Flüssigkeit), da die Menge des applizierten DHSM (ca. 0,1 μl) und somit auch die auf dem Objektträger vorhandene Konzentration (ca. 10 nM) so gering war, dass es nach Verteilung in der Flüssigkeit so gut wie keinen Effekt mehr auf die Zellen bzw. auf die Stereozilien haben konnte. Nach Ablauf dieser Zeitspanne, in der

die Bildaufzeichnung weiter fortgesetzt wurde, fand eine Wiederholung des Versuchs wie in Versuchsaufbau 1 ohne DHSM statt.

Von den ersten zwei Kurven, welche die Signalintensitätsänderung während der Auslenkung der Stereozilien ohne DHSM-Einfluss und mit DHSM-Einfluss zeigten, wurden die Steigungen miteinander verglichen. Auf diese Weise konnte eine Aussage über die Rolle der Transduktionskanäle bezüglich des Eintritts der Calciumionen während der Auslenkung der Stereozilien gemacht werden. Die dritte Kurve diente als Kontrolle über die Reversibilität des Fluoreszenzsignals.

2.9. Datenanalyse

Um die Fluoreszenzintensität zu berechnen, wurde die ROI-Option (**R**egion of **I**nterest) verwendet. Mit Hilfe dieser Option konnte eine bestimmte Region des Stereozilienbündels oder des Bildes markiert werden, in der die Software die Durchschnittsfluoreszenzintensität (F) des markierten Bereichs errechnen soll. Von dieser wurde die Hintergrundintensität (F_0) abgezogen. Anschließend wurde das Verhältnis $\Delta F/F_0$ berechnet, wobei $\Delta F = F - F_0$ ist. Wird F_0 von allen Werten abgezogen, so beginnt die Kurve bei der Intensität Null und ist somit leichter mit den anderen Kurven zu vergleichen.

2.10. Statistik

Zur Signifikanzberechnung wurde der Student's-t-test angewendet. Die Unterschiede zwischen den gemittelten Daten waren statistisch signifikant, wenn $P \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe eines calciumreichen Flüssigkeitsstroms (4 mM) wurden die Stereozilien der ÄHZ, die von HBSS mit niedriger Calciumkonzentration (0,1 mM) umgeben waren, in exzitatorischer Richtung entlang ihrer Symmetrieachse stimuliert. Da die isolierten ÄHZ vorher mit dem Calciumindikatorfarbstoff fluo-3 geladen wurden, ließ sich der Calciumioneneintritt und die dadurch verursachte Fluoreszenzintensitätsänderung unter Verwendung des konfokal arbeitenden Laser-Scanning-Mikroskops (LSM 510, Zeiss) detektieren. Für die dargestellten Bildaufzeichnungen wurde die Frame-Scan-Methode verwendet.

Die nachfolgenden Abbildungen sind Beispiele aus den hier sechs berichteten Experimenten, wobei drei der Versuche jeweils aus drei Telexperimenten aufgebaut waren. Die anderen drei Versuche bestanden nur aus jeweils zwei Telexperimenten, so dass sich letztendlich eine Anzahl von 15 Messungen ergab.

3.1. Deflektion der Stereozilien

3.1.1. Bildliche Darstellung des Calciumsignals

Das Resultat einer positiven Deflektion (in exzitatorischer Richtung) ohne andere beeinflussende Faktoren (Kontrollsituation) ist in der Abbildung 3.1 dargestellt. Das erste Bild in Abbildung 3.1A zeigt ein Durchlichtbild eines nicht fluoreszentes Haarbündels. Es ließen sich insgesamt zwei verschiedene Stereozilienreihen (siehe Pfeile) unterscheiden. Die nachfolgenden Bilder sind Fluoreszenzaufnahmen derselben Region, wobei die Nummern am linken unteren Bildrand die Aufnahmezeit in Sekunden anzeigen, in der die Bilder nach Experimentbeginn erstellt wurden.

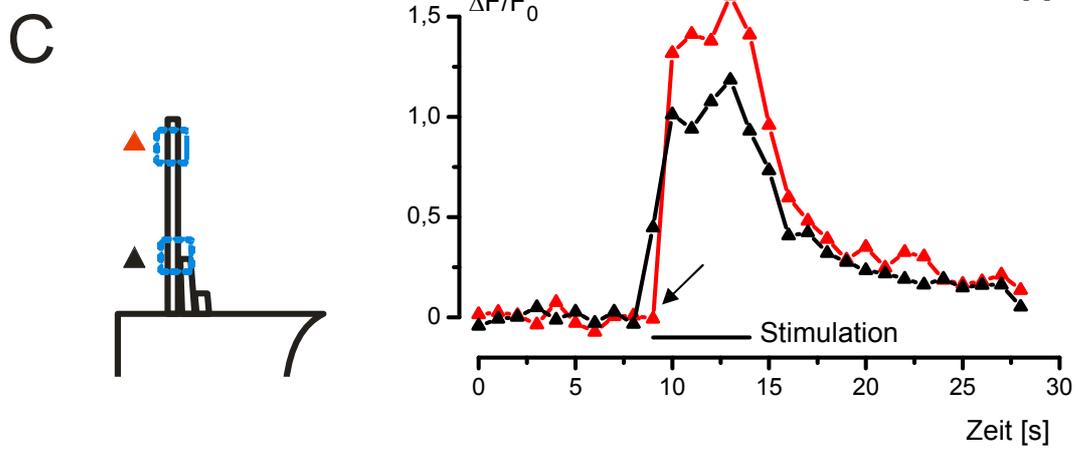
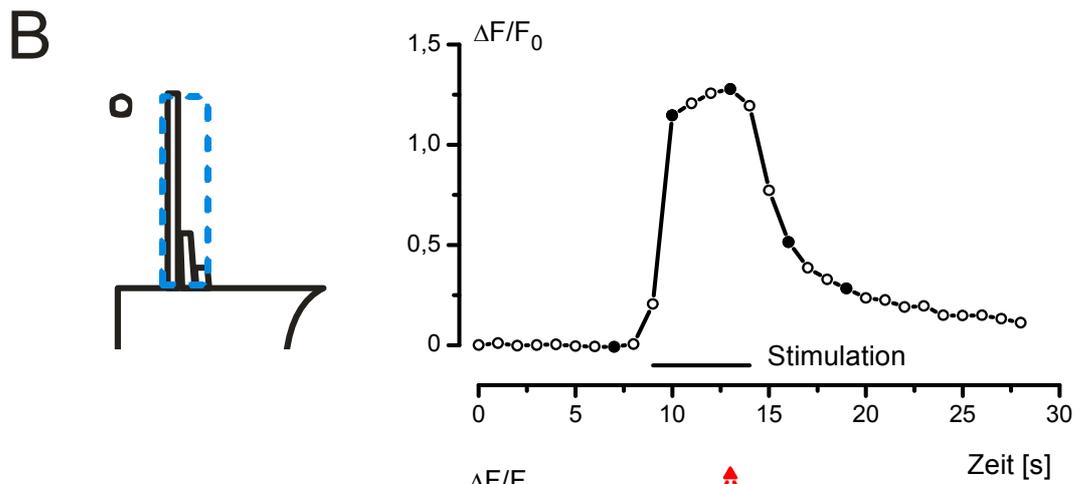
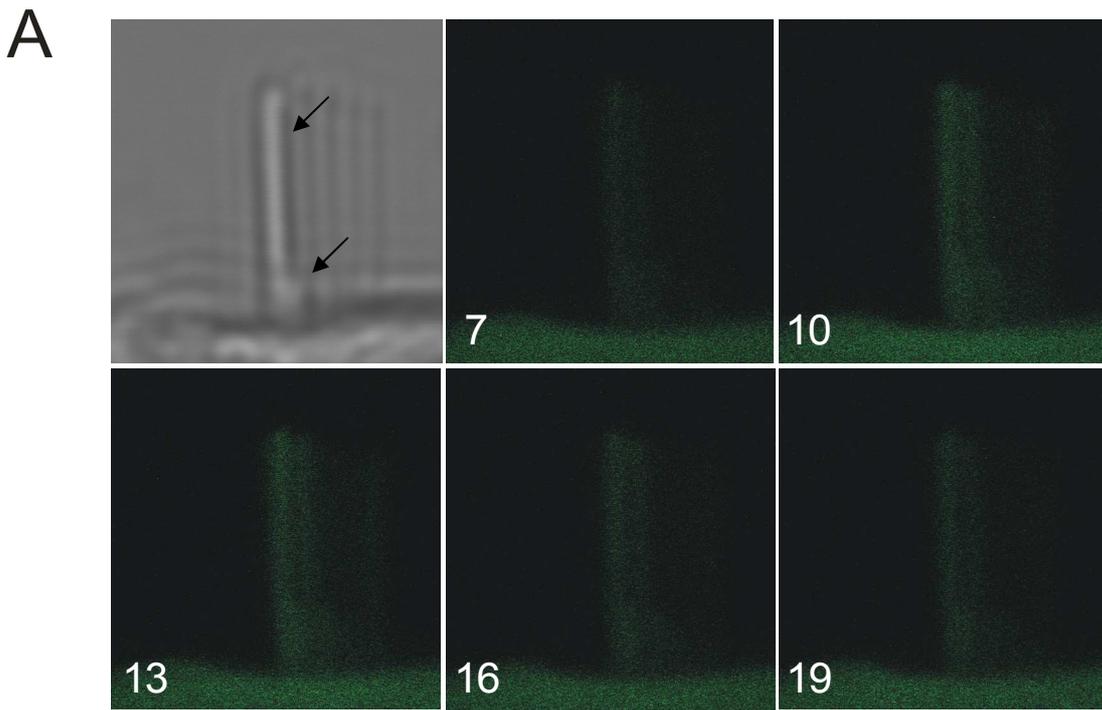


Abb. 3.1: **A)** Bildabfolge eines fluoreszierenden Stereozilienbündels einer isolierten ÄHZ. Das erste (linke) Bild zeigt eine Durchlichtaufnahme des untersuchten Haarbündels. Die nachfolgenden fünf Bilder zeigen das gleiche Stereozilienbündel zu unterschiedlichen Zeiten des Experimentes, wobei die Angabe am unteren linken Bildrand den Zeitverlauf in Sekunden angibt. $T = 7$ s entspricht der Situation vor der Stimulation, $t = 10$ s und $t = 13$ s während und $t = 16$ s und $t = 19$ s wurden nach der erregenden Stimulation aufgezeichnet. **B)** Links: Schematische Zeichnung des Stereozilienbündels mit Kennzeichnung der untersuchten ROI (Region of Interest), aus der das gemittelte Fluoreszenzsignal berechnet wurde (gestrichelte blaue Linie). Rechts: Darstellung der zeitlichen Veränderung des Fluoreszenzsignals bzw. der intrazellulären Calciumkonzentration, des Verhältnisses $\Delta F/F_0$, vor, während und nach der Deflektion. Generell gilt für alle Kurven, dass die Symbole, die die Kurven markieren (wie hier die Kreise), jeweils im Sekundenabstand stehen. Die geschlossenen Symbole (●) entsprechen den gezeigten Fluoreszenzbildern in A und der Stimulationszeitraum ist durch die schwarze horizontale Linie, die parallel zur Zeitachse verläuft, gekennzeichnet. **C)** Links: Schematische Zeichnung des Stereozilienbündels mit zwei ROIs, aus der die Fluoreszenzintensitätsänderung berechnet wurden (gestrichelte blaue Linie). Zum einen wurde das apikale Ende des längsten Stereoziliums (▲) und zum anderen der Bereich zwischen dem längsten und dem mittleren Stereozilium (▲) untersucht. Rechts: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensitätsänderung in beiden Regionen vor, während und nach der Deflektion mit sichtbarer Differenz bezüglich des Beginns des Intensitätsanstiegs (Pfeil).

Im ersten Fluoreszenzbild ohne Stereozilienauslenkung ($t = 7$ s) war lediglich ein Stereozilium deutlich sichtbar, und es konnte nur ein schwaches Fluoreszenzsignal des Haarbündels registriert werden. Nach der Deflektion in exzitatorischer Richtung ($t = 10$ s) nahm die Intensität des Fluoreszenzsignals stark zu, wobei die detektierte Signalverstärkung durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hervorgerufen wurde. Zusätzlich wurde eine weitere Stereozilienreihe sichtbar. Das Stimulationsende korreliert mit $t = 14$ s. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde bei $t = 13$ s erreicht. Danach fiel die intrazelluläre Calciumkonzentration und mit ihr die Fluoreszenzsignalintensität wieder ab ($t = 16$ s), wobei die End- oder Ruhefluoreszenzintensität ($t = 19$ s) etwas größer als die des ursprünglichen Ausgangsniveaus war.

3.1.2. Calciumsignal des gesamten Stereozilienbündels

Um eine genauere Aussage über den Zeitverlauf und die Intensität des Fluoreszenzsignals zu treffen wurde das gemittelte Fluoreszenzsignal des gesamten Stereozilienbündels analysiert (Abb. 3.1B).

Erkennbar ist der schnell verlaufende Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, bzw. der Fluoreszenzintensität, die innerhalb von zwei Sekunden nach der Deflektion der Stereozilien ihr Maximum erreichte. Nach Stimulationsende fiel sie innerhalb der folgenden 15 - 20 Sekunden wieder ab. Beide Zeitverläufe waren exponentiell (Abs. 3.3). Allerdings wird deutlich, dass die wiedererlangte Ruhefluoreszenzintensität höhere Werte aufweist als vor Beginn der Stimulation, was an der Akkumulation des Calciums während der Stimulation liegen könnte. Aufgrund des Kurvenverlaufes ist anzunehmen, dass die vollständige Elimination der Calciumionen, sofern sie erreicht werden kann, mehr Zeit benötigen würde und damit den Zeitraum, in welchem die Aufzeichnung erfolgte, weit überschreitet.

3.1.3. Lokalisierte Calciumsignale im Stereozilienbündel

Um eine bessere Lokalisationsanalyse des Calciumsignals innerhalb der Haarbündel durchzuführen, wurde die Registrierung der gemittelten Fluoreszenzintensität auf zwei kleinere Regionen beschränkt (Abb. 3-1C). Die ROI 1 (Abb. 3-1C; Region 1; ▲) war in Nähe des apikalen Ende des längsten Stereoziliums lokalisiert, die ROI 2 (Abb. 3-1C; Region 2; ▲) dagegen befand sich zwischen der Reihe der mittleren Stereozilien und dem längsten Stereozilium. Diese Anordnung entspricht den vermuteten Anheftungspunkten der Tip Links, und damit der Position der Transduktionskanäle.

Der Kurvenverlauf der einzeln untersuchten Regionen (Abb. 3.1C) entsprach dem Verlauf der über dem gesamten Haarbündel (Abb. 3.1B) gemessen wurde. Bei der Beobachtung des Signalverlaufs war erkennbar, dass die Fluoreszenzsignalintensität, und damit die intrazelluläre Calciumkonzentration

in der ROI 2 ca. eine Sekunde früher anstieg als in Spitzennähe des längsten Stereoziliums.

3.2. DHSM Experiment

Mit Hilfe des Transduktionskanalblockers DHSM konnte der Einfluss der Transduktionskanäle auf den Calciumeinstrom in den Stereozilien der ÄHZ überprüft werden. Im Folgenden wird ein Versuchsabschnitt vorgestellt, der sich aus drei Teilabschnitten zusammensetzt. Zu Beginn des Experiments wurde die Kontrollsituation, bzw. die positiven Deflektion der Stereozilien und die daraus resultierenden Fluoreszenzintensitätsänderung untersucht. Dem folgte die Detektion der Fluoreszenzintensitätsänderung während der mechanischen Stimulation unter gleichzeitiger DHSM-Applikation, und letztendlich fand die Wiederholung der positiven Deflektion noch einmal nach Auswaschen von DHSM statt.

3.2.1. Bildliche Darstellung des Calciumsignals

Zur Erfassung des Einflusses von DHSM wurden, wie in Abschnitt 3.1.1 dargestellt, Fluoreszenzbilder von Stereozilien der ÄHZ mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommen und die Fluoreszenzänderung gegen die Zeit untersucht (Abb. 3.2). Im ersten Versuchsabschnitt (Kontrolle) wurden die Stereozilien in positiver Richtung, wie in allen Experimenten mittels eines calciumreichen (4 mM) Flüssigkeitsstrahls, ausgelenkt. Wie in Abschnitt 3.1.A beschrieben, war auch hier ein schwaches Fluoreszenzsignal des Stereozilienbündels zu Beginn des Experiments ohne Stimulus registrierbar ($t = 2$ s). Nach der mechanischen Stimulation in die exzitatorische Richtung, nahm die Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen ihres Maximums zu, und es wurde eine weitere Stereozilienreihe sichtbar ($t = 5$ s). Die Stimulation startete zeitlich kurz vor der Erstellung des zweiten Bildes ($t = 4$ s).

Was jedoch in Abb. 3.1C nur im Diagramm ersichtlich wurde, war hier auch in den bildlichen Aufnahmen (Kontrollen) erkennbar: die Intensitätszunahme begann zuerst in der unteren Hälfte des Stereoziliums, bzw. in der Gegend, wo die Tip Links ansetzen ($t = 5$ s) und breitete sich dann aus bis ein starkes homogenes Fluoreszenzsignal des gesamten Stereoziliums detektiert werden konnte ($t = 8$ s). Während der Stimulation blieb die intrazelluläre Calciumkonzentration, bzw. Fluoreszenzintensität erhöht und fiel nach Stimulationswegfall wieder ab ($t = 11$ s; $t = 14$ s) bis die Ausgangsintensität nahezu erreicht wurde ($t = 17$ s).

Anschließend wurde unter dem kontinuierlichen DHSM-Ausstrom aus einer zweiten Kapillare die Stimulation erneut durchgeführt. Bereits bei Beginn des DHSM-Experiments konnte in Ruhe eine leicht erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration anhand des stärkeren und damit besser sichtbaren Fluoreszenzsignals gegenüber der Kontrollsituation registriert werden ($t = 2$ s), was mit der erhöhten Calciumkonzentration, bzw. Intensität am Ende des Kontrollexperiments zusammenhing. Eine vollständige Wiederherstellung der Ausgangssituation konnte aber aufgrund der Gesamtdauer der Experimente und der mit der Zeit einhergehenden Schädigung der Zellmembran nicht durchgeführt werden.

Trotz der Blockade der Transduktionskanäle mit DHSM war eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität während der positiven Deflektion zu verzeichnen ($t = 5$ s), welche auch während der Stimulation aufrechterhalten wurde ($t = 8$ s). Allerdings war es nicht möglich anhand der Bilder ein differenzierten Aufnahmeunterschied zwischen dem apikalen und basalen Abschnitt der Stereozilien festzustellen. Der anschließende Abfall der Fluoreszenzintensität konnte anhand der weiteren Bilder ($t = 11$ s; $t = 14$ s; $t = 17$ s) verfolgt werden. Wiederum war das Niveau der Intensität am Ende des Experiments gegenüber dem am Beginn leicht erhöht. Nachdem sich die DHSM-Wirkung aufgrund der kurzen Wartezeit (40 sec) verflüchtigt hatte (die sich auf dem Objektträger befindliche Konzentration DHSM (10 nM) war nach der Verteilung in der Flüssigkeit so gering, dass sie nahezu keine Wirkung auf die Zellen hätte (Washout)), wurde derselbe Vorgang noch einmal wiederholt.

Eine Fluoreszenzintensitätszunahme nach Stimulationsbeginn ($t = 5$ s; $t = 8$ s), sowie ein Abfall nach Stimulationsende ($t = 11$ s, $t = 14$ s, $t = 17$ s) waren beobachtbar. Allerdings konnte der unterschiedlich lokalisierte Beginn der Fluoreszenzintensitätsänderung entlang der Stereozilien und damit die Signalausbreitung, wie sie im Kontrollexperiment nachgewiesen werden, anhand der Bilder nicht identifiziert werden.

3.2.2. Calciumsignal des gesamten Stereozilienbündels

Da ein alleiniger Vergleich der Fluoreszenzsignalintensitätsverläufe mittels der Bildserien nicht möglich war, wurde wie in Abschnitt 3.1.2 die Fluoreszenzintensitätsänderung entlang des gesamten Haarbündels berechnet und in Diagrammen dargestellt (Abb. 3.2.B).

Im Kontrollexperiment konnte ein schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen des Maximums innerhalb von zwei Sekunden beobachtet werden. Im Gegensatz dazu erreichte die Kurve unter der Blockade der Transduktionskanäle mit DHSM erst nach drei Sekunden ihr Maximum. Die Amplitude der Fluoreszenzintensitätsverlaufskurve hingegen wurde nicht durch die Gabe von DHSM beeinflusst. Ebenfalls von DHSM und damit von den Transduktionskanälen als unabhängig erwies sich die Abnahme der Fluoreszenzintensität (intrazelluläre Calciumkonzentration).

Nachdem DHSM ausgewaschen war, erreichte die Fluoreszenzintensität ihr Maximum wieder innerhalb von zwei Sekunden, was den Ergebnissen des Kontrollversuchs entsprach. Somit konnte die Reversibilität des vorangehenden DHSM-Experiments nachgewiesen werden.

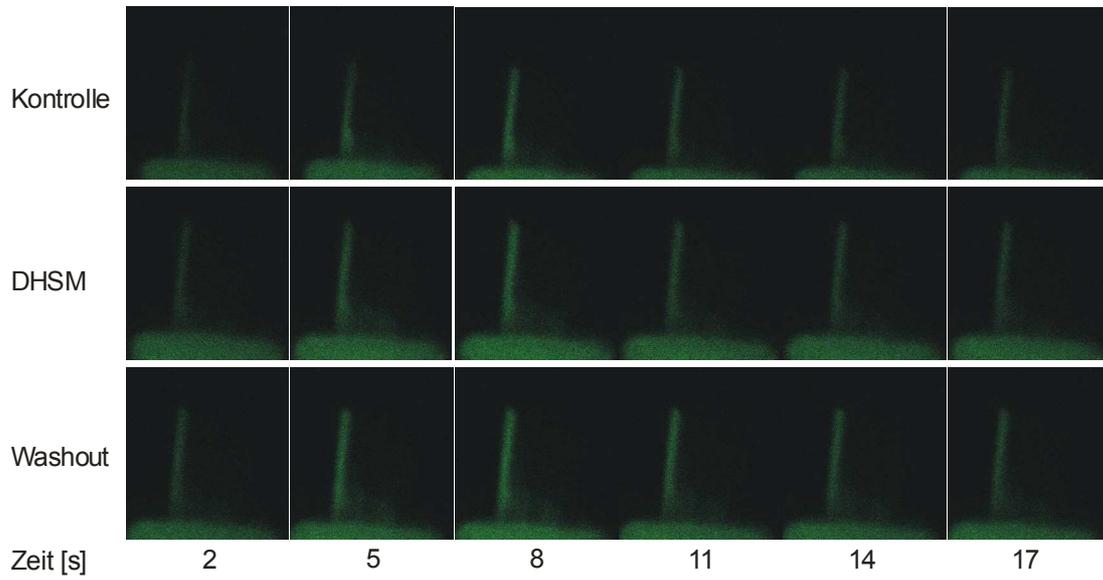
3.2.3. Lokale DHSM-Wirkung

Da die Beobachtung des gesamten Haarbündels eine zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensitätszunahme unter der Applikation von DHSM zeigte, war eine nähere Untersuchung der verschiedenen Stereozilienabschnitte von großem Interesse. Abb. 3.2C zeigt die Fluoreszenzintensitätsänderung an zwei

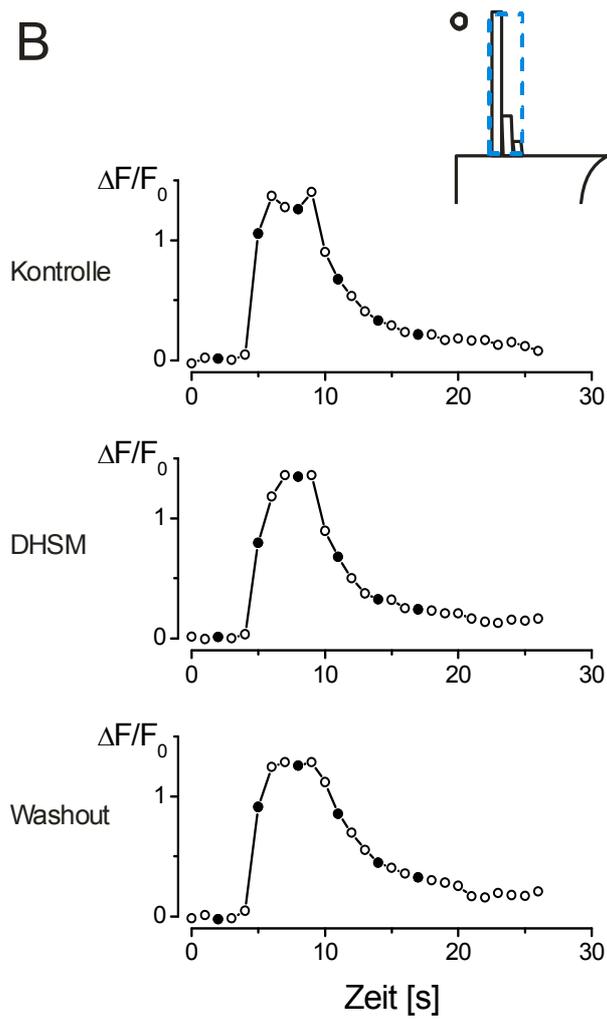
verschiedenen Regionen der Stereozilien. Beide Bereiche entsprechen in ihrer Lokalisation den ROIs in der Kontrollsituation unter Abs. 3.1.3. und sind in der schematischen Zeichnung durch die punktierte Linie hervorgehoben. Die Fluoreszenzintensitätsänderung und damit die Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulationsbeginn setzte im Kontrollexperiment in der ROI 2 deutlich früher ein als in der ROI 1 (Abb. 3.2C). Insgesamt begann die Fluoreszenzintensität in der ROI 2 gegenüber der ROI 1 ca. 1 s (n = 6) früher anzusteigen. Während der Blockade der Transduktionskanäle durch DHSM war diese Differenz nicht mehr nachweisbar, die Kurven in ROI 1 und 2 stiegen nahezu zeitgleich an. Nach der Auswaschung von DHSM war die Zeitverzögerung bezüglich des Beginns der Intensitätsänderung zwischen beiden ROIs wieder erkennbar (ca. 1 s, n = 3).

Abb. 3.2: **A)** Bildabfolge von fluoreszierenden Stereozilien einer isolierten ÄHZ unter dem Einfluss von DHSM. Die obere Reihe zeigt den Kontrollzustand, wobei $t = 2$ s vor, $t = 5$ s und $t = 8$ s während und $t = 11$ s; $t = 14$ s; $t = 17$ s nach der erregenden Stimulation aufgezeichnet wurden. Darunter sind sechs Bilder dargestellt, die zu denselben Zeitpunkten wie im Kontrollexperiment gemacht wurden, mit dem Unterschied, dass während der mechanischen Stimulation die Transduktionskanäle mit DHSM blockiert wurden. Anschließend wurde das Experiment ein weiteres Mal wiederholt, wobei die DHSM-Wirkung nicht mehr vorhanden war (Washout). **B)** Oberhalb der Diagramme ist die aufgenommene ROI des Stereozilienbündels schematisch dargestellt (gestrichelte blaue Linie). Darunter ist die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals (Verhältnisses $\Delta F/F_0$) während allen drei Experimente (Kontrolle, DHSM, Washout) dargestellt. Die schwarz ausgefüllten Kreise markieren den Zeitpunkt der Bildentstehung. Zu sehen war eine Verlangsamung des Kurvenanstiegs unter DHSM-Einwirkung. Die geschlossenen Kreise der einzelnen Diagramme entsprechen den Fluoreszenzbildern in A. **C)** Separierte Darstellung der Fluoreszenzintensitätsänderungen für unterschiedliche ROIs (basal = ▲, apikal = ▲). Demonstration des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensitätsänderung in beiden Regionen vor, während und nach der Deflektion mit sichtbarer Differenz bezüglich des Beginns des Intensitätsanstiegs im Kontrollexperiment und nach Auswaschung von DHSM (Pfeil), während unter DHSM-Einfluss beide Kurven zeitgleich (Pfeil) anstiegen.

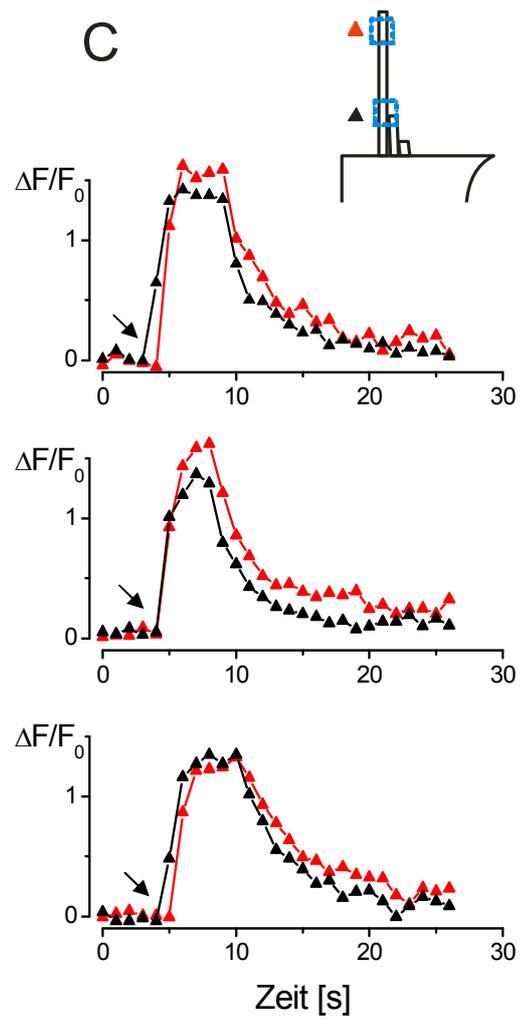
A



B



C



3.3. Der Einfluss von DHSM auf die gemittelte intrazelluläre Calciumkonzentration

Da der Zeitunterschied bis zum Erreichen des Fluoreszenzintensitätsmaximums zwischen den Experimenten ohne DHSM-Einfluss (1 s, n = 5; 2 s, n = 2) und mit DHSM-Einfluss (1 s, n = 1; 3 s, n = 3; 4 s, n = 2) nur sehr gering war, wurde um zu entscheiden, ob der Unterschied signifikant (95% Signifikanzniveau) war, das Ergebnis weiter analysiert. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden mit Hilfe von Origin 7 an die Exponentialfunktion

$$y = A * (1 - \exp(-t / \tau)) \quad (1)$$

angepasst (Abb. 3.3A), wobei y die Fluoreszenzintensität, A die Amplitude, t die Zeit und τ die Zeitkonstante kennzeichnet. Je kleiner τ ist, desto schneller ist der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und damit die Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die Zeitkonstante τ spiegelt so die Steigungen der Kurven wider.

Die Kurven weisen während des intrazellulären Calciumanstiegs einen exponentiellen Verlauf auf. Im Kontrollexperiment wurde während der positiven Stimulation eine durchschnittliche Zeitkonstante (τ) von 0.26 ± 0.19 s (n = 6) erreicht. Durch die Blockade der Transduktionskanäle mit DHSM vergrößerte sich die Zeitkonstante τ auf 2.14 ± 1.36 s (n = 6). Die Geschwindigkeit mit der die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Stimulationsbeginn anstieg war demnach signifikant langsamer als im Kontrollexperiment (Abb. 3.3B).

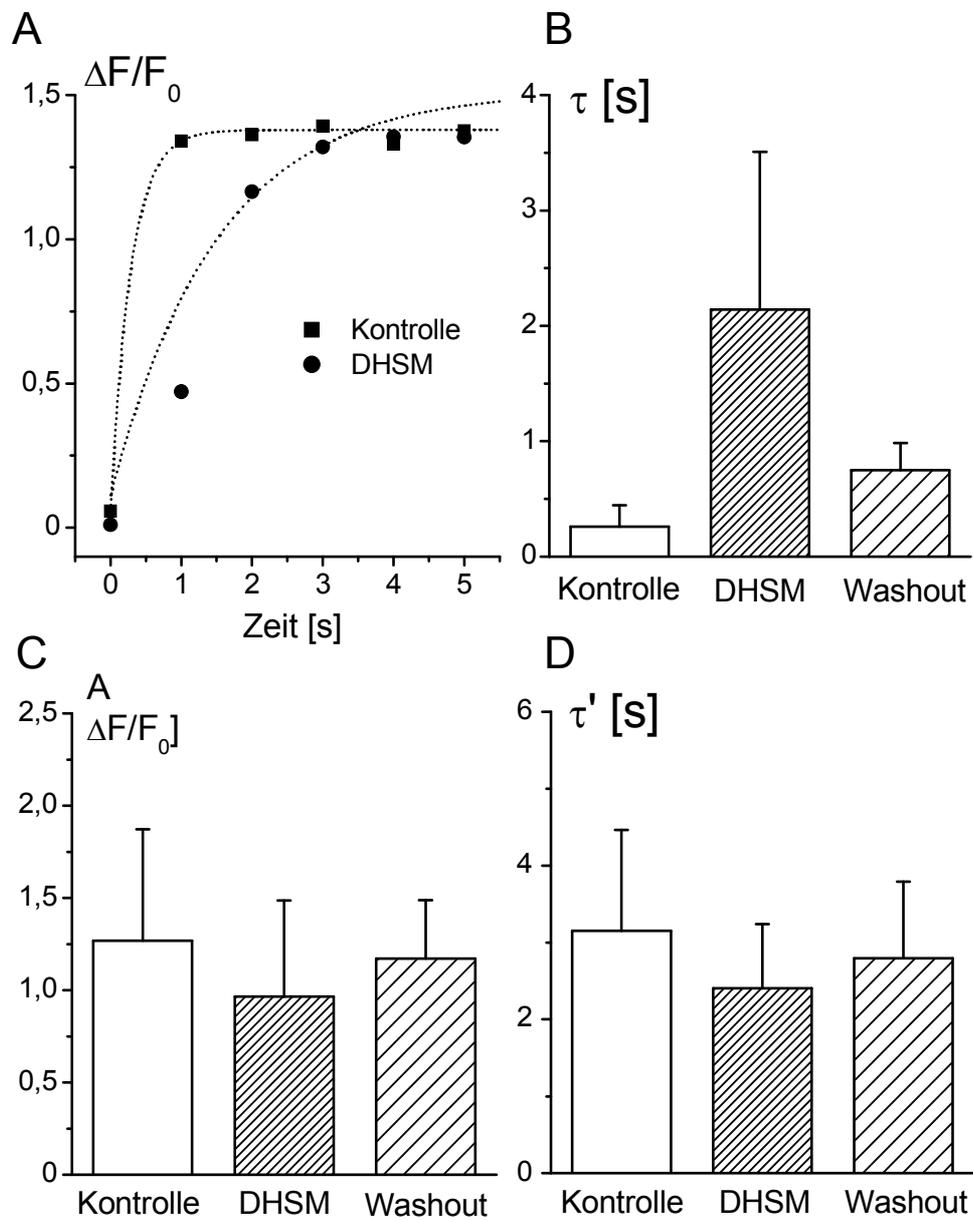
Nach der Auswaschung von DHSM konnte eine partielle Reversibilität des Ergebnisses nachgewiesen werden. Die Zeitkonstante τ betrug 0.75 ± 0.24 s (n = 3) und war damit signifikant kleiner als unter DHSM-Einfluss (Abb. 3.3B). Die Geschwindigkeit der intrazellulären Calciumkonzentrationserhöhung hatte wieder zugenommen.

Abb. 3.3C zeigt die durchschnittlichen Amplituden der Fluoreszenzintensität der drei Versuche in denen das Washout erfolgreich durchgeführt werden konnte. Im Gegensatz zu den Zeitkonstanten ergibt sich

für die Amplituden der Fluoreszenzintensitätskurven kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsuntereinheiten. Die Höhe des intrazellulären Calciumanstiegs und die daraus resultierende maximale Fluoreszenzintensitätsänderung unterliegen daher keinem Einfluss der Offenwahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle.

Auch der intrazelluläre Calciumabfall folgte in allen drei Teilerperimenten (Kontrolle, DHSM, Washout) einem exponentiellen Verlauf. Die Zeitkonstante τ' der Kontrollversuche betrug 3.15 ± 1.31 s ($n = 6$) und unterschied sich dabei nicht signifikant von τ' (DHSM) = 2.4 ± 0.84 ($n = 5$) und τ' (Washout) = 2.8 ± 0.99 ($n = 3$) (Abb. 3.3D). Somit erweist sich der intrazelluläre Calciumabfall ebenfalls als von der DHSM-Wirkung als unabhängig.

Abb. 3.3: **A)** Zeitabhängige Fluoreszenzintensitätsänderung ohne DHSM (■) und in Gegenwart von DHSM (●). Die Kurven wurden mit Hilfe der Gleichung 1 angepasst (gepunktete Linien). **B)** Durchschnittliche Zeitkonstante τ , welche den Anstieg der Fluoreszenzintensitätskurve widerspiegelt. Die Applikation von DHSM (100 μ M) verlangsamte signifikant den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration: von $\tau = 0.26 \pm 0.19$ s auf $\tau = 2.14 \pm 1.36$ s ($n = 6$) und war fast reversibel ($\tau = 0.75 \pm 0.24$ s; $n = 3$) nach Washout. **C)** Durchschnittliche maximal erreichte Fluoreszenzintensität, A. Die Applikation von DHSM hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter. **D)** Durchschnittliche Zeitkonstante τ' , welche den Abfall der Fluoreszenzintensitätskurve zeigt. Die Veränderung des intrazellulären Calciumabfalls im Kontrollexperiment ($\tau' = 3.15 \pm 1.31$ s; $n = 6$) war im Vergleich zum DHSM-Experiment ($\tau' = 2.4 \pm 0.84$ s; $n = 5$) und Washout ($\tau' = 2.8 \pm 0.99$ s; $n = 3$) nicht signifikant.



4. Diskussion

Bisher existieren noch viele Informationslücken über den Aufbau und die Arbeitsweise des Transduktionskanal und die Regelung der intrazellulären Calciumkonzentration in den äußeren Haarsinneszellen der Säugetiere. Viele Ergebnisse stammen aus Versuchen, die an Haarsinneszellen von Vögeln (Ohmori, 1988) und Fröschen (Lumpkin und Hudspeth, 1995, 1998) durchgeführt wurden.

In den hier dargestellten Experimenten wurde die Entstehung von calciumabhängigen Fluoreszenzsignalen während der positiven Stimulation des Haarbündels untersucht, um so weitere Hinweise auf die Lokalisation und den Einfluss der Transduktionskanäle der Säugetiere bei der mechanoelektrischen Signalübertragung zu erhalten.

4.1. Physiologischer Zustand der äußeren Haarsinneszellen

Eine Voraussetzung der Experimente war die Intaktheit der Zellen. Dies wurde durch folgende Kriterien verifiziert: 1) eine glatte Plasmamembran, 2) der Kern befand sich im unteren Drittel der Zelle, 3) homogene Färbung (fluo-3) der Zellen, 4) keine Brown'sche Molekularbewegung der zytoplasmatischen Organellen. Zellen die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden nicht für die Versuche verwendet. Aber auch bei äußerlich intakt erscheinenden Zellen wäre man nicht in der Lage gewesen, zu bestimmen, ob die Tip Links unversehrt waren. Zum einen ist die Auflösung des LSM zu gering, um Tip Links zu identifizieren und zum anderen wäre es trotz beschädigter Tip Links möglich gewesen, ein calciumabhängiges Fluoreszenzsignal zu erhalten, da die Transduktionskanäle bei zerstörten Tip Links offen bleiben würden (Meyer *et al.*, 1998, 2005). Allerdings haben elektronenmikroskopische Untersuchungen von isolierten ÄHZ des Meerschweinchen gezeigt, dass nach der Isolierung mindestens 30-60 % aller Tip Links vorhanden sind (Meyer *et al.*, 1998).

Der physiologische Zustand der ÄHZ spiegelte sich vor allem in der Überlebenszeit der Zellen wieder. Es kamen zwei verschiedene Versuchsaubaue zur Anwendung, da es im ersten Versuchsaufbau nicht gelungen war, das vollständige Experiment durchzuführen. Die Zellen überlebten nicht lange genug, so dass der dritte Versuchsabschnitt nach der Auswaschung des Transduktionskanalblockers DHSM nicht fortgeführt werden konnte. Mehrere Faktoren begrenzten die Überlebenszeit der Zellen, so z. B. die Inkubationszeit mit DHSM und die Konzentration von DHSM. Im Versuchsaufbau 2 wurde die Inkubationszeit von 3 min auf ca. 14 s und die Menge von 1 µl auf 0,1 µl reduziert. Die Inkubationszeit und die Menge sind aufgrund der Ototoxizität von DHSM (Rybak, 1986) von großer Wichtigkeit. Nicht die Kanalblockade, sondern die Anlagerung an die basolaterale Zellmembran und die nachfolgende Aufnahme in das Zellinnere bewirken den Zelluntergang. Der Zelltod kann durch die Bildung von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (Schacht 1974, 1976) und die so hervorgerufene Störung des empfindlichen intrazellulären Botenstoffsystems verursacht werden. Die Blockade der Transduktionskanäle selber ist jedoch reversibel, wie auch in früheren Experimenten nachgewiesen wurde (Kroese *et al.*, 1989; Jaramillo und Hudspeth, 1991).

Zur Verkürzung der Überlebenszeit der Zellen könnte auch der komplette Flüssigkeitsaustausch (Auswaschung) beigetragen haben. Die auf diese Weise entstehende starke Bewegung der die Zellen umgebenden Flüssigkeit könnte ebenfalls eine Zellschädigung zur Folge gehabt haben.

Schließlich bleibt noch die Bildung von toxischen Spaltprodukten zu erwähnen, deren Bildung aber durch die niedrig gehaltene Anregungsintensität des Argonlasers versucht zu verhindert wurde.

4.2. Intrazelluläre Calciumkonzentration und fluo-3-Konzentration

Die intrazelluläre Calciumkonzentration in Ruhe war vor dem Austausch der die Zellen umgebenden Flüssigkeit (normale HBSS) gegen HBSS mit niedriger Calciumkonzentration (0,1 mM) relativ hoch, was an der hohen Fluoreszenzintensität gesehen werden konnte. Dies könnte entweder an den aufgrund der zerstörten Tip Links in Ruhe offen stehenden Transduktionkanälen oder an den spannungsabhängigen Calciumkanälen (Voltage-gated calcium channels (VGCCs)) liegen, durch welche Calciumionen eintreten können. Die VGCCs befinden sich an der Basis der Haarsinneszellen in der Nähe der Zone, wo der Transmitter freigesetzt wird und öffnen sich bei Depolarisation der Zelle (Roberts *et al.*, 1990; Issa und Hudspeth, 1994, Lopez *et al.*, 2003). Ein bedeutender Anteil dieser Kanäle ist jedoch auch in Ruhe geöffnet (Übersicht: Fuchs 2002).

Neben den VGCCs sind noch die P2X-Rezeptorkanäle bekannt, durch die Calciumionen eintreten könnten (Ashmore und Ohmori, 1990). P2X-Rezeptoren sind blockierbare, nicht spezifische ligandengesteuerte Kationenkanäle, die sich in den Stereozilien befinden. Sie werden durch extrazellulär bindendes ATP geöffnet und verursachen einen großen Einwärtsstrom (mehrere 100 pA) (Housley *et al.*, 1992; Mockett *et al.*, 1994) u. a. von Calciumionen (Ashmore und Ohmori, 1990). Diese Kanäle agieren unabhängig von den Transduktionskanälen (Glowatzki *et al.*, 1997) und befanden sich während hier ähnlichen Versuchen im geschlossenen Zustand (Meyer *et al.*, 1998). Außerdem enthielt die die Zellen umgebende Flüssigkeit (HBSS mit niedriger Calciumkonzentration), welche nach der Farbstoffinkubation um die Überreste von fluo-3 AM zu entfernen vor Versuchsbeginn noch einmal ausgetauscht werden musste, kein ATP, welches die Kanäle hätte aktivieren können. Darum kann davon ausgegangen werden, dass die P2X-Rezeptoren keinen bedeutenden Effekt auf den Calciumeintritt in diesen Experimenten hatten.

Aufgrund der hohen intrazellulären Calciumkonzentration und der damit einhergehenden Sättigung des fluo-3 Farbstoffes gelang es nicht ein calciumabhängiges Fluoreszenzsignal durch Stimulation der Stereozilien zu erzeugen. Deshalb fand der oben erwähnte Flüssigkeitsaustausch statt, wodurch sich indirekt die intrazelluläre Calciumkonzentration erniedrigte. Um zu gewährleisten, dass während der Stimulation dennoch genügend extrazelluläres Calcium vorhanden war, das in die Stereozilien einströmen und so ein Fluoreszenzsignal erzeugen konnte, wurde die Calciumkonzentration im stimulierenden Flüssigkeitsstrahl auf 4 mM erhöht. Die niedrige Calciumkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit (100 μ M) hatte keinen negativen Effekt auf die Zellen und ihr physiologisches Gleichgewicht, da sie den physiologischen Bedingungen der Endolymphe (30 μ M, Bosher und Warren, 1978) viel eher entsprach als die zuvor verwendete Flüssigkeit. Da jedoch nur die Calciumkonzentration der Endolymphe diese Konzentration aufweist und die Zellen nur an ihrer Oberfläche mit Endolymphe bedeckt sind, wurde die Calciumkonzentration nicht bis 30 μ M reduziert, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern.

Der Einfluss auf das Calciumsignal durch die Konzentration der Farbmoleküle im Stereozilium wurde durch die Berechnung des Verhältnisses $\Delta F/F_0$ berücksichtigt ($\Delta F = F - F_0$). Das bedeutet, dass die Ruhefluoreszenzintensität F_0 von allen anderen erhaltenen Intensitätswerten F abgezogen und anschließend in Beziehung zu F_0 gesetzt wurde. Dies ist sinnvoll, da ein unterschiedliches F_0 bedeuten könnte, dass eine unterschiedliche Anzahl von Farbmolekülen vorhanden gewesen war, die angeregt werden konnten. Infolgedessen würde eine niedriger erreichte Fluoreszenzsignalintensität nicht unbedingt auf einen geringeren Calciumioneneintritt beruhen, sondern auf weniger anregbare Farbmoleküle. Um diesen Unterschied auszugleichen und um einen realen Vergleich der Signalintensitäten zu ermöglichen, wurde das Verhältnis berechnet.

4.3. Mechanische Stabilität der Zellen

Einen zusätzlichen Einflussfaktor auf das Experiment und den Signalverlauf bildet eine durch den Flüssigkeitsstrom zur Auslenkung der Stereozilien hervorgerufene Bewegung der Zellen (Drift). Die für die Experimente ausgesuchten Zellen hafteten sehr gut auf den mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern. Da keine optisch wahrnehmbare Bewegung feststellbar gewesen war und der Signalverlauf keine großen auf eine Bewegung der Zellen zurückführende Schwankungen aufwies, wurde von einem untergeordneten Einfluss der Zelldrift ausgegangen. Das für die Haftung der Zellen verwendete Poly-L-Lysin (0,1%) war in der verwendeten Konzentration nicht toxisch (Kotecha und Richardson, 1994).

4.4. Calciumhomöostase

Zytoplasmatisches Calcium ist wesentlich am Transduktionsprozess beteiligt. In einer intakten Cochlea führt eine auditorische Tonstimulation zu einer Abscherung des Stereozilienbündels in exzitatorischer Richtung. Dabei öffnen sich die Transduktionskanäle und positiv geladene Ionen wie Kalium und Calcium (Corey und Hudspeth, 1979b; Ohmori 1985) treten entlang des elektrischen Gradienten in die Zelle ein. Die Calciumionen initiieren unter anderem den Adaptationsprozess (Crawford *et al.*, 1989; Kimitsuki und Ohmori, 1992), welcher durch Puffer verlangsamt werden kann (Ricci und Fettiplace, 1997). Puffer spielen bei der Regelung der intrazellulären Calciumkonzentration eine entscheidende Rolle und sind unterschiedlich in den Stereozilien und im Zellkörper verteilt. Calciumpuffer der ÄHZ sind unter anderem Calmodulin, welches sowohl in den Stereozilien als auch im Zellkörper vorkommt (Slepecky und Ulfendahl, 1993), Parvalbumin β , welches große Übereinstimmungen mit Oncomodulin aufweist (Thalmann *et al.*, 1995) und Calbindin (Dechesne *et al.*, 1988; Oberholtzer *et al.*, 1988), welches nur im Zellkörper nachzuweisen ist (Sakaguchi *et al.*, 1997). Calbindin weist im Gegensatz zu Parvalbumin β eine tonotopische Organisation auf; es lässt sich basal eine höhere Konzentrationen

als apikal nachweisen (Hackney *et al.*, 2003). Diese Puffer verhindern nicht nur Überschneidungen zwischen den unterschiedlichen Signalwegen, sondern sie begrenzen, schwächen und verlangsamen auch die calciuminduzierten Fluoreszenzsignale (Hall *et al.*, 1997; Lumpkin und Hudspeth, 1998) und beeinflussen so den Anstieg und die Höhe der Fluoreszenzintensitätskurve während der Stimulation.

Der in den hier dargestellten Experimenten verwendete Farbstoff fluo-3 ist ebenfalls ein Teil des intrazellulären Puffersystems. Er konkurriert mit den anderen Puffern, um die eintretenden Calciumionen und nimmt dadurch Einfluss auf den Fluoreszenzintensitätskurvenverlauf während der positiven Stimulation. Das heißt, dass die Schnelligkeit des Calciumfluoreszenzsignalanstiegs von den Eigenschaften und Konzentrationen der Puffer abhängt. Da die in der Zelle vorhandenen Puffer abhängig von ihrer K_d^1 , teilweise vor fluo-3 gesättigt werden, beeinflussen sie vor allem die Steigung der Signalkurve (Steigung wird kleiner). Auch in anderen Experimenten wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzsignalausbreitung von intrazellulären Puffern nachgewiesen (Lumpkin und Hudspeth, 1998).

Die intrazelluläre Konzentration von fluo-3 in den hier gezeigten Experimenten ist unbekannt, da die Versuche ohne intrazelluläre Ableitung (Patch-Clamp-Methode) durchgeführt wurden. Es lassen sich deswegen keine genauen Angaben darüber machen, inwieweit die Konzentration von fluo-3 die Ergebnisse beeinflusst hat. Durch die Verwendung der Patch-Clamp-Technik würden die intrazellulären Bedingungen verändert werden und damit die Pufferkonzentrationen, u. a. auch die von fluo-3. Aufgrund der konstanten Pufferkonzentrationen wird so in allen drei Teilabschnitten der Experimente immer ein gleich bleibender Einfluss angenommen, so dass die hervorgerufenen Veränderungen nicht auf die Puffer zurückgeführt werden können, d. h. selbst wenn fluo-3 die Ausbreitung des Fluoreszenzsignals verlangsamen würde, würde dies in allen drei Untersuchungseinheiten der Versuche gleichermaßen geschehen.

¹ Die K_d entspricht der Bindungskonstante für Calcium und beträgt z. B. für Calbindin K_d 0,2-0,5 μM (Hackney *et al.*, 2003) und für fluo-3 K_d 0,39 μM (Molecular Probes Handbuch).

4.5. Fluoreszenzintensitätsverlauf

Der Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Stimulationsbeginn begann im mittleren Bereich (ROI 2) 1 - 2 Sekunden früher als im oberen Bereich (ROI 1) des Stereozilienbündels. Es war nicht möglich, eine höher aufgelöste Zeitangabe zu machen, da die Scanzeit pro Bild am LSM mit 983 ms keine größere zeitliche Auflösung zuließ. Würde man die Scanzeit verkürzen, dann würde sich die bildliche Auflösung zu sehr verschlechtern, und es wären deutlich weniger Details erkennbar.

Durch die Blockade der Transduktionskanäle verschwand der zeitliche Unterschied bezüglich des Beginns des calciumabhängigen Fluoreszenzsignals zwischen der ROI 1 und 2. Der Anstieg der Signalkurve, welcher in allen Regionen zeitgleich stattfand, war etwa um einen Faktor zehn langsamer. Nach der Auswaschung war der zeitlich unterschiedliche Intensitätsanstieg wieder erkennbar.

An der Entstehung dieses Calciumfluoreszenzsignals können mehrere Prozesse beteiligt gewesen sein. Bis jetzt sind neben den Transduktionskanälen noch die P2X-Rezeptorkanäle und die VGCCs bekannt, durch die Calciumionen eintreten könnten. Wie bereits erwähnt (Abs. 4.2) war in der Flüssigkeit, in welcher sich die Zellen während des Experimentes befanden, kein ATP enthalten, das die P2X-Rezeptorkanäle hätte aktivieren können. Die VGCCs hingegen könnten durchaus einen Einfluss auf die Entstehung des Fluoreszenzsignals gehabt haben, da sie bei Depolarisation aktiviert werden. Allerdings ist es aufgrund ihrer Lokalisation an der Basis der Zellen und der fehlenden Blockierung durch DHSM unwahrscheinlich, dass sie für den zeitlichen Unterschied bezüglich des gemessenen Fluoreszenzanstiegs verantwortlich gewesen sind. (Es kann von einem gleich bleibenden Einfluss in allen drei Telexperimenten ausgegangen werden.)

Die Amplitude der Fluoreszenzintensitätskurve zeigte sich während den Experimenten weitgehend unabhängig von der Blockade der Transduktionskanäle durch DHSM. Folgende Gründe könnten hierfür verantwortlich sein: Die optimale Stimulationsebene wird durch die Richtung, in der die Tip Links verlaufen, und die Gestalt des Stereozilienbündels

vorgegeben. Da die isolierten ÄHZ auf dem Objektträger fixiert waren und dieser parallel zur Mikroskopebene lag, ist eine orthogonale Stimulation des Stereozilienbündels nicht möglich (Meyer *et al.*, 2005). Es ist daher schwierig zu verifizieren, wie viele Stereozilien der einzelnen Zellen stimuliert wurden, was sich wiederum in einer unterschiedlichen Amplitude innerhalb eines Experimentes und zwischen den Experimenten widerspiegelt, weshalb auch der Unterschied nicht signifikant war. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Amplitude im gezeigten Beispiel (Abb. 3.2) in der ROI 2 kleiner war als in der ROI 1. Das hängt sowohl mit der Platzierung der ROIs als auch mit der Berechnung des Verhältnisses $\Delta F/F_0$ zusammen. In der ROI 2, die im mittleren Teil des längsten Stereoziliums positioniert ist, war in Ruhe eine höhere Fluoreszenzintensität (F_{0b}) als in der ROI 1 (F_{0a}) zu erkennen. Befänden sich dort auch die Transduktionskanäle, könnte das Signal dort aufgrund der zum Teil offen stehenden Kanäle stärker gewesen sein. Die zwei ROIs wiesen dieselbe Größe auf, dennoch wurden in der ROI 2 zahlenmäßig mehr Stereozilien erfasst als in der ROI 1, was bedeutet, dass im Durchschnitt mehr Fluoreszenzintensität registriert und gemittelt wurde als in der ROI 1, wo sich nur ein Stereozilium befand. Da in den Kurven das Verhältnis $\Delta F/F_{0a/b}$ gegen die Zeit aufgetragen ist, ergeben sich für ein größeres F_{0b} kleinere Werte bzw. eine kleinere Amplitude.

Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die zeitliche Verzögerung des Fluoreszenzintensitätsanstiegs auf die Blockade der Transduktionskanäle mit DHSM zurückzuführen sind, da DHSM ausschließlich diese Kanäle blockierte. Die Amplitude der Fluoreszenzintensität dagegen war unabhängig von dem Öffnungszustand der Transduktionskanäle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Eintritt der Calciumionen durch die Transduktionskanäle deutlich schneller ist als über die unspezifische Membranpassage.

4.6. Lokalisation der Transduktionskanäle und der Tip links

Die Suche nach der genauen Lokalisation der Transduktionskanäle erstreckt sich über einen langen Zeitraum. Ohmori führte bereits 1988 Experimente mit fura-2 angefärbten Zellen durch und kam zu dem Schluss, dass sich die Kanäle in der Nähe der Stereozilienbasis befinden müssten. Dem widersprachen Ergebnisse, die die Transduktionskanäle in der Nähe der Stereozilienspitzen identifizierten (Hudspeth 1982; Jaramillo und Hudspeth, 1991; Denk *et al.*, 1995; Lumpkin und Hudspeth, 1995). Denk und Kollegen (1995) nahmen darüber hinaus an, dass Tip Links an beiden Enden der Kanäle vorkommen. Dagegen demonstrierte Kachar (2000), dass die beiden Enden der Tip Links jeweils unterschiedlich in den Stereozilien verankert sind - das Ende welches zum längeren Stereozilium führt, teilt sich in zwei, das untere Ende in drei Äste auf (Kachar *et al.*, 2000). Dies führt eher zur Annahme, dass die Kanäle sich nicht an beiden Enden der Tip links befinden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstützen die Hypothese der Transduktionskanallokalisation an beiden Enden der Tip Links, wenn auch nur indirekt, da aufgrund der viel zu geringen Auflösung es nicht möglich war, Tip Links zu identifizieren. Die Fluoreszenzintensität nahm zuerst im mittleren Teil des längsten Stereoziliums und in der Nähe der Stereozilienspitzen der mittleren Stereozilienreihe zu. Es wird daher angenommen, dass die Calciumionen zuerst durch die Transduktionskanäle eintraten, die in diesen Regionen vermutet werden (Hudspeth, 1982; Denk *et al.*, 1995; Lumpkin und Hudspeth, 1995). Würde Calcium ausschließlich durch Diffusion durch die Zellmembran aufgenommen werden, so müsste die Fluoreszenzintensitätszunahme homogen im gesamten Stereozilium zu beobachten sein, was nicht der Fall war. Die Resultate, die durch die Blockade der Kanäle mit DHSM erzielt wurden, demonstrierten, dass vor allem der Eintritt von Calcium im mittleren Teil des längsten Stereoziliums sowie in der Spitzenregion der mittleren Stereozilienreihe verhindert wurde. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Transduktionskanäle weiter von der Spitze des längsten Stereoziliums

entfernt liegen. Da DHSM vor allem die Schnelligkeit des Calciumeintritts um etwa einen Faktor zehn reduzierte, ist davon auszugehen, dass der Eintritt der Calciumionen durch die mechanoelektrischen Kanäle viel weniger Zeit benötigt als bei unspezifischer Diffusion durch die Zellmembran.

Einen wichtigen Unterschied zwischen den hier dargestellten Ergebnissen und den oben erwähnten Erkenntnissen gibt es allerdings, denn die Anordnung der Stereozilien ist anders als die in Amphibien und Vögel (keine w – förmige Anordnung, sondern mehr gebündelt). Ebenso ist die Länge der einzelnen Stereozilienreihen je nach longitudinaler Position der Zelle in der Cochlea unterschiedlich. So ist es wahrscheinlich, dass die Tip Links des längsten Stereoziliums nicht in der Spitzennähe, wie es bei den mittleren und kleinsten Stereozilienreihen und den Nichtsäugetieren der Fall ist, sondern im mittleren Teil des Stereoziliums verankert sind. Von großer Bedeutung ist auch die Verbindung der Tip Links mit den Kanälen. Das Calciumfluoreszenzsignal startete im mittleren Teil des längsten Stereoziliums. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich die Transduktionskanäle beim längsten Stereozilium im mittleren Teil, also in der Nähe der Anheftungspunkte der Tip Links befinden.

Ein weiterer ungeklärter Punkt hängt mit der Länge der Stereozilien zusammen, die je weiter die Zellen apikal in der Cochlea positioniert sind zunimmt (Wright, 1984). Es stellt sich die Frage, ob sich mit der Länge der Stereozilien auch die Position der Tip Links am längsten Stereozilium ändert oder ob sie immer im mittleren Teil angeheftet sind.

4.7. Reversibilität

Die Experimente waren reversibel, allerdings nicht vollständig, was bedeutet, dass die Schnelligkeit mit der das Maximum der Fluoreszenzintensität nach der Auswaschung von DHSM erreicht wurde im Gegensatz zum Kontrollexperiment reduziert war. Hierfür verantwortlich könnte eine geringe Restkonzentration (10 nM) von DHSM nach dessen Auswaschung in der extrazellulären Flüssigkeit sein, so dass eine geringfügige Anzahl der Transduktionskanäle sich

noch im blockierten Zustand befand. Desweiteren gibt es in den Stereozilien die Ca^{2+} -ATPase (Maurer *et al.*, 1992; Crouch und Schulte, 1995; Yamoah *et al.*, 1998), welche Calciumionen unter Energieverbrauch aus den Stereozilien hinaus transportiert. Da die extrazelluläre Flüssigkeit kein ATP enthielt, war es der Zelle bei sinkendem intrazellulärem ATP-Gehalt wahrscheinlich nicht möglich, die einströmende Menge an Calciumionen wieder hinaus zu befördern, was in einer Akkumulation von Calcium resultierte. Auf diese Weise führte die gestiegene intrazelluläre Calciumkonzentration zur Abnahme des chemischen und elektrischen Gradienten für Calcium und damit zur Verlangsamung des Fluoreszenzintensitätsanstiegs. Der zeitlich verzögerte Intensitätsanstieg war jedoch davon unbeeinflusst und kann daher nicht durch diese Mechanismen hervorgerufen worden sein.

4.8. Ausblick

In den hier durchgeführten Experimenten war es nicht möglich die Tip Links näher zu untersuchen, weil die Auflösung des LSM zu gering war. Ein möglicher Schritt bei der Suche nach der genaueren Lokalisation der Transduktionskanäle besteht in der Verbesserung der Auflösung, um so mehr Informationen über den Entstehungsort des Fluoreszenzsignals auch während der Stimulation zu bekommen. Dafür gäbe es mehrere Möglichkeiten. Zum Beispiel könnte man das Objektiv von 40x auf 63x ändern oder die 2-Photonen konfokalarbeitende Laser-Scanning-Mikroskopie verwenden. Letzteres verbessert die Auflösung nicht im eigentlichen Sinne, aber es macht das Bild schärfer und vermindert das Hintergrundrauschen bei einer gleichzeitig höheren Fluoreszenzsignalausbeute, wodurch Details besser erkennbar werden. Außerdem könnte versucht werden, die Line Scan Methode anzuwenden. Lumpkin und Hudspeth (1995) arbeiteten mit dieser Methode an den Haarsinneszellen der Schildkröte. Beim Meerschweinchen würde man das längste Stereozilium scannen. In der gescannten Ebene befände sich damit nur ein einziges Stereozilium, womit ein Bewegungsartefakt sehr ausgeprägt ausfallen kann. Dennoch sollte als

nächstes Ziel verfolgt werden, ein Line Scan während der Stimulation zu erstellen, womit detailliertere Informationen bezüglich des Signalentstehungsortes gewonnen werden können.

Zusätzlich könnte man noch den passiven Weg des Calciumioneneintritts in die Zelle untersuchen. Zum Beispiel könnte man die P2X-Rezeptoren mit Suramin (Meyer *et al.*, 1998) und die VGCCs mit Nimodipin blockieren (Bobbin *et al.*, 1990) und dadurch vollständige Sicherheit darüber gewinnen, dass sie nicht an der Signalentstehung oder dem schnellen Transduktionsmechanismus beteiligt sind.

5. Zusammenfassung

Calciumionen sind für die Funktion der äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) der Cochlea von großer Bedeutung. Ein intrazellulärer Konzentrationsanstieg freier Calciumionen hat Einfluss auf die Transmitterfreisetzung am basalen Pol der Sinneszelle, auf den Rezeptorstrom durch die mechanosensitiven Transduktionskanäle und auf die Mikromechanik des Zytoskeletts. Da bis heute nur wenige Informationen über die Calciumhomöostase in den Stereozilien von Säugetieren existieren, war das Ziel der hier vorgestellten Experimente, den Ursprung von calciumabhängigen Fluoreszenzsignalen im Stereozilienbündel der ÄHZ des Meerschweinchen zu untersuchen und somit weitere Informationen bezüglich der Lokalisation der Transduktionskanäle zu erhalten. Hierfür wurden isolierten ÄHZ mit dem Calciumindikator fluo-3 inkubiert und die intrazelluläre Calciumkonzentrationsänderung und die dadurch hervorgerufene Fluoreszenzintensitätsänderung während der positiven Deflektion der Stereozilien mittels Flüssigkeitsstrom bei offenen und durch das Aminoglykosid Dihydrostreptomycin (DHSM), welches auf offene Transduktionskanäle wirkt, blockierten Transduktionskanälen mittels eines konfokalarbeitenden Laser-Scanning-Mikroskopes aufgezeichnet. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitätskurven folgten einem exponentiellen Anstieg, wobei die durchschnittliche Zeitkonstante $\tau = 0.26 \pm 0.19$ s ($n = 6$) betrug. Durch die Applikation des Transduktionskanalblockers DHSM war der Anstieg deutlich verlangsamt ($\tau = 2.14 \pm 1.36$ s; $n = 6$). Diese Änderung war nach der Auswaschung von DHSM fast reversibel ($\tau = 0.75 \pm 0.24$ s; $n = 3$). Die maximal erreichte Amplitude der Fluoreszenzintensitätskurve erwies sich ebenso wie der Calciumkonzentrationsabfall im Stereozilienbündel (τ' (Kontrolle) = 3.15 ± 1.31 s; $n = 6$); τ' (DHSM) = 2.4 ± 0.84 s; $n = 5$; τ' (Washout) = 2.8 ± 0.99 s; $n = 3$) als unabhängig von der DHSM-Einwirkung.

Die Untersuchung der Fluoreszenzsignalentstehung in zwei unterschiedlichen Bereichen des längsten Stereoziliums zeigte einen zeitlich verzögerten (1-2 s) Fluoreszenzintensitätskurvensanstieg im apikalen Stereozilienabschnitt gegenüber dem früheren Anstieg im mittleren Teil des Stereoziliums. Dieser

Zeitunterschied bezüglich des Kurvenanstiegs verschwand nach DHSM-Applikation und konnte nach der Auswaschung von DHSM wieder beobachtet werden. Desweiteren wurde ein Fluoreszenzintensitätsanstieg in der Stereozilienspitzenregion der mittleren Reihe registriert.

Die Ergebnisse des Fluoreszenzintensitätsmusters führen zu der Vermutung, dass Calciumionen sowohl durch unspezifische Diffusion durch die Zellmembran als auch durch die Transduktionskanäle während der positiven Stimulation in das Stereozilienbündel gelangen können. Die Tatsache, dass die Blockade der Transduktionskanäle mit DHSM vor allem die Geschwindigkeit des Calciumeintritts reduziert erbringt den Nachweis, dass die Calciumpassage durch die Transduktionskanäle viel schneller ist, als durch die nicht spezifische Membranpassage.

Die Beobachtung des Fluoreszenzintensitätsanstiegs in der Spitzenregion der mittleren Reihe führt zu dem Schluss, dass die Calciumionen zuerst durch die Transduktionskanäle einströmen, die in dieser Region vermutet werden. Vor allem ist der zeitlich frühere Fluoreszenzintensitätsanstieg sowie das Verschwinden des Zeitunterschieds während DHSM-Einwirkung im mittleren Teil des längsten Stereoziliums ein erster Hinweis auf eine Lokalisation der Transduktionskanäle in dieser von der Stereozilienspitze ca. 3 µm entfernten Position.

6. Literatur

Altschuler R.A., Kachar B., Rubio J.A., Parakkal M.H., Fex J., 1985

Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea
Brain Res. 338; 1-11

Ashmore J.F., 1987

A fast motile response in guinea-pig outer hair cells. The cellular basis of the cochlear amplifier
J. Physiol. (Lond.) 388; 323-347

Ashmore J.F., Ohmori H., 1990

Control of intracellular calcium by ATP in isolated outer hair cells of the guinea-pig cochlea
J. Physiol. 428; 109-131

Assad J.A., Shepherd G.M.G., Corey D.P., 1991

Tip-Link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells
Neuron 7; 985-994

Békésy G. von, 1943

Über die Resonanzkurve und die Abklingzeit der verschiedenen Stellen der Schneckentrennwand
Akust. Z. 8; 66-76

Békésy G. von, 1944

Über die mechanische Frequenzanalyse in der Schnecke verschiedener Tiere
Akust. Z. 9; 3-11

Békésy G. von, 1947

The variation of the phase along the basilar membrane with sinusoidal vibrations
J. Acoust. Soc. Am. 19; 452-460

Békésy G. von, 1952

DC resting potentials inside the cochlear partition
J. Acoust. Soc. Am. 24; 72-76

Békésy G. von, 1960

Mc Graw-Hill, New York, 703-710

Belyantseva I.A., Adler H.J., Curi R., Frolenkov G.I., Kachar B., 2000

Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells
J. Neurosci. 20; 1-5

Bobbin R.P., Jastreboff P.J., Fallon M., Littman T., 1990

Nimodipine, an L-channel Ca²⁺ antagonist, reverses the negative summing potential recorded from the guinea pig cochlea
Hear. Res. 46; 277-87

Bosher S.K., Warren R.L., 1978

Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid
Nature 273; 377-378

Brown M.C., 1987

Morphology of labeled afferent fibers in the guinea pig cochlea
J. Comp. Neurol. 260; 591-604

Brownell W.E., 1984

Microscopic observation of cochlear hair cell motility
Scan. Electron. Microsc. 3; 1401-1406

Brownell W.E., Bader C.R., Bertrand D., de Ribaupierre Y., 1985

Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells
Science 227; 194-196

Corey D.P., Hudspeth A.J., 1979a

Response latency of vertebrate hair cells
Biophys. J. 26; 499-506

Corey D.P., Hudspeth A.J., 1979b

Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell
Nature 281; 675-677

Corey D.P., Hudspeth A.J., 1983a

Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells
J. Neurosci. 3; 962-976

Crawford A.C., Evans M.G., Fettiplace R., 1989

Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells
J. Physiol. 419; 405-434

Crouch J.J., Schulte B.A., 1995

Expression of plasma membrane Ca-ATPase in the adult and developing gerbil cochlea
Hear. Res. 92; 112-119

Dallos P., Harris D., 1978

Properties of auditory nerve responses in the absence of outer hair cells
J. Neurophysiol. 41; 365-383

Dallos P., Santos-Sacchi J., Flock Å., 1982

Intracellular recordings from cochlear outer hair cells
Science 218; 582-584

Dannhof B.J., Roth B., Bruns V., 1991

Length of hair cells as a measure of frequency representation in the mammalian inner ear?
Naturwissenschaften 78; 570-573

Davis H., 1958

A mechano-electrical theory of cochlear action
Ann. Otorhinolaryngol. 67; 789-801

Deschesne C.J., Thomasset M., 1988

Calbindin (CaBP-28kDa) appearance and distribution during development of the mouse inner ear
Dev. Brain Res. 40; 233-242

Denk W., Holt J.R., Shepherd G.M.G., Corey D.P., 1995

Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links.
Neuron 15; 1311-1321

De Rosier D.J., Tilney L.G., Egelman E., 1980

Actin in the inner ear: the remarkable structure of the stereocilium
Nature 287; 291-296

Dulon D., Zajic G., Schacht J., 1990

Increasing intracellular free calcium induces circumferential contractions in isolated cochlear outer hair cells
J. Neurosci. 10; 1388-1397

Eatock R.A., Corey D.P., Hudspeth A.J., 1987

Adaptation of mechanotransduction in hair cells of the bullfrog's sacculus
J. Neurosci. 7; 2821-2836

Eybalin M., Pujol R., 1985

Immunolocalization of choline acetyltransferase in 2 types of efferent synapses of the organ of Corti
C. R. Acad. Sci. III. 301; 679-684

Eybalin M., 1993

Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea
Physiol. Rev. 73; 309-373

Flock Å., Cheung H.C., 1977

Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells
J. Cell Biol. 75; 339-343

Frank G., Hemmert W., Gummer A.W., 1999

Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96; 4420-4425

Frank G., Kössl M., 1996

The acoustic two-tone distortions $2f_1-f_2$ and f_2-f_1 and their possible relation to changes in the operating point of the cochlear amplifier

Hear. Res. 98; 104-115

Frank G., Kössl M., 1997

Acoustical and electrical biasing of the cochlea partition. Effects on the acoustic two tone distortions f_2-f_1 and $2f_1-f_2$

Hear. Res. 113; 57-68

Frolenkov G.I., Belyantseva I.A., Kurc M., Mastroianni M.A., Kachar B., 1998

Cochlear outer hair cell electromotility can provide force for both low and high intensity distortion product otoacoustic emissions

Hear. Res. 126; 67-74

Fuchs P., 2002

The synaptic physiology of cochlear hair cells

Audiol. Neurootol. 7; 40-44

Furukawa M., Ikeda K., Takeuchi S., Oshima T., Kikuchi T., Takasaka T., 1996

Na^+, K^+ -ATPase activity in the cochlear lateral wall of the gerbil.

Neurosci. Lett. 9; 213; 165-168

Garcia J.A., Yee A.G., Gillespie P.G., Corey D.P., 1998

Localization of myosin I β near both ends of tip links in frog saccular hair cells

J. Neurosci. 18; 8637-8647

Gillespie P.G., Wagner M.C., Hudspeth A.J., 1993

Identification of a 120 kd hair-bundle myosin located near stereociliary tips

Neuron 11; 581-594

Gitter A.H., Zenner H.P., Frömter E., 1986

Membrane potential in ion channels in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea

I. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 48; 68-75

Glowatzki E., Ruppertsberg J.P., Zenner H.-P., Rüschi A., 1998

Mechanically and ATP-induced currents of mouse hair cells are independent and differentially blocked by α -tubocurarine

Neuropharmacology 36; 1269-1275

Griesinger C.B., Richards C.D., Ashmore J.F., 2004

Apical endocytosis in outer hair cells of the mammalian cochlea
Eur. J. Neurosci. 20; 41-50

Gummer A.W., Johnstone B.M., Armstrong N.J., 1981

Direct measurement of basilar membrane stiffness in the guinea pig
J. Acoust. Soc. Am. 70; 1298-1309

Hackney C.M., Furness D.N., 1985

Cross-links between stereocilia in the guinea pig cochlea
Hear. Res. 18; 177-1785

Hackney C.M., Mahendrasingam S., Jones E.M.C., Fettiplace R., 2003

The distribution of calcium buffering proteins in the turtle cochlea
J. Neurosci. 23; 4577-4589

Hacohen N., Assad J.A., Smith W.J., Corey D.P., 1989

Regulation of tension on hair-cell transduction channels: displacement and calcium dependence
J. Neurosci. 9; 3988-3997

Hall J.D., Betarbet S., Jaramillo F., 1997

Endogenous buffers limit spread of free calcium in hair cells
Biophys. J. 73; 1243-1252

**Hasson T., Gillespie P.G., Garcia J.A., MacDonald R.B., Zhao Y., Yee A.G.,
Mooseker M.S., Corey D.P., 1997**

Unconventional myosins inner-ear sensory epithelia
J. Cell Biol. 137; 1287-1307

Haugland R.P., 2002

Fluorescent Ca²⁺ Indicators Excited with visible Light
In: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products
Molecular Probes, Netherlands; 781-783

Holt J.R., Corey D.P., Eatock R.A., 1997

Mechanoelectrical transduction and adaptation in hair cells of the mouse utricle,
a low-frequency vestibular organ
J. Neurosci. 17; 8739-8748

Hoshino T., 1974

Relationship of the tectorial membrane to the organ of Corti. A scanning
electron microscopy study of cats and guinea pigs
Arch. Histol. Jpn. 37; 25-39

Hoshino T., 1977

Contact between the tectorial membrane and the cochlear sensory hairs in the human and the monkey

Arch. Otorhinolaryngol. 217; 53-60

Housley G.D., Greenwood D., Ashmore, 1992

Localization of cholinergic and purinergic receptors on outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea

Procc. R. Soc. Lond. 249; 265-273

Howard J., Hudspeth A.J., 1987

Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechano-electrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84; 3064-3068

Howard J., Roberts W.M., Hudspeth A.J., 1988a

Mechano-electrical transduction by hair cells

Annu. Rev. Biophys. Chem. 17; 99-124

Hudspeth A.J., Corey D.P., 1977

Sensitivity, polarity, and the conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74; 2407-2411

Hudspeth A.J., Jacobs R., 1979

Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76; 1506-1509

Hudspeth A.J., 1982

Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells

J. Neurosci. 2; 1-10

Ikeda K., Saito Y., Nishiyama A., Takasaka T., 1992

Na⁺-Ca²⁺ exchange in the isolated cochlea outer hair cells of the guinea pig studied by fluorescence image microscopy

Pflügers Arch. 420; 493-499

Issa N.P., Hudspeth A.J., 1994

Clustering of Ca²⁺ channels and Ca²⁺-activated K⁺ channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91; 7578-7582

Jaramillo F., Hudspeth A.J., 1991

Localization of the hair cell's transduction channels at the hair bundle's top by ionotropic application of a channel blocker

Neuron 7; 409-420

Kachar B., Brownell W. E., Altschuler R., Fex J., 1986

Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells
Nature 322; 365-368

Kachar B., Parakkal M., Kurc M., Thao Y., Gillespie P.G., 2000

High-resolution structure of hair-cell tip links
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97; 13336-13341

Kemp D.T., 1978

Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system
J. Acoust. Soc. Am. 64; 1386-1391

Khanna S.M., Tonndorf J., 1969

Middle ear power transfer
Arch. Klin. Exp. Ohren-, Nasen- Kehlkopfheilkd. 193, 78-88

Khanna S.M., Leonard D.G.B., 1982

Basilar membrane tuning in the cat cochlea
Science 215; 305-306

Kiang N.Y., Moxon E.C., Levine R.A., 1970

Auditory nerve activity in cats with normal and abnormal cochleas
In: Sensorineural Hearing Loss
Ciba Found. Symp.; 241-273

Kiang N.Y., Rho J. M., Northrop C.C., Liberman M.C., Ryugo D.K., 1982

Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cat
Science 217; 175-177

Kimitsuki T., Ohmori H., 1992

The effect of caged calcium release on the adaptation of the transduction current in chick hair cells
J. Physiol. 458; 27-40

Kimura R.S., 1966

Hairs of the cochlear sensory cells and their attachment to the tectorial membrane
Acta. Otolaryngol. 58; 390-408

Klinke R., 1986

Neurotransmission in the inner ear
Hear. Res. 22; 235-243

Konishi T., Salt A.N., Hamrick P.E., 1979

Effects of exposure to noise on ion movement in guinea pig cochlea
Hear. Res. 1; 325-342

Kotecha B., Richardson G.P., 1994

Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamycin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine.
Hear. Res. 73; 173-184

Kroese A.B., Das A., Hudspeth A.J., 1989

Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics
Hear. Res. 37; 203-217

Kros C.J., Crawford A.C., 1989

Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea
J. Physiol. 421; 263-291

Liberman M.C., Dodds L.W., 1984

Single-neuron labeling and cochlear pathology. III. Stereocilia damage and alterations of threshold tuning curves
Hear. Res. 16; 55-74

Liberman M.C., Zuo J., Guinan J.J., Jr., 2004

Otoacoustic emissions without somatic motility: can stereocilia mechanics drive the mammalian cochlea?
J. Acoust. Soc. Am. 116; 1649-1655

Lim D.J., 1972

Fine morphology of the tectorial membrane: Its relationship to the organ of Corti
Arch. Otolaryngol. 96; 199-215

Lim D.J., 1980

Cochlear anatomy related to cochlear micromechanics. A review
J. Acoust. Soc. Am. 67; 1686-1695

Lim D.J., 1986

Functional structure of the organ of Corti: a review
Hear. Res. 22; 117-146

Lim D.J., 1991

Scanning electron microscopic morphology of the ear,
In: Paparella M.M., Shumrick D.A., Gluckman J.L., Meyerhoff W.L. (eds)
Otolaryngology
W.B. Saunders Company, Philadelphia; 459-494

Lopez I., Ishiyama G., Acuna D., Ishiyama A., Baloh R.W., 2003

Immunolocalization of voltage-gated calcium channel α_1 subunits in the chinchilla cochlea
Cell Tissue Res. 313; 177-186

Lumpkin E.A., Hudspeth A.J., 1995

Detection of Ca^{2+} entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechano-electrical transduction in hair cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92; 10297-10301

Lumpkin E.A., Hudspeth A.J., 1998

Regulation of free Ca^{2+} concentration in hair-cell stereocilia
J. Neurosci. 18; 6300-6318

Maurer J., Mann W., Baggelmann M., 1992

Histochemical localization of calcium ATPase in the cochlea of the guinea pig
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 249; 176-180

Mees K., 1983

Ultrastructural localization of K^{+} -dependent, ouabain-sensitive NPPase (Na-K-ATPase) in the guinea pig inner ear
Acta. Otolaryngol. 95; 277-89

Melichar I., Syka J., 1987

Electrophysiological measurements of the stria vascularis potentials in vivo
Hear. Res. 25; 35-43

Meyer J., Furness D.N., Zenner H.-P., Hackney C.M., Gummer A.W., 1998

Evidence for opening of hair-cell transducer channels after tip-Link loss
J. Neurosci. 18; 6748-6756

Meyer J., Mack A.F., Gummer A.W., 2001

Pronounced infracuticular endocytosis in mammalian outer hair cells
Hear. Res. 161; 10-22

Meyer J., Preyer S., Hofmann S.I., Gummer A.W., 2005

Tonic mechanosensitivity of outer hair cells after loss of tip links
Hear. Res. 202; 97-113

Mockett B.G. Housley Thorne P.R., 1994

Fluorescence imaging of extracellular purinergic receptor sites and putative ecto-ATPase sites on isolated cochlear hair cells
Neurosci. 14; 6992-7007

Møller A.R., 1963

Transfer function of the middle ear
J. Acoust. Soc. Am. 35; 1526-1534

Nilsen K.E., Russell I.J., 1999

Timing of cochlea feedback: Spatial and temporal representation of a tone across the basilar membrane
Nat. Neurosci. 2; 642-648

Nilsen K.E., Russell I.J., 2000

The spatial and temporal representation of a tone on the guinea pig basilar membrane

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97; 11751-11758

Oberholtzer J.C., Buettger C., Summers M.C., Matschinsky F.M., 1988

The 28-kDa calbindin-D is a major calcium-binding protein in the basilar papilla of the chick

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 3387-3390

Offner F.F., Dallos P., Cheatham M.A., 1987

Positive endocochlear potential: mechanism of production by marginal cells of stria vascularis

Hear Res. 29; 117-24

Ohmori H., 1985

Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick

J. Physiol. 359; 189-217

Ohmori H., 1988

Mechanical stimulation and Fura-2 fluorescence in the hair bundle of dissociated hair cells of the chick

J. Physiol. 399; 115-137

Osborne H., Comis S.D., Pickles J.O., 1984

Morphology and cross-linkages of stereocilia in the guinea-pig labyrinth examined without the use of osmium as a fixative

Cell Tiss. Res. 237; 43-48

Ottersen O.P., Takumi Y., Matsubara A., Landsend A.S., Laake J.H., Usami S., 1999

Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear

Prog. Neurobiol. 54; 127-148

Pickles J.O., Comis S.D., Osborne M.P., 1984

Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction

Hear. Res. 15; 103-112

Preyer S., Hemmert W., Zenner H.-P., Gummer A. W., 1995

Abolition of the receptor potential response of isolated mammalian outer hair cells by hair-bundle treatment with elastase: a test of the tip-link hypothesis

Hear. Res. 89; 187-193

Probst R., Lonsbury-Martin B.L., Martin G.K., 1991

A review of otoacoustic emissions
J. Acoust. Soc. Am. 89; 2027-2066

Puel J.L.; Ruel J.; Guitton M.; Pujol R., 2002

The inner hair cell afferent/efferent synapses revisited: a basis for new therapeutic strategies
Adv. Otorhinolaryngol. 59; 124-130

Raphael Y., Altschuler R.A., 2003

Structure and innervation of the cochlea
Brain Res. 60; 397-422

Reiss G., Walkowiak W., Zenner H.-P., Plinkert P.K., Lehnhardt E., 1989

Das stato-akustische Organ.
Duphar-Verlag, Hannover

Ricci A.J., Fettiplace R., 1997

The effects of calcium buffering cyclic AMP on mechano-electrical transduction in turtle auditory hair cells
J. Physiol. 501; 111-124

Ricci A.J., Wu Y.C., Fettiplace R., 1998

The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory hair cells
J. Neurophysiol. 82; 2171-81

Roberts W.M., Jacobs R.A., Hudspeth A.J., 1990

Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells
J. Neurosci. 10; 3664-3684

Roberts W.M., 1993

Spatial calcium buffering in saccular hair cells
Nature 363; 74-76

Roberts W.M., 1994

Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells
J. Neurosci. 14; 3246-3262

Ruel J., Chen C., Pujol R., Bobbin R.P., Puel J.L., 1999

AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig
J. Physiol. 518; 667-680

Russell I.J., Richardson G.P., Cody A.R., 1986

Mechanosensitivity of mammalian auditory hair cells in vitro
Nature 321; 517-519

Russell I.J., Kössl M., 1992

Sensory transduction and frequency selectivity in the basal turn of the guinea-pig cochlea

Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 336; 317-324

Ryan A., Dallos P., 1975

Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold

Nature 253; 44-46

Ryback L.P., 1986

Drug Ototoxicity

Annu. Rev. Pharma. Toxicol. 26; 79-99

Sakaguchi N., Henzl M.T., Thalmann I., Thalmann R., Schulte B.A., 1998

Oncomodulin is expressed exclusively by outer hair cells in the organ of Corti

J. Histochem. Cytochem. 46; 29-39

Santos- Sacchi J.J., 1989

Asymmetrie in voltage-dependent movements of isolated outer hair cells from the organ of Corti

J. Neurosci. 9; 2954-2962

Schacht J., 1974

Interaction of neomycin with phosphoinositide metabolism in guinea pig inner ear and brain tissues

Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 83; 613-618

Schacht J., 1976

Biochemistry of neomycin ototoxicity

J. Acoust. Soc. Am. 59; 940-944

Sellick P.M., Patuzzi R., Johnstone B.M., 1982

Measurement of basilar membrane motion in the guinea pig using the Mössbauer technique

J. Acoust. Soc. Am. 72; 131-141

Silverstein H., 1972

A rapid protein test for inner ear fluid analysis

Trans. Am. Acad. Ophthal. Otolaryngol. 76; 1030-1031

Slepecky N.B., Ulfendahl M., 1993

Evidence for calcium-binding proteins and calcium-dependent regulatory proteins in sensory cells of the organ of Corti

Hear. Res. 70; 73-84

Smith C.A., Lowry O.H., Wu M.L., 1954

The electrolytes of the labyrinthine fluids

Laryngoscope 64; 141-153

Smith C.A., 1961

Innervation pattern of the cochlea. The internal hair cell
Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 70; 1-24

Spoendlin H., 1968

Ultrastructure and peripheral innervation pattern of the receptor in relation to the first coding of the acoustic message
In: Hearing Mechanisms in Vertebrates
Churchill, London; 89-125

Spoendlin H., 1972

Innervation densities of the cochlea
Acta. Otolaryngol. 73; 235-248

Spoendlin H., 1994

Strukturelle Organisation des Innenohrs
In: Naumann H.H., Helms J., Herberhold C., Kastenbauer E. (eds.) Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis, Thieme-Verlag, Stuttgart; 32-81

Ter Kuile E., 1900

Die Übertragung der Energie von der Grundmembran auf die Haarzellen
Arch. ges. Physiol. 79; 146-156

Thalmann I., Shibasaki O., Comegys T.H., Henzl M.T., Senarita M., Thalmann R., 1995

Detection of a beta-parvalbumin isoform in the mammalian inner ear
Biochem. Biophys. Res. Commun. 215; 142-147

Tilney L.G., De Rosier D.J., Mulroy M.J., 1980

The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlea hair cells
J. Cell Biol. 86; 244-259

Wake M., Anderson J., Takeno S., Mount R.J., Harrison R.V., 1996

Otoacoustic emission amplification after inner hair cell damage
Acta. Otolaryngol. 116; 374-381

Wright A., 1984

Dimensions of the cochlear stereocilia in man and the guinea pig
Hear. Res. 13; 89-98

Wu Y.C., Ricci A.J., Fettiplace R., 1999

Two components of transducer adaptation in auditory hair cells
J. Neurophysiol. 82; 2171-2181

Yamoah E.N., Lumpkin E.A., Dumont R.A., Smith P.J.S., Hudspeth A.J., Gillespie P.G., 1998

Plasmamembrane Ca^{2+} -ATPase extrudes Ca^{2+} from hair-cell stereocilia
J. Neurosci. 18; 610-62

Zenner H.P., Zimmermann U., Schmitt U., 1985

Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells
Hear. Res. 18; 127-133

Zenner H.P., 1986

Motile responses in outer hair cells
Hear. Res. 22; 83-90

Zenner H.P., 1986b

Aktive Bewegungen von Haarzellen: ein neuer Mechanismus beim Hörvorgang
HNO 34; 133-138

Zheng J., Shen W., He D.Z.Z., Long K.B., Madison L.D., Dallos P., 2000

Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells
Nature 405; 149-155

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich meinen Eltern und Holger Zobel danken, die mir während der Erstellung dieser Arbeit immer zur Seite standen.

Außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Anthony W. Gummer, für die Ermöglichung der Arbeit und vor allem für seine Unterstützung und Diskussion.

Bei Dr. Csaba Harasztosi, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und viel Zeit für die Erlernung und Ausübung der Methoden und auch für die Auswertung aufgebracht hat, möchte ich mich besonders bedanken.

Dank gebührt auch Manuela Nowotny und Anne Seeger für ihre freundliche Unterstützung bei der schriftlichen Umsetzung der Arbeit. Darüber hinaus haben mich Anne Seeger und Renate Lauf bei der Recherche und Beschaffung von Literatur hilfreich unterstützt. Außerdem danke ich Dr. Ernst Dalhoff für seine Unterstützung bezüglich technischer Fragen und Dr. Bernd Pritschow, der immer bereit war, etwas zu erklären.

8. Lebenslauf

Name:	Müller
Vorname:	Barbara Nam Ok
Geburtsort:	Seoul / Südkorea
Geburtsdatum:	09.01.1981
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Eltern:	Roland Müller (Technischer Angestellter) Sonja Müller (Hausfrau)
Geschwister:	Almut Müller (26 Jahre, Studentin) Samuel Müller (21 Jahre, Student)
Schulbildung:	
1987-1991	Johann-Bruecker-Grundschule Schönaich
1991-2000	Albert-Einstein-Gymnasium Böblingen
Schulabschluss:	Juli 2000 Abitur
Studium:	
	Beginn des Medizinstudiums im Oktober 2000 an der Eberhard Karls Universität Tübingen
zwischen 2000 und 2002	Krankenpflegepraktikum im Kreiskrankenhaus Böblingen
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
zwischen 2001-2005	Famulaturen in Holzgerlingen, Berchtesgaden, Böblingen, Tifers (Schweiz)
August 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.05.2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung