

Aus der Fachrichtung Biophysik  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Rolle von  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle  
und Modulation von BK-Kanälen  
in inneren Haarsinneszellen der Säugercochlea**

*Dissertation*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*

der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von

Barbara Maria Johanna Fell  
geb. am 14.10.1984 in Lebach



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Summary.....	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Aufbau und Funktion des Ohrs.....	5
3.2 Aufbau der Cochlea.....	6
3.3 Reizweiterleitung ab dem Innenohr.....	8
3.4 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle.....	10
3.4.1 L-Typ-Calciumkanäle.....	11
3.4.2 Aufbau spannungsgesteuerter Calciumkanäle.....	11
3.5 Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit.....	12
3.5.1 Vorkommen der verschiedenen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten.....	14
3.5.2 Funktion der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit.....	14
3.6 Calciumkanäle in inneren Haarsinneszellen.....	16
3.7 Die ducky- (du/du) Maus.....	17
3.8 Kaliumkanäle maturer innerer Haarsinneszellen.....	18
3.8.1 Der BK-Kanal.....	19
3.9 Die NO-cGMP-PKG-Signalkaskade.....	19
3.10 Fragestellungen der Arbeit.....	22
3.10.1 Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle der inneren Haarsinneszellen.....	22
3.10.2 Einfluss einer mutierten $\alpha_2\delta$ -Untereinheit auf innere Haarsinneszellen und das Hörvermögen.....	22
4 Material und Methoden.....	24
4.1 Mauslinien.....	24

4.2	Genotypisierung von ducky-Mäusen.....	24
4.3	Genotypisierung von Ca <sub>v</sub> 1.3-defizienten Mäusen.....	27
4.4	Lösungen.....	27
4.5	Präparation der Cochlea.....	28
4.6	Transkriptanalyse an Haarsinneszellen.....	29
4.6.1	Gewinnung von Haarsinneszellen.....	29
4.6.2	Umschreibung der RNA in cDNA.....	29
4.6.3	Transkriptanalyse mit quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	30
4.7	Hörmessungen.....	31
4.7.1	ABR-Messungen.....	31
4.7.2	DPOAE-Messungen.....	31
4.8	Durchführung der Patch-Clamp-Messungen.....	32
4.8.1	Effekt von 8-Bromo-cGMP auf BK-Ströme der inneren Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen.....	32
4.8.2	Barium- und Calciumströme der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	33
4.8.3	Kaliumströme der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	33
4.8.4	Allgemeiner Messaufbau.....	34
4.8.5	Auswertung der Patch-Clamp-Daten.....	34
4.9	Immunhistochemie.....	37
4.9.1	Fixierung.....	37
4.9.2	Immunfärbung.....	38
4.9.3	Auswertung.....	41
4.10	Dot-Blot-Analyse zur Charakterisierung des α <sub>2</sub> δ <sub>2</sub> -Antikörpers.....	42
4.10.1	Software.....	42
4.11	Statistik.....	43
5	Ergebnisse I: Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle.....	44
5.1	Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle maturer innerer Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen.....	44

6	Ergebnisse II: $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen.....	51
6.1	$\alpha_2\delta$ -Transkripte in inneren und äußeren Haarsinneszellen der Maus (Prof. Dr. Gerald Obermair).....	51
6.2	Hörmessungen an ducky-Mäusen (Prof. Dr. Bernhard Schick, Dr. Julia Dlugaiczky, Dipl.-Ing. Dietmar Hecker).....	53
6.2.1	ABR-Messungen.....	53
6.2.2	DPOAE-Messungen.....	54
6.3	Charakterisierung der Calciumkanäle in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	55
6.3.1	Lokalisation von Ribbon-Synapsen und Calciumkanälen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	56
6.3.2	Eigenschaften von Bariumströmen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	61
6.3.3	Eigenschaften von Calciumströmen in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	66
6.3.4	$Ca_v\beta_2$ -Untereinheit in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	71
6.3.5	Test eines $\alpha_2\delta$ -Antikörpers an inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	73
6.4	Postsynaptische Struktur unter inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	78
6.5	Eigenschaften der BK-Kanäle in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	81
6.5.1	Lokalisation von BK-Kanälen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	81
6.5.2	Eigenschaften von BK-Strömen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	82
6.6	Weitere Phänotypisierung der Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	85
6.6.1	Otoferlin in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	86
6.6.2	Zellkapazität der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	88
6.6.3	Morphologie apikaler äußerer Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	88
7	Diskussion I: Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf die BK-Kanäle.....	90
8	Diskussion II: $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen.....	93
8.1	$\alpha_2\delta$ -Unterheiten.....	93

8.2	Vorherrschende $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen.....	94
8.3	Hörvermögen von ducky-Mäusen.....	96
8.4	Spezifität eines $Ca_v1.3$ -Antikörpers zur Lokalisation von Calciumkanälen in inneren Haarsinneszellen von du/du-Mäusen.....	100
8.5	Ribbon-Synapsen-Anzahl und Calciumkanal-Expression sind in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse nicht verändert.....	101
8.6	Beeinflussung der Barium- und Calciumströme in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse.....	102
8.7	$Cav\beta 2$ ist auch in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse weiterhin am Kanalaufbau beteiligt.....	105
8.8	Veränderte postsynaptische Struktur der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	106
8.9	Otoferlin-Expression und Zellkapazität der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen.....	106
8.10	Die BK-Ströme sind in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse verändert.....	107
8.11	Wird das mutierte $\alpha_2\delta 2$ Protein in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen exprimiert und gelangt es an die Zellmembran?.....	108
8.12	Eignung der verwendeten ducky-Mauslinie und Ausblick.....	111
9	Literatur.....	113
10	Anhang I.....	127
10.1	Immunhistochemische Versuche: Negativkontrollen.....	127
11	Anhang II.....	130
11.1	Dank.....	130
11.2	Publikationen und Konferenzbeiträge.....	131

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Aufbau des Säugerohrs.....	6
Abbildung 3.2: Darstellung des Corti-Organs im Querschnitt.....	7
Abbildung 3.3: Einteilung spannungsgesteuerter Calciumkanäle.....	10
Abbildung 3.4: Aufbau eines spannungsgesteuerten Calciumkanals.....	12
Abbildung 3.5: Ionenkanäle und der NO-cGMP-PKG-Signalweg in maturaen inneren Haarsinneszellen.....	20
Abbildung 4.1: Beispielgel einer du/du-Genotypisierung.....	26
Abbildung 5.1: Exemplarische BK-Ströme von IHZ bei Zugabe von 8-Bromo-cGMP in unterschiedlichen Calciumkonzentrationen.....	45
Abbildung 5.2: Calciumabhängige Änderung der BK-Ströme in IHZ durch 8-Bromo-cGMP. .	46
Abbildung 5.3: Parameter der BK-Ströme bei Zugabe von 8-Bromo-cGMP in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration.....	48
Abbildung 5.4: Effekt von 8-Bromo-cGMP auf die Aktivierungszeitkonstanten der BK-Ströme in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration....	49
Abbildung 6.1: Transkriptzahlen der $\alpha_2\delta_1$ bis $\alpha_2\delta_4$ -Untereinheiten in NMRI-Mäusen.....	52
Abbildung 6.2: ABR-Schwellen von du/du-Mäusen.....	54
Abbildung 6.3: DPOAE-Amplituden von du/du-Mäusen.....	55
Abbildung 6.4: Übersichtsaufnahme einer apikalen Windung des Corti-Organs.....	57
Abbildung 6.5: Spezifität des $Ca_v1.3$ -Antikörpers.....	58
Abbildung 6.6: Kolokalisation von $Ca_v1.3$ mit CtBP2/RIBEYE in IHZ der du/du-Maus.....	60
Abbildung 6.7: Exemplarische Bariumströme in IHZ der du/du-Maus.....	62
Abbildung 6.8: Strom-Spannungskurven der Bariumströme in IHZ von du/du-Mäusen.....	63
Abbildung 6.9: Parameter der Bariumströme in IHZ von du/du-Mäusen.....	64
Abbildung 6.10: Inaktivierung von Bariumströmen in IHZ von du/du-Mäusen.....	65
Abbildung 6.11: Exemplarische Calciumströme in IHZ der du/du-Maus.....	67
Abbildung 6.12: Strom-Spannungskurven der Calciumströme in IHZ von du/du-Mäusen....	68

---

Abbildung 6.13: Parameter der Calciumströme in IHZ von du/du-Mäusen.....	69
Abbildung 6.14: Inaktivierung von Calciumströmen in IHZ von du/du-Mäusen.....	70
Abbildung 6.15: Vorkommen der $Ca_v\beta 2$ -Untereinheit in IHZ der du/du-Maus.....	72
Abbildung 6.16: $\alpha_2\delta 2$ -Färbung in IHZ der du/du-Maus.....	74
Abbildung 6.17: Dot-Blot-Analyse des $\alpha_2\delta 2$ -Antikörper-Tests.....	75
Abbildung 6.18: $\alpha_2\delta 2$ -Antikörper in IHZ einer $Ca_v1.3$ -defizienten Maus.....	77
Abbildung 6.19: Postsynapsen-Struktur bei du/du-Mäusen, Beispiel 1.....	79
Abbildung 6.20: Postsynapsen-Struktur bei du/du-Mäusen, Beispiel 2.....	80
Abbildung 6.21: Verteilung des BK-Kanals in IHZ der du/du-Maus.....	82
Abbildung 6.22: Exemplarische Kaliumströme in IHZ der du/du-Maus.....	83
Abbildung 6.23: Aktivierungszeitkonstanten der BK-Ströme in IHZ von du/du-Mäusen.....	85
Abbildung 6.24: Otoferlin-Lokalisation in IHZ von du/du-Mäusen.....	87
Abbildung 6.25: Otoferlin-Färbung in der y-z-Ebene in IHZ der du/du-Maus.....	88
Abbildung 6.26: Morphologie der ÄHZ-Stereozilien von du/du-Mäusen.....	89
Abbildung 8.1: Schematischer Überblick über den olivocochleären Reflex der rechten Cochlea.....	97
Abbildung 8.2: Cochleäre Innervation in Abhängigkeit der Entwicklung.....	99
Abbildung 10.1: Negativkontrollen der immunhistochemischen Versuche.....	128

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: PCR-Programm für die du/du-Genotypisierung.....	25
Tabelle 4.2: Bandengrößen der du/du-Genotypisierung.....	26
Tabelle 4.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Hersteller.....	27
Tabelle 4.4: Verwendete TaqMan™ Expressions-Assays für die $\alpha_2\delta$ -Unterheiten.....	30
Tabelle 4.5: Zambonis Fixativ.....	38
Tabelle 4.6: Verwendete Puffer für immunhistochemische Färbungen.....	39
Tabelle 4.7: Verwendete primäre Antikörper.....	40
Tabelle 4.8: Verwendete sekundäre Antikörper.....	40
Tabelle 4.9: Verwendete Software und Hersteller.....	42
Tabelle 6.1: Eigenschaften der BK-Ströme in du/du-Mäusen und Zellkapazität.....	84

## Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
ABR	akustisch evozierte Potentiale ( <i>auditory brainstem responses</i> )
ÄHZ	Äußere Haarsinneszelle
AID	<i>α1 interaction domaine</i>
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
BK-Kanal	Spannungs- und calciumabhängiger Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
BP	Blockierpuffer
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ca <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Calciumkanal (gefolgt von einer Nummer)
CDI	Calciumabhängige Inaktivierung ( <i>calcium dependent inactivation</i> )
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
dB SPL	Dezibel <i>sound pressure level</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxiribonucleic acid</i> )
DPOAE	distorsiv evozierte otoakustische Emissionen ( <i>distortion product of otoacoustic emissions</i> )
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential ( <i>exicatory postsynaptoc potential</i> )
g	Leitfähigkeit

---

GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure ( <i><math>\gamma</math>-Aminobutyric acid</i> )
$g_{\max}$	maximale Leitfähigkeit eines Kanals
GPI-Anker	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT1	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase 1
HVA-Kanäle	bei hohen Spannungen aktivierbare Kanäle ( <i>high-voltage-activated</i> )
IF	Immunfluoreszenz
IHZ	Innere Haarsinneszelle
$I_{\max}$	maximaler Barium- oder Calciumeinstrom
<i>I-V</i> -Kurve	Strom-Spannungskurve
k	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ( <i>steepness</i> )
KCl	Kaliumchlorid
LJP	<i>Liquid Junction Potential</i>
LOC	Bündel der lateralen olivocochleären Efferenzen
LSM	Laser Scanning Mikroskop
LVA-Kanäle	bei niedrigen Spannungen aktivierbare Kanäle ( <i>low-voltage-activated</i> )
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIDAS	<i>metal ion dependent adhesion site</i>
MOC	Bündel der medialen olivocochleären Efferenzen
mRNA	messenger RNA ( <i>ribonucleic acid</i> )
mV	Millivolt
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>

---

nNOS	neuronale NO-Synthase
P2X	Kationen durchlässiger, purinerner Rezeptor
pA	Pikoampere
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pF	Pikofarrad
PFA	Paraformaldehyd
PKG	cGMP abhängige Proteinkinase
PP	Permeabilisierungspuffer
Pxy	Postnataler Tag xy
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RP	Reaktionspuffer
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEA-Cl	Tetraethylammoniumchlorid
V	Spannung
VDI	Spannungsabhängige Inaktivierung ( <i>voltage-dependent inactivation</i> )
V <sub>half</sub>	halbmaximale Aktivierungsspannung
V <sub>max</sub>	maximale Aktivierungsspannung
V <sub>rev</sub>	Umkehrpotential
v/v	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
VWA	von Willebrand Faktor A (ähnliche Domäne)
WP	Waschpuffer
$\alpha_1$	Ca <sub>v</sub> $\alpha_1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calciumkanals
$\alpha_2\delta$	Ca <sub>v</sub> $\alpha_2\delta$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calciumkanals

$\beta$	Ca <sub>v</sub> $\beta$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calciumkanals
$\tau$	Zeitkonstante der Aktivierung oder Inaktivierung

## 1 Zusammenfassung

Innere Haarsinneszellen (IHZ) sorgen für die Umwandlung eines Schallreizes in elektrische Erregung und eine Übertragung des Signals auf das erste Neuron der Hörbahn. Der spannungs- und calciumabhängige BK-Kalium-Kanal ist in inneren Haarsinneszellen für die schnelle Repolarisation der IHZ zuständig. Damit könnte der Kanal ein Angriffspunkt für den NO-cGMP-PKG-Signalweg sein, dessen Aktivierung die IHZ vor einem Lärmtrauma schützt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die BK-Ströme der IHZ mit dem nicht hydrolysierbaren Analogon des cGMPs, 8-Bromo-cGMP, und unter zwei verschiedenen Calciumkonzentrationen in der Intrazellulärlösung gemessen. Die freie Calciumkonzentration in IHZ ist nicht bekannt, da die Zellen eine hohe Konzentration verschiedener Calciumpuffer enthalten. BK-Ströme zeigten als Antwort auf das zugegebene 8-Bromo-cGMP eine Veränderung in Abhängigkeit von der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Eine Calciumkonzentration von 2 nM führte zu einer Stromerhöhung, bei 20 nM kam es jedoch zu einer Reduktion des Stroms. Zudem waren die Aktivierungszeitkonstanten der BK-Ströme bei 20 nM niedriger, d. h. der Kanal aktivierte schneller. Jedoch wurde dieser Effekt durch 8-Bromo-cGMP wieder umgekehrt. Insgesamt konnten sowohl bei 2 nM als auch bei 20 nM intrazellulärem Calcium Effekte von 8-Bromo-cGMP auf die BK-Ströme ausgemacht werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Kanal zur Stabilisierung der inneren Haarsinneszellen nach Lärmtrauma beiträgt. Während eines Lärmtraumas ist die Calciumkonzentration in den Zellen erhöht, was in diesen Experimenten bei Aktivierung der NO-cGMP-Kaskade zu reduzierten BK-Strömen führte. Es kann lediglich vermutet werden, dass der Kanal zwar phosphoryliert wird, sich hinter der protektiven Wirkung des NO-cGMP-Signalwegs jedoch ein anderer Mechanismus verbirgt.

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle bestehen aus einer porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und den akzessorischen Untereinheiten  $Ca_v\beta$  ( $\beta$ ) und  $Ca_v\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta$ ). Es existieren 10 verschiedene Gene der  $\alpha_1$ -Untereinheit;  $\beta$ - und  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit werden durch je vier Gene kodiert. Der Calciumeinstrom in IHZ verursacht die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat, der an der Postsynapse exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) und in deren Folge Aktionspotentiale auslöst. In IHZ setzt sich der Calciumkanal hauptsächlich aus der  $Ca_v1.3-\alpha_1$ -, der  $\beta_2$ -Untereinheit und bislang nicht identifizierten  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten

zusammen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche der vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten am Aufbau des Kanalkomplexes beteiligt sind. Quantitative Real-Time-PCR Experimente mit mRNA von Haarsinneszellen identifizierten die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit als vorherrschende Untereinheit. Nachfolgende Untersuchungen an IHZ von Mäusen mit Mutation der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit (ducky- oder du/du-Mäuse) sollten klären, ob diese Untereinheit in der Hörbahn, aber insbesondere auch in den IHZ eine Rolle spielt. Die Messung der Hörfunktion der du/du-Mäuse ergab eine um 18 dB SPL erhöhte Hörschwelle und damit einen moderaten Hörverlust. Unerwarteter Weise waren die DPOAE-Amplituden, ein Maß für die Funktionalität des cochleären Verstärkers und die Integrität der äußeren Haarsinneszellen, bei du/du-Mäusen gegenüber der Kontrolle nicht vermindert, sondern sogar erhöht. Die Hörschwellenerhöhung deutete auf ein Defizit in der aufsteigenden Hörbahn der du/du-Mäuse hin. Um dies weiter zu untersuchen, wurden Calcium- und Bariumströme in IHZ der apikalen Windung des Corti-Organ gemessen. Die maximalen Stromamplituden waren bei den du/du-Mäusen um etwa 30 % reduziert und die Strom-Spannungskurven um 7 mV und 5 mV Richtung positiver Potentiale verschoben. Jedoch konnte auch bei den du/du-Mäusen die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit immunhistochemisch an der Zellmembran nachgewiesen werden. Da in Purkinje-Zellen des Cerebellums von du/du-Mäusen ein verkürztes  $\alpha_2\delta_2$ -Protein gebildet wird, ist nicht auszuschließen, dass dies auch in den IHZ der Fall ist. Das verkürzte Protein würde entgegen jeder Vermutung die Zellmembran erreichen und eventuell auch Einfluss auf den Calciumstrom nehmen. Zudem wurde in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt, dass die postsynaptische Struktur in den du/du-Mäusen verändert ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit an der Organisation von Prä- und Postsynapse beteiligt ist. Weitere Untersuchungen der IHZ von du/du-Mäusen hinsichtlich Calciumkanal- und Ribbon-Synapsen-Verteilung, Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit und Otoferlin-Expression zeigten keine Unterschiede. Die Veränderung des Calciumstroms in IHZ und eine daraus wahrscheinlich resultierende verminderte Exozytoserate der IHZ könnten für den Hörphänotyp verantwortlich sein. Dennoch könnte das Fehlen der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit die Hörbahn noch an anderer Stelle beeinträchtigen, z. B. durch eine verminderte synaptische Funktion der die äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) hemmenden Efferenzen, was die erhöhten DPOAE-Amplituden erklären würde. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit eine wichtige Rolle beim Calciumkanal-Aufbau in IHZ spielt und das Fehlen des vollständigen  $\alpha_2\delta_2$ -Proteins einen Hörverlust nach sich zieht.

## 2 Summary

Mature inner hair cells (IHC) convert mechanical sound stimuli into electrical excitation which in turn is transmitted to the first neuron of the auditory pathway via chemical synapses. Voltage and calcium-activated BK channels in IHCs are the most important potassium channels for fast repolarization of the IHC and counteract sound-induced depolarization. Stimulation of the NO-cGMP-PKG signaling pathway via phosphorylation by PKGI exerts protecting effects on IHCs after noise trauma. It was hypothesized that BK channels are a possible target of this pathway. In this thesis I analyzed whether 8-bromo-cGMP, a non-hydrolysable analogue of cGMP, affects BK currents of IHCs at two different intracellular calcium concentrations. The free calcium concentration in IHCs is not known because IHCs possess high concentrations of different calcium buffers. Upon intracellular application of 3  $\mu$ M 8-bromo-cGMP, BK currents were increased at a calcium concentration of 2 nM, whereas a decrease of the BK currents was observed at a calcium concentration of 20 nM. Channel activation was faster at 20 nM versus 2 nM intracellular free calcium concentration, but this effect was reversed by application of 8-bromo-cGMP. In summary, at the two intracellular calcium concentrations tested, differential effects of 8-bromo-cGMP on BK-currents were detected, but it is unlikely that alterations of BK channels contribute to the stabilization of IHCs after noise trauma. Acoustic overstimulation results in calcium increase, but in this study BK currents were found to decrease upon activating the NO-cGMP-PKG signaling pathway at 20 nM intracellular calcium. Thus, although BK channels are likely being phosphorylated the protective effects of the NO-cGMP-PKG signaling pathway for the IHC are rather caused by other mechanisms.

Voltage-gated calcium channels are composed of an  $\alpha_1$  pore-forming subunit and the auxiliary subunits  $\text{Ca}_v\beta$  ( $\beta$ ) and  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta$ ). The  $\alpha_1$  subunit is encoded by 10 different genes whereas  $\beta$  and  $\alpha_2\delta$  are encoded by 4 genes each. Calcium currents trigger transmitter release in IHCs which in turn initiates the generation of excitatory postsynaptic potentials (EPSP) and action potentials. Calcium channels in IHCs are mainly composed of the subunits  $\text{Ca}_v1.3$  ( $\alpha_1$ ) and  $\beta_2$  and so far unidentified  $\alpha_2\delta$  subunits. The aim of this thesis was to define those  $\alpha_2\delta$  subunits that are part of IHC calcium channel complexes. Quantitative real time PCR experiments with hair cell-derived mRNAs identified  $\alpha_2\delta_2$  as the main  $\alpha_2\delta$  subunit

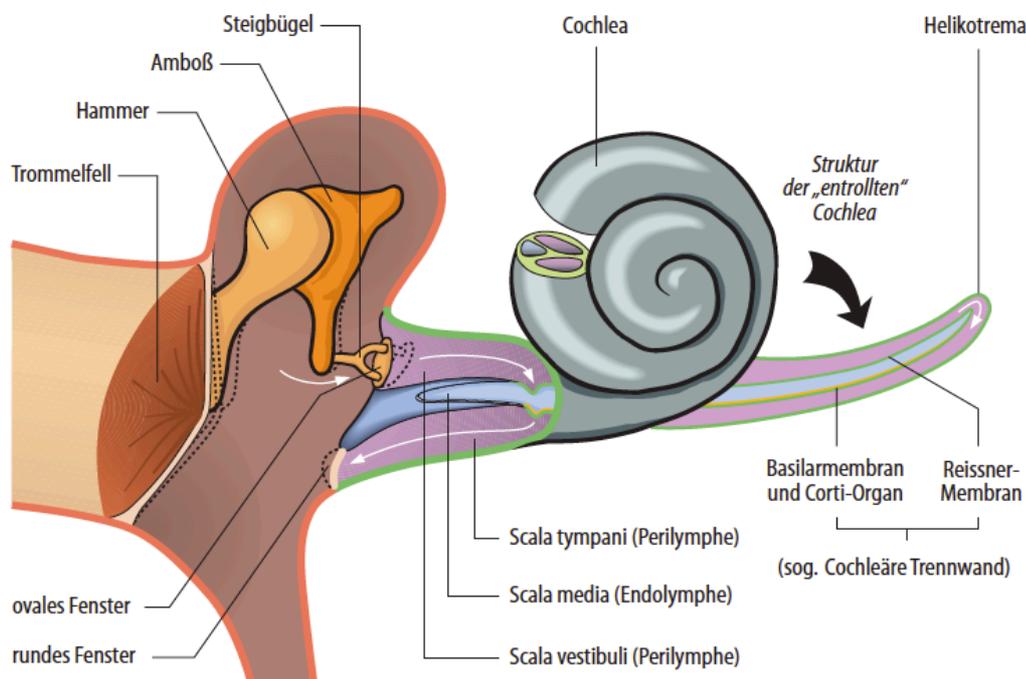
in inner and outer hair cells. We used a mouse model with a mutated  $\alpha_2\delta_2$  protein (duky or du/du mice) to further analyze hearing performance and IHC function. Hearing levels of ducky mice were increased by 18 dB SPL. Unexpectedly, DPOAE amplitudes, an objective indicator of the function of the cochlear amplifier and of outer hair cell (OHC) integrity, were increased in ducky mice. The increase of the hearing level indicated a defect in the ascending auditory pathway. Barium and calcium currents of mature apical IHCs of the cochlea were measured to further analyze what caused that hearing loss. Maximum current amplitudes were reduced by 30 % in ducky mice and the I-V-curves were shifted by 7 mV and 5 mV towards positive potentials. Surprisingly,  $\alpha_2\delta_2$ -immunopositive spots could still be detected at synaptic ribbons of ducky IHCs. Because a truncated  $\alpha_2\delta_2$  protein is being produced in cerebellar Purkinje cells, the existence of such a truncated protein in IHCs cannot be ruled out. Contrary to previous assumptions, this truncated protein apparently reached the plasma membrane and also affected calcium currents. Furthermore, the pattern of the postsynaptic protein PSD-95 was changed in ducky mice. Thus, the  $\alpha_2\delta_2$  subunit could be involved in the organization of pre- and postsynapses independent of its function in calcium current enhancement. Experiments regarding calcium channel and ribbon synapse distribution and expression of  $\beta_2$  and otoferlin revealed no differences in ducky mice. Decreased calcium currents likely causing reduced exocytosis could explain the hearing phenotype. Nevertheless, the  $\alpha_2\delta_2$  mutation could also influence the auditory pathway at different locations: for example, reduced inhibitory synaptic function of the efferent fibers may explain increased DPOAE amplitudes. In conclusion, the results of this thesis show that the  $\alpha_2\delta_2$  subunit plays a crucial role in the composition of IHC calcium channel complexes and that the ducky mutation of the  $\alpha_2\delta_2$  protein leads to a hearing deficit.

### 3 Einleitung

Das Ohr ist ein sensibles und komplexes Sinnesorgan. Es dient dem Menschen zum Erkennen und Lokalisieren von Gefahren, vor allem aber ist es für Erwerb und Aufrechterhaltung von Kommunikation durch Sprache unerlässlich. Eine Schädigung des Hörvermögens bedeutet einen hohen Verlust an Lebensqualität. Aufnahme und Verarbeitung von Schallsignalen müssen sehr empfindlich, schnell und zeitlich präzise ablaufen. Nur so ist es möglich, Geräusche zu detektieren, zu lokalisieren, Lautstärken und Tonhöhen zu unterscheiden sowie störende Schallquellen zu unterdrücken.

#### 3.1 Aufbau und Funktion des Ohrs

Das Säugerohr setzt sich aus Außen-, Mittel- und Innenohr zusammen. Hörmuschel und Gehörgang bilden das Außenohr. Das Mittelohr besteht aus Trommelfell, Paukenhöhle und der Gehörknöchelchen-Kette mit Hammer, Amboss und Steigbügel. Das Innenohr umfasst die Gehörschnecke (Cochlea) und das Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan). Schall wird über die Hörmuschel gesammelt und gelangt über den Gehörgang ans Trommelfell, welches Außen- und Mittelohr voneinander trennt (Abbildung 3.1). Am Trommelfell übertragen sich die Schwingungen auf die Gehörknöchelchen, welche wiederum über den Steigbügel mit dem Innenohr verbunden sind. Über das Mittelohr findet eine Impedanzanpassung des Schalls zwischen zwei unterschiedlichen Medien statt: von der in Außen- und Mittelohr vorhandenen Luft auf die sich in der Cochlea befindliche Flüssigkeit. Durch das Flächenverhältnis von Trommelfell und ovalem Fenster sowie der Hebelwirkung der Gehörknöchelchen-Kette erhöht sich der Druck am ovalen Fenster. Diese Anpassung verhindert die ansonsten stattfindende, fast vollständige Reflexion des Schalls (Geisler, 1998). Durch schallgekoppelte Auslenkung des Steigbügels, dessen Fußplatte über die Membran des ovalen Fensters mit der Cochlea verbunden ist, kommt es zur Übertragung des Schalls auf das Innenohr. Hier wird der Stimulus schließlich in elektrische Erregung umgesetzt, die über den Hörnerv an das Gehirn weitergeleitet wird (Schmidt et al., 2005).



**Abbildung 3.1: Aufbau des Säugerohrs**

Die schematische Abbildung zeigt das Mittelohr und einen Teil des Innenohrs. Die Cochlea ist zum besseren Verständnis teilweise entrollt dargestellt. Der über das Trommelfell weitergegebene Schallreiz wird durch die für die Impedanzanpassung zuständige Gehörknöchelchen-Kette an das Innenohr weitergegeben. Hier erfolgt die Umwandlung des mechanischen Reizes in elektrische Erregung und die Weiterleitung an das Gehirn (aus Schmidt et al., 2005).

### 3.2 Aufbau der Cochlea

Die Cochlea windet sich um einen Knochen (Modiolus) von basal nach apikal und teilt sich quer in drei flüssigkeitsgefüllte Kompartimente: Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani (Abbildung 3.1). Die Scala vestibuli wird von der mittig liegenden Scala media durch die Reissner-Membran getrennt. Die Basilarmembran separiert Scala media und Scala tympani voneinander. Scala tympani und Scala vestibuli enthalten kaliumarme Perilymphe, die Scala media hingegen kaliumreiche Endolymphe. Scala vestibuli und Scala tympani gehen am obersten Punkt der Cochlea (Helicotrema) ineinander über. Der Steigbügel ist



eingebettet der Basilarmembran auf. Die Stereozilien der ÄHZ ragen in die Tektorialmembran (TM). Die Reizweiterleitung erfolgt über die Spiralganglien-Neurone (SG) und weitere Schaltstellen im Gehirn bis zur Hörrinde. Die Pfeilerzellen (PZ) spannen den Cortischen Tunnel auf (CT), welcher wiederum die Schwingungseigenschaften der Basilarmembran beeinflusst. Eine Trennung der flüssigkeitsgefüllten Kompartimente Scala vestibuli und Scala media erfolgt durch die Reissner-Membran (RM). IS: innerer Sulcus, SV: Stria vascularis (modifiziert nach Ashmore et al., 2000).

Die IHZ werden direkt über Afferenzen des Typs I der Spiralganglien-Neuronen innerviert, eine efferente Modulation erfolgt über Fasern des LOC- (lateralen olivocochleären) Bündels. Die ÄHZ werden von Typ II Afferenzen und Efferenzen des medialen olivocochleären (MOC) Bündels innerviert (Berglund and Ryugo, 1987; Spoendlin, 1969; Übersichten in Guinan, 2006; Rusznák and Szucs, 2009).

### 3.3 Reizweiterleitung ab dem Innenohr

Der über das Mittelohr übertragene Schallreiz und die damit ausgelöste Schwingung des Steigbügels führt zur Entstehung einer Wanderwelle in der Scala vestibuli. Die Wanderwelle breitet sich von basal nach apikal hin aus. Sie erreicht an einer bestimmten Stelle der Basilarmembran ihre maximale Amplitude und bricht danach ab. Aufgrund der mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran ist dies abhängig von der Frequenz des Tons: Hochfrequente Töne erreichen die maximale Auslenkung an der Basis der Cochlea, tieffrequente dagegen am Apex (von Békésy, 1960). Auf diese Weise werden Reissner-Membran, Basilarmembran - mit den sich darauf befindenden Haarsinneszellen - und Tektorialmembran in Bewegung versetzt. Dies wiederum führt zu einer Scherbewegung zwischen Tektorial- und Basilarmembran. In der Folge werden die Stereozilien der ÄHZ in Richtung der größeren Stereozilien ausgelenkt. Diese Auslenkung bewirkt einen Zug auf die *Tip links*. An den Verankerungsstellen der *Tip links* kommt es durch bisher unbekannte Transduktionskanäle zum Einstrom von Kationen (Übersicht in Pickles and Corey, 1992). Diese Depolarisation führt in den ÄHZ zur Konformationsänderung des Motorproteins Prestin (Zheng et al., 2000) und damit zur Längenänderung der Zellen (Elektromotilität). Durch diesen Mechanismus verursachen die ÄHZ eine verstärkte Auslenkung der Basilarmembran. Der subtektoriale Flüssigkeitsstrom um die Stereozilien der IHZ und damit der adäquate Reiz dieser Zellen wird somit verstärkt (Brownell et al., 1985). Auf diese Weise können auch Töne mit niedrigen und mittleren Schalldruckpegeln gehört werden. So führt eine Deletion des Proteins Prestin in

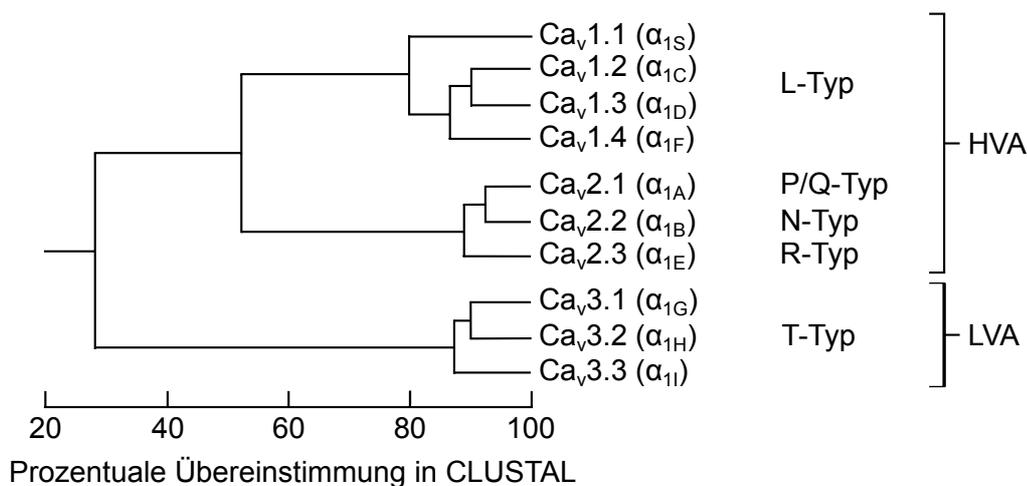
Mäusen zu einer um 40 bis 60 dB SPL verringerten Empfindlichkeit (Lieberman et al., 2002). In den IHZ öffnen sich als Folge der Depolarisation unter anderem schnell aktivierende, spannungsabhängige Calciumkanäle des Typs  $Ca_v1.3$  (Platzer et al., 2000). Das einströmende Calcium verursacht an den in direkter Nähe der Calciumkanäle liegenden Synapsen die Ausschüttung des Transmitters Glutamat (Fuchs et al., 2003; Puel, 1995; Ruel et al., 1999). In der Haarsinneszelle befindet sich ein spezieller Synapsen-Typ, die sogenannte Ribbon-Synapse (Sobkowicz et al., 1982). Diese Synapse bindet einen ständigen Vorrat von Vesikeln dicht an der präsynaptischen Membran, wodurch die Haarsinneszelle ständig reizabhängig Transmitter ausschütten kann (Übersicht in Nouvian et al., 2006). Bei Depolarisation öffnen sich zusätzlich zu den Calciumkanälen Kaliumkanäle: erst schnell aktivierende calcium- und spannungsabhängige BK-Kanäle (Kros et al., 1998), etwas zeitversetzt dann auch die spannungsabhängigen Kaliumkanäle  $K_v$ . Die KCNQ4-Kanäle aktivieren bereits unterhalb von -80 mV, besitzen eine geringe Leitfähigkeit und stabilisieren so das Ruhemembranpotential der IHZ. Alle drei Klassen von Kaliumkanälen tragen zur Repolarisation der Zellen bei (Housley et al., 2006; Marcotti et al., 2003a; Oliver et al., 2003).

Das freigesetzte Glutamat öffnet die an der Postsynapse liegenden Glutamat-Rezeptoren, was die Auslösung eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) und anschließenden Aktionspotentialen zur Folge hat (Hudspeth, 1989). Das EPSP wird über mehrere Schaltstellen zum auditorischen Kortex weitergeleitet, wo schließlich der Höreindruck entsteht.

Um die beschriebenen Funktionen erfüllen zu können, durchlaufen Haarsinneszellen einen Reifungsprozess. Bei Mäusen findet dieser Prozess in den ersten drei postnatalen Wochen statt. Die auffallendsten Reifungsschritte sind bis zum Tag des Hörbeginns am postnatalen Tag 12 (P12) abgeschlossen. Eine wichtige Eigenschaft der IHZ während dieser Phase ist ihre Spontanaktivität. Die IHZ generieren ohne Stimulation von außen Calcium-Aktionspotentiale und leiten dieses Signal über Transmitterfreisetzung an die Afferenzen der Spiralganglienneurone weiter. Dieser Mechanismus dient wahrscheinlich der Reifung der Hörbahn (Beutner and Moser, 2001; Glowatzki and Fuchs, 2002; Kros et al., 1998).

### 3.4 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle kommen in erregbaren Zellen vor. Sie vermitteln als Antwort auf Depolarisationen durch das einströmende Calcium vom Zelltyp abhängige, unterschiedliche Reaktionen: Kontraktion von Muskelzellen, Sekretion von Neurotransmittern oder Hormonen, Regulation der Genexpression, Erregungsübertragung zwischen Neuronen (Übersicht in Catterall et al., 2005). Abhängig von ihren Aktivierungseigenschaften werden Calciumkanäle in zwei Hauptgruppen unterteilt: bei niedrigen (LVA: *low voltage activated channels*) oder hohen Membranspannungen aktivierbare Kanäle (HVA: *high voltage activated channels*). Eine weitere Unterteilung erfahren sie anhand ihrer biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften. So werden bei den HVA-Kanälen weiter L-, N-, P/Q- und R-Typ-Kanäle unterschieden. LVA-Kanäle sind T-Typ-Kanäle (Übersicht in Arikath and Campbell, 2003; Catterall, 2000). Eine neue Nomenklatur teilt die Kanäle entsprechend der Gensequenz ihrer porenbildenden Untereinheit ( $Ca_v\alpha_1$ ) ein (Abbildung 3.3, Ertel et al., 2000).



**Abbildung 3.3: Einteilung spannungsgesteuerter Calciumkanäle**

Einteilung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle nach der Sequenzhomologie der membran-spannenden Segmente und der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit mit alter und neuer Nomenklatur (modifiziert nach Ertel et al., 2000).

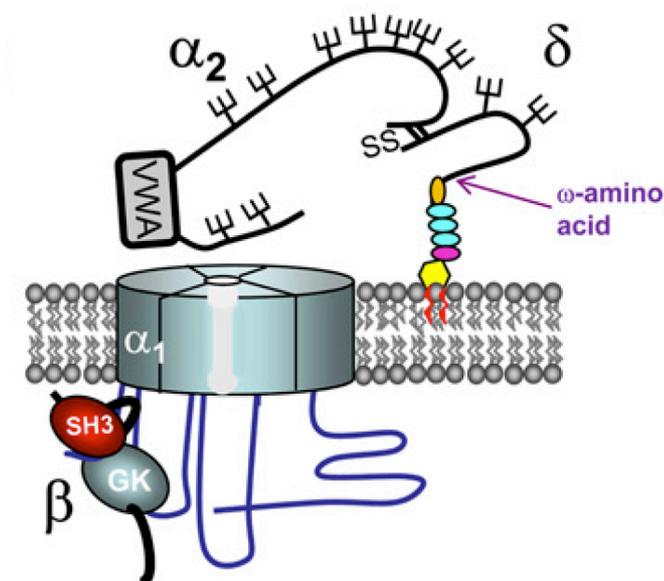
### 3.4.1 L-Typ-Calciumkanäle

Die Kanäle des L-Typs (L für *long lasting*) reagieren sensitiv auf Dihydropyridine (DHP). Hierin unterscheiden sich die L-Typ-Kanäle von den anderen spannungsabhängigen Calciumkanälen. L-Typ-Kanäle kommen hauptsächlich in Skelettmuskelzellen ( $Ca_v1.1$ ), sensorischen Zellen ( $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.4$ ), Neuronen ( $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ), Herzmuskelzellen ( $Ca_v1.2$ ), Zellen des Sinus- und AV-Knotens ( $Ca_v1.3$ ), glatten Muskelzellen ( $Ca_v1.2$ ) und endokrinen Zellen ( $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ) vor (Dolphin, 2009; Striessnig and Koschak, 2008). Die L-Typ-Kanäle zeigen untereinander ebenfalls spezifische Eigenschaften hinsichtlich ihrer Blockierung durch DHPs, Aktivierungskinetik, Aktivierungsspannung und calciumabhängiger Inaktivierung (Lipscombe et al., 2004).

### 3.4.2 Aufbau spannungsgesteuerter Calciumkanäle

Der Aufbau eines spannungsgesteuerten Calciumkanals wurde erstmalig anhand des Dihydropyridin-Rezeptors im Skelettmuskel beschrieben (Takahashi et al., 1987; Tanabe et al., 1987). Spannungsgesteuerte Calciumkanäle bestehen aus der porenbildenden  $Ca_v\alpha_1$  ( $\alpha_1$ )-Untereinheit sowie den akzessorischen Untereinheiten  $Ca_v\beta$  ( $\beta$ ) und  $Ca_v\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta$ ) (Abbildung 3.4; Übersichten in Arikath and Campbell, 2003; Catterall, 1995; Catterall et al., 2005). Bei manchen Kanälen kommt noch eine  $Ca_v\gamma$ -Untereinheit hinzu, die jedoch nur schwachen Einfluss auf die Eigenschaften des Calciumstroms hat (Übersichten in Dolphin, 2012; Kang and Campbell, 2003). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit bestimmt die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften des Kanals (z. B. Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, Einzelkanal-Leitfähigkeit, Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik) und enthält neben dem Spannungssensor Bindungsstellen für Pharmaka und *second messenger* (Dolphin, 2006; Ertel et al., 2000). Bisher sind bei Säugetieren 10 Gene dieser Untereinheit bekannt, die sich auf verschiedene Zelltypen verteilen und jeweils charakteristische Eigenschaften haben (Ertel et al., 2000; Abbildung 3.3). Die akzessorische  $\beta$ -Untereinheit bindet intrazellulär über die AID ( $\alpha_1$  *interaction domain*) an die  $\alpha_1$ -Untereinheit (Pragnell et al., 1994; De Waard et al., 1994). In Expressionssystemen führt die Koexpression der  $\alpha_1$ -Untereinheit zusammen mit der  $\beta$ -Untereinheit zu einer erhöhten Calciumstrom-Amplitude im Vergleich zur alleinigen  $\alpha_1$ -Expression. Hauptaufgaben der  $\beta$ -Untereinheit sind der Transport des Calciumkanals an die Zelloberfläche und die Modulation der Öffnungseigenschaften des Kanals (Bichet et al., 2000; Übersicht in Hidalgo and Neely, 2007). Kodiert wird die  $\beta$ -Untereinheit durch vier bekannte Gene (CACN-

*B1-CACNB4*), die für die Untereinheiten  $\beta$ 1- $\beta$ 4 kodieren. Die weitere Differenzierung der  $\beta$ -Untereinheiten erfolgt, wie auch bei den  $\alpha$ 1-Untereinheiten, durch Spleißvarianten (Übersicht in Buraei and Yang, 2010).



#### Abbildung 3.4: Aufbau eines spannungsgesteuerten Calciumkanals

Die Pore des Kanals besteht aus der  $\alpha_1$ -Untereinheit und bildet zusammen mit den akzessorischen Untereinheiten  $\beta$  und  $\alpha_2\delta$  einen spannungsgesteuerten Calciumkanal. Die  $\beta$ -Untereinheit befindet sich komplett intrazellulär während die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit mit Ausnahme des Membranankers hauptsächlich extrazellulär gelegen ist. Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit besitzt neben zahlreichen Glykosylierungsstellen eine von-Willebrandt-Faktor-A-ähnliche Domäne (VWA-Domäne).  $\alpha_2$ - und  $\delta$ -Untereinheit sind über Disulfidbrücken verbunden (aus Davies et al. 2010).

### 3.5 Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit

Für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit sind bei Säugetieren bisher vier Gene bekannt. Die erste  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ( $\alpha_2\delta_1$ ) wurde 1988 kloniert (Ellis et al., 1988), es folgten  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\alpha_2\delta_3$  und  $\alpha_2\delta_4$  (Gao et al., 2000; Klugbauer et al., 1999; Qin et al., 2002). Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit befindet sich hauptsächlich extrazellulär (Jay et al., 1991; Wisner et al., 1996). Die  $\delta$ -Untereinheit enthält eine Transmembrandomäne (Brickley et al., 1995; Jay et al., 1991; Wisner et al., 1996). Es gibt neuere Hinweise, dass der membranständige Teil der Untereinheiten  $\alpha_2\delta_1$ - $\alpha_2\delta_3$  einen GPI-Anker

bilden kann (Davies et al., 2010). Es konnte jedoch bisher nicht bewiesen werden, ob der  $\delta$ -Teil der  $\alpha_2\delta$ -Proteine nicht auch als Transmembran-Proteine existiert (Bauer et al., 2010; Davies et al., 2006, 2010). Über die genaue Interaktionsstelle der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit ist bisher wenig bekannt, jedoch gibt es Vermutungen, dass sich diese an dem extrazellulären Proteinteil befindet (Gurnett et al., 1997; Wiser et al., 1996). Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit stammt von einem Gen, wird jedoch posttranslational in  $\alpha_2$  und  $\delta$  gespalten, welche über Disulfidbrücken verbunden bleiben (Jay et al., 1991; De Jongh et al., 1990). Das  $\alpha_2\delta$ -Protein ist stark glykosyliert (Gurnett et al., 1996; Klugbauer et al., 1999; Marais et al., 2001), wobei die Hauptglykosylierungsstellen an der  $\alpha_2$ -Untereinheit zu finden sind. Eine weitere wichtige Struktur des  $\alpha_2\delta$ -Proteins ist die etwa 200 Aminosäuren umfassende *von Willebrand-Faktor-A*-ähnliche Domäne (VWA-Domäne), die ein MIDAS-Motiv (*metal ion dependent adhesion site*) enthält. Die VWA-Domäne befindet sich in der  $\alpha_2$ -Untereinheit und ist bei allen vier  $\alpha_2\delta$ -Proteinen vorhanden (Whittaker and Hynes, 2002). VWA-Domänen wurden in vielen Proteinen wie z. B. Integrinen oder extrazellulären Matrixproteinen nachgewiesen. Sie sind zuständig für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dabei wirkt das MIDAS-Motiv als Kationenbindungsstelle und kann darüber die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln (Whittaker and Hynes, 2002). Weiterhin enthalten die  $\alpha_2\delta$ -Proteine zwei *Cache*-Domänen, die über Homologie mit bakteriellen Chemotaxis-Rezeptoren identifiziert wurden (Anantharaman and Aravind, 2000).

Das als Antikonvulsivum entwickelte Gabapentin (2-(1(Aminomethyl)-Cyclohexyl)-Essigsäure) bindet an die Untereinheiten  $\alpha_2\delta_1$  und  $\alpha_2\delta_2$  (Gee et al., 1996; Gong et al., 2001; Marais et al., 2001). Gabapentin, bzw. der daraus weiterentwickelte Nachfolgewirkstoff Pregabalin, kommen bei der Behandlung von Epilepsie (Taylor et al., 2007), vor allem aber von neuropathischen Schmerzen (Harden, 1999; Moore et al., 2011) zum Einsatz. Für die Bindung des Gabapentins an  $\alpha_2\delta$  ist eine dreifache Folge der Aminosäure Arginin in der VWA-Domäne wichtig (Davies et al., 2006; Field et al., 2006; Hendrich et al., 2008). Wie bei den  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Untereinheiten existieren auch für die einzelnen  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten verschiedene Spleißvarianten; weitreichende Funktionsunterschiede wurden aber nicht gefunden (Angelotti and Hofmann, 1996; Hobom et al., 2000; Qin et al., 2002; Klugbauer et al., 2003).

In heterologen Expressionssystemen scheint es unerheblich zu sein, welche der vier  $\beta$ - oder  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten zusammen mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit exprimiert werden (Gurnett et al., 1996). *In vivo* zeigte sich jedoch, dass gewebespezifisch häufig bestimmte Kombinationen

von Calciumkanal-Untereinheiten vorkommen. So scheint beispielsweise in Purkinje-Zellen die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit ausschließlich in Kombination mit der  $Ca_v2.1$ -Pore und der  $\beta_4$ -Untereinheit vorhanden zu sein (Barclay et al., 2001).

### 3.5.1 Vorkommen der verschiedenen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten

Das Vorkommen der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten wurde anhand von Protein und mRNA-Nachweisen in verschiedenen humanen und murinen Geweben untersucht. Die  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit wird hauptsächlich in Muskelzellen, z. B. Skelett-, Herz- und glatten Muskelzellen exprimiert (Ellis et al., 1988; Marais et al., 2001). Aber auch in Gehirn und Spinalganglien-Neuronen konnte die  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Bauer et al., 2009; Cole et al., 2005; Ellis et al., 1988; Klugbauer et al., 1999; Marais et al., 2001; Newton et al., 2001). Darüber hinaus wurde anhand von quantitativer Real-Time-PCR die  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit als Hauptisoform in Hippocampus und Cortex identifiziert (Schlick et al., 2010). Die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit wurde in einigen Gehirnregionen detektiert, wobei sie besonders stark im Cerebellum exprimiert wird (Barclay et al., 2001; Cole et al., 2005; Hobom et al., 2000; Schlick et al., 2010). Aber auch in Herzgewebe konnte mRNA und Protein der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Gong et al., 2001; Klugbauer et al., 1999). Bei Mäusen beschränkt sich die Expression der  $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit auf das Gehirn. In Hypothalamus, Cortex, Hippocampus, Cerebellum und Caudate putamen ist die Expression am stärksten (Cole et al., 2005; Klugbauer et al., 1999; Schlick et al., 2010). Retina, Gehirn und Leber exprimieren die  $\alpha_2\delta_4$ -Untereinheit (Qin et al., 2002; De Sevilla Müller et al., 2013; Wycisk et al., 2006a, 2006b).

### 3.5.2 Funktion der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit

Die bisher gefundenen Aufgaben der  $\alpha_2\delta$ -Proteine sind vielseitig. Eine Funktion aller  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten ist die Beeinflussung des Calciumeinstroms in die Zelle. So führt eine Koexpression der  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Untereinheit mit der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zur Erhöhung der Stromdichte. Dies konnte sowohl in heterologen Expressionssystemen als auch in nativem Gewebe gezeigt werden (Andrade et al., 2009; Barclay et al., 2001; Cantí et al.; Felix et al., 1997; Gurnett et al., 1996; Hobom et al., 2000; Jones et al., 1998; Klugbauer et al., 1999; Shistik et al., 1995; Yasuda et al., 2004; Gao et al., 2000; Qin et al., 2002). Zudem kann eine Koexpression der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit die Strom-Spannungskurve (*I-V*-Kurve) des Calciumstroms um bis zu

10 mV in Richtung hyperpolarisierender Potentiale verschieben (Felix et al., 1997; Hobom et al., 2000; Platano et al., 2000; Singer et al., 1991). Jedoch wurde dieser Effekt nicht immer beobachtet (Bangalore et al., 1996; Shistik et al., 1995). Qin et al. (1998) fanden sogar einen Versatz der Strom-Spannungskurve Richtung depolarisierender Potentiale bei Expression der Ca<sub>v</sub>2.3-Pore mit der  $\alpha_2\delta$ 1-Untereinheit in *Xenopus*-Oocyten. Auch Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken des Calciumstroms können durch das  $\alpha_2\delta$ -Protein verändert werden. Bei heterologer Expression beschleunigt  $\alpha_2\delta$  sowohl die Aktivierung (Qin et al., 1998; Singer et al., 1991; Sipos et al., 2000) als auch die Inaktivierung des Calciumstroms (Felix et al., 1997; Hobom et al., 2000; Qin et al., 1998; Sipos et al., 2000).

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit für den Transport der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit an die Zellmembran zuständig ist und somit die Anzahl an Calciumkanälen in der Zellmembran erhöhen kann (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002; Cantí et al., 2005; Dickman et al., 2008; Hendrich et al., 2008; Hoppa et al., 2012; Saheki and Bargmann, 2009; Shistik et al., 1995; Ly et al., 2008). Für die Erhöhung der Stromamplitude könnte andererseits aber auch eine verringerte Degradation des Calciumkanals durch die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit verantwortlich sein (Bernstein and Jones, 2007). Das Vorkommen der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist nicht zwingend an das Vorhandensein einer  $\alpha_1$ -Untereinheit geknüpft. García et al. (2008) zeigten an Muskelfasern, dass die  $\alpha_2\delta$ 1-Untereinheit auch unabhängig von der  $\alpha_1$ -Untereinheit vorkommt.

Aktuell mehren sich Hinweise, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit eine Rolle bei der Synapsen-Morphologie unabhängig von ihrem Einfluss auf den Calciumkanal spielen kann. Beispielsweise ist das  $\alpha_2\delta$ 3-Homolog *straightjacket* bei der Taufliege *Drosophila* essentiell für die Ausprägung der richtigen Größe und Anzahl synaptischer Boutons an der motorischen Endplatte. Dieser Effekt prägt sich vor der Existenz funktionaler spannungsgesteuerter Calciumkanäle aus. Eine Mutation dieses Gens sorgt außerdem für eine reduzierte Transmitterausschüttung (Dickman et al., 2008; Ly et al., 2008; Kurshan et al., 2009). Auch an hippocampalen Neuronen-Kulturen von Ratten erhöhen die Untereinheiten  $\alpha_2\delta$ 1- $\alpha_2\delta$ 3 die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung als Antwort auf ein Aktionspotential (Hoppa et al., 2012). In der Hörbahn wurde gezeigt, dass bei einer Mutation der  $\alpha_2\delta$ 3-Untereinheit die Synapsen der Hörnervenfasern auf Zellen des ventralen cochleären Nucleus (VCN) deutlich in ihrer Größe reduziert sind (Pirone et al., in Revision).

Weiterhin wird eine Rolle der  $\alpha_2\delta$ -Proteine als Rezeptoren für Liganden diskutiert, da der Großteil des Proteins extrazellulär liegt und Protein-Protein-Interaktionsdomänen (VWA- und Cache-Domänen) enthält. So wurde  $\alpha_2\delta_1$  als neuronaler Thrombospondin-Rezeptor identifiziert (Eroglu et al., 2009). Thrombospondine spielen bei der Synaptogenese eine entscheidende Rolle (Übersicht in Risher and Eroglu, 2012).

### 3.6 Calciumkanäle in inneren Haarsinneszellen

Die  $Ca_v1.3$   $\alpha_1$ -Untereinheit ist die Haupt- $\alpha_1$ -Untereinheit der Haarsinneszellen und für die Hörfunktion unentbehrlich (Dou et al., 2004; Platzer et al., 2000). Diese Untereinheit zeichnet sich in Haarsinneszellen durch negative Aktivierungsspannungen und schnelle Aktivierungskinetik aus. Die Inaktivierung ist langsam und zudem nur schwach calcium- und spannungsabhängig (Cui et al., 2007; Grant and Fuchs, 2008; Michna et al., 2003; Platzer et al., 2000; Yang et al., 2006). Durch diese Eigenschaften ist ein länger andauernder Calciumeinstrom schon bei geringen Depolarisationen möglich (Johnson et al., 2005; Koschak et al., 2001; Marcotti et al., 2003b). Der  $Ca_v1.3$ -Kanal der IHZ reagiert im Gegensatz zu anderen Kanälen des L-Typs nur schwach auf DHP (Michna et al., 2003; Platzer et al., 2000), Phenylalkylamine und Benzothiazepine (Tarabova et al., 2007). Homozygote Mutationen in diesem Kanal führen bei Mäusen wie Menschen zu Taubheit und Arrhythmien (Baig et al., 2011; Dou et al., 2004; Platzer et al., 2000).

Auf Einzelzellebene maturer IHZ konnte hauptsächlich mRNA der  $\beta_2$ -Untereinheit amplifiziert werden (Neef et al., 2009). In bzw. an neonatalen Haarsinneszellen konnte sowohl mRNA als auch Protein aller vier  $\beta$ -Untereinheiten nachgewiesen werden. In IHZ war jedoch nur der mRNA-Nachweis der Untereinheiten  $\beta_2$  und  $\beta_3$  konsistent reproduzierbar (Kuhn et al., 2009). In einem Mausmodell mit extrakardialer Deletion der  $\beta_2$ -Untereinheit war der Calciumstrom in IHZ um 70 % reduziert und die Anzahl der Calciumkanäle verringert. Zudem waren Expression und Stromamplitude des calciumabhängigen Kaliumkanals BK herabgesetzt (Neef et al., 2009), was an das völlige Fehlen von BK-Kanälen bei  $Ca_v1.3$ -defizienten Tieren erinnert (Brandt et al., 2003). Maus-Mutanten mit Deletionen der  $\beta_3$ - oder  $\beta_4$ -Untereinheit haben normale ABR-Schwellen und damit keine Hördefizite, jedoch sowohl neonatal als auch adult leicht veränderte Calciumströme (Kuhn et al., 2009). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die  $\beta_2$ -Untereinheit die Haupt- $\beta$ -Untereinheit in IHZ ist, die Untereinheiten  $\beta_3$

und  $\beta 4$  jedoch einen Anteil an einem kleineren Teil der Calciumkanal-Komplexe in IHZ und ÄHZ haben.

Der Calciumstrom in IHZ wird folglich hauptsächlich von der  $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit im Komplex mit der  $\beta 2$ -Untereinheit getragen (Dou et al., 2004; Neef et al., 2009; Platzer et al., 2000). Über die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist dahingegen relativ wenig bekannt.

Mäuse mit einer Mutation in der  $\alpha_2\delta 3$ -Untereinheit haben eine um 5 dB SPL erhöhte Klick-ABR-Schwelle. Zudem ist in neonatalen IHZ die Bariumstromdichte um 19 % reduziert, was in maturen IHZ jedoch nicht mehr beobachtet werden konnte. Hingegen ist in maturen IHZ die gemittelte Strom-Spannungskurve der Bariumströme um etwa +4 mV in Richtung depolarisierender Potentiale versetzt (Pirone et al., in Revision). Bei dem bislang bekannten Mausmodell mit einer Mutation der  $\alpha_2\delta 4$ -Untereinheit besteht zusätzlich eine Mutation des *Cadherin23*-Gens, welches mit Taubheit assoziiert ist (Petit et al., 2001). Dennoch konnte bei den Mäusen mit mutierter  $\alpha_2\delta 4$ -Untereinheit im Vergleich zu den Mäusen ohne  $\alpha_2\delta 4$ -Mutation ein höherer Grad von Schwerhörigkeit festgestellt werden (Wycisk, PhD thesis, Zürich, 2006). Die bisherigen Erkenntnisse lassen daher keine konkreten Schlüsse auf die Haupt- $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in IHZ zu.

### 3.7 Die ducky- (du/du) Maus

Die in dieser Arbeit verwendete ducky- (du/du) Maus wurde erstmals 1955 beschrieben. Bei dieser Maus konnte ab einem Alter von 15 Tagen ein ataktischer Gang und reduzierte Größe im Vergleich zu den Geschwistertieren beobachtet werden (Snell, 1955). Die weitere Charakterisierung zeigte eine erhöhte Prädisposition für epileptische Anfälle, reduzierte Lebenserwartung und Fehlbildungen des zentralen Nervensystems, u. a. des Cerebellums (Meier, 1968). Barclay et al. (2001) konnten zeigen, dass die Mutation der ducky-Mäuse das *Cacna2d2*-Gen und damit auch die  $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calciumkanals betrifft. In dem mutierten Allel kommt es nach bisherigen Erkenntnissen zu einer größeren Umstellung der genetischen Information: Eine Duplikation mit Inversion der Exons 2-39 des *Cacna2d2*-Gens ist verbunden mit einer Deletion der Exons 4-39, die auch eine anschließende unbekannt Region betrifft. Die  $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit wird in den Purkinje-Zellen

des Cerebellums stark exprimiert (Barclay et al., 2001). Untersuchungen zeigten eine veränderte Morphologie dieser Zellen bei *du/du*-Mäusen: Dendritische Verzweigungen waren weniger komplex, die Dendritenbäume waren kürzer und erreichten nicht immer die äußerste Rindenschicht (Molekularschicht). Der Bariumstrom in diesen Zellen war um ungefähr 30 % reduziert, zeigte ansonsten aber keine Veränderungen (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002). Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen feuerten bei *du/du*-Mäusen die Purkinje-Zellen mit niedrigerer Rate und wiesen dabei stärkere Unregelmäßigkeiten auf (Donato et al., 2006). In den Purkinje-Zellen des Cerebellums scheint die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit folglich ein essentieller Teil der Calciumkanäle zu sein. Erst kürzlich wurde die erste humane Mutation im *CACNA2D2*-Gen mit Phänotyp entdeckt. Eine Punktmutation in dem Gen führt bei drei der vier Geschwisterkinder zu epileptischen Anfällen und starker geistiger Retardierung. Alle drei Betroffenen sind homozygot, das nicht betroffene Geschwisterkind und die Eltern sind heterozygot für die Mutation. Die Hörfunktion der betroffenen Kinder wurde nicht untersucht (Edvardson et al., 2013).

### 3.8 Kaliumkanäle maturer innerer Haarsinneszellen

Die Ionenkanalzusammensetzung der IHZ ändert sich im Verlauf der Entwicklung. Bei Mäusen wurde diese Entwicklung besonders intensiv untersucht. IHZ exprimieren ab Hörfunktionsbeginn (in Mäusen etwa der postnatale Tag 12; Ehret, 1985) zwei Kaliumkanäle, die vorher noch nicht vorhanden waren: den BK-Kanal (Kros et al., 1998; Langer et al., 2003; Marcotti et al., 2003a) und den KCNQ4-Kanal (Marcotti et al., 2003a; Oliver et al., 2003; Abbildung 3.5). Der BK-Kanal hat eine sehr große Leitfähigkeit, aktiviert sehr schnell und bei negativen Potentialen. Dadurch wird die Zelle nach Depolarisation sehr schnell wieder repolarisiert. Der KCNQ4-Kanal dient als Einwärtsgleichrichter, er hat eine geringe Leitfähigkeit, aktiviert aber schon ab Spannungen um die -120 mV. Auf diese Weise setzt der KCNQ4-Kanal, zusammen mit dem schon vor Hörfunktionsbeginn vorhandenen  $K_v$ -Kanal, die IHZ auf ein negatives Ruhemembranpotential von etwa -70 mV (Marcotti et al., 2003a; Kros and Crawford, 1990).

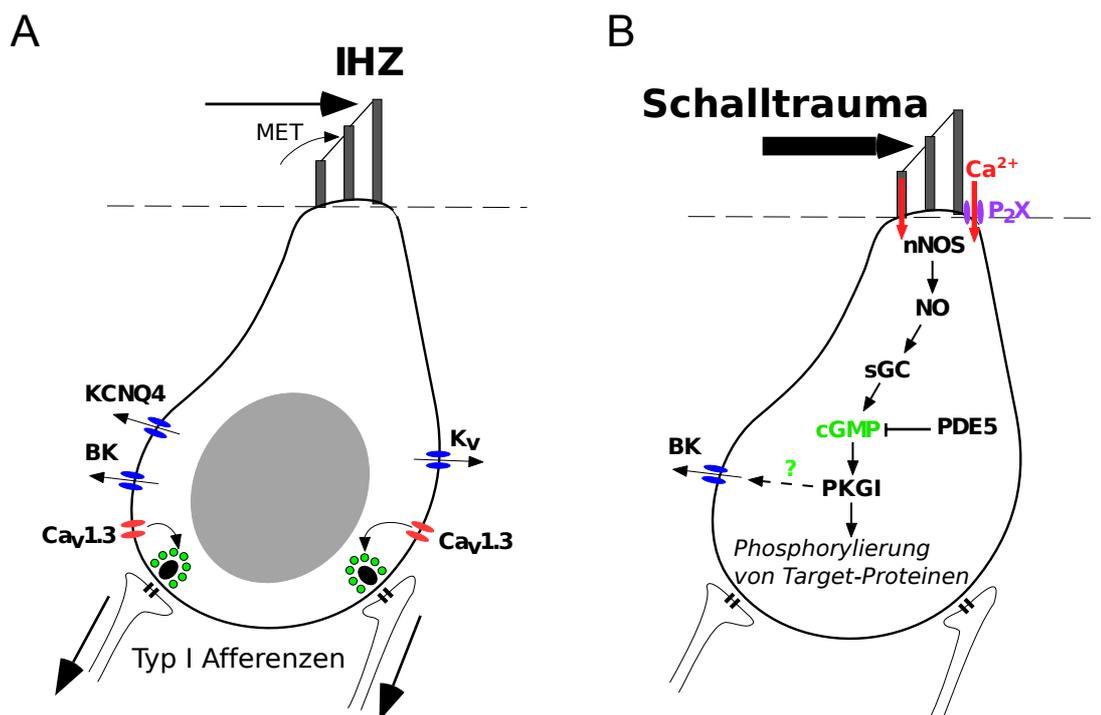
### 3.8.1 Der BK-Kanal

Der BK-Kanal mit Einzelkanal-Leitfähigkeiten von 100-300 pS aktiviert spannungs- und calciumabhängig (Übersicht in Cui et al., 2009). Die Aktivierungszeitkonstanten des BK-Kanals sind selbst spannungsabhängig. In IHZ liegen sie zwischen 0.3 und 0.6 ms und sind daher sehr schnell, wodurch BK-Kanäle maßgeblich das Rezeptorpotential formen und die IHZ repolarisieren. Durch ihre große Gesamtleitfähigkeit und die negative Aktivierung bestimmen BK-Kanäle außerdem die Geschwindigkeit der Änderung des Rezeptorpotentials (Kros et al., 1998). Es gibt Hinweise, dass die BK-Kanäle in IHZ über zwei Mechanismen aktiviert werden bzw. in zwei Populationen vorkommen: Ein Teil des Stroms kann durch Iberiotoxin inhibiert werden; ein anderer, kleinerer Strom-Anteil dagegen nicht (Brandt et al., 2007; Marcotti et al., 2004). Der Iberiotoxin-resistente Strom wird durch Calcium aktiviert, welches durch  $Ca_v1.3$ -Kanäle in die Zelle einströmt. Dieser Strom ist abhängig von extrazellulärem, jedoch unabhängig von intrazellulärem Calcium. Bei dem Iberiotoxin-sensitiven Anteil des BK-Stroms erfolgt eine Aktivierung durch interne Calciumspeicher, wodurch dieser Teilstrom unabhängig von extrazellulärem Calcium ist (Marcotti et al., 2004). Der Unterschied zwischen den Strömen könnte auf den Aufbau des Kanals aus verschiedenen Isoformen zurückzuführen sein. Der BK-Kanal besteht aus einer porenbildenden  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Modulierende Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ) könnten die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Iberiotoxin verursachen. So zeigten Meera et al. (2000), dass die  $\beta 4$ -Untereinheit dem Kanal eine Insensitivität gegenüber Iberiotoxin verleiht.

### 3.9 Die NO-cGMP-PKG-Signalkaskade

Das durch NO-Synthasen (NOS) gebildete Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Aktivator der löslichen Guanylylcyclase (sGC). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von GTP in das Signalmolekül cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat). Als cGMP-Zielstrukturen sind bisher Phosphodiesterasen (PDE), Zyklonukleotid-aktivierte Kanäle (CNG-Kanäle) und cGMP abhängige Proteinkinasen bekannt (PKG; Übersichten in Beavo and Brunton, 2002; Francis et al., 2010; Abbildung 3.5). Eine wichtige Funktion dieser Kaskade ist beispielsweise die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation im Herzen (Balligand and Cannon, 1997). Enzyme der NO-cGMP-PKG-Signalkaskade (neuronale NOS, sGC, PDE, PKGI) konnten auch in IHZ nachgewiesen werden (Gosepath et al., 1997; Heinrich et al., 2000;

Jaumann et al., 2012). Ein durch ATP induzierter Calciumeinstrom durch P2X-Rezeptoren am apikalen Pol der Haarzelle ist Auslöser der Signalkaskade (Shen et al., 2003, 2005), jedoch ist das Zielprotein in IHZ bisher unbekannt. In einigen Geweben konnte gezeigt werden, dass der BK-Kanal durch die NO-cGMP-PKG-Signalkaskade dahingehend moduliert wird, dass er bei calcium- und spannungsgesteuerter Aktivierung eine größere Leitfähigkeit aufweist. Diese Stimulation verursacht beispielsweise eine Relaxation der Gefäßmuskulatur und eine daraus resultierende Erweiterung mesenterialer Blutgefäße (Carrier et al., 1997; Lim et al., 2005; Lu et al., 1998). Phosphodiesterasen (PDE) hydrolysieren das cGMP und sorgen dadurch für einen Abbruch der Signalkaskade. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass die PDE5 in IHZ exprimiert wird. Vardenafil, ein Hemmstoff der PDE5, schützt die IHZ vor einem Schalltrauma, selbst wenn es erst nach dem Trauma verabreicht wird (Jaumann et al., 2012). Bisher konnte jedoch noch nicht geklärt werden, welches Zielprotein die cGMP abhängige Proteinkinase in IHZ besitzt.



**Abbildung 3.5: Ionenkanäle und der NO-cGMP-PKG-Signalweg in matten inneren Haarsinneszellen**

**A:** Das Abscheren der Stereozilien führt durch mechanoelektrische Transduktionskanäle (MET) zum Einstrom von Kationen. Die Depolarisation hat ein Öffnen der am basalen Zellpol lokalisierten, spannungsgesteuerten Ca<sub>v</sub>1.3-Kanäle zur Folge. Einströmendes Calcium sorgt für die Transmitterausschüttung an den Ribbonsynapsen. Die Kaliumkanäle BK, K<sub>v</sub> und KCNQ4

verursachen die Repolarisation und das sehr negative Ruhemembranpotential der IHZ. **B:** Durch ein Schalltrauma werden P2X-Rezeptoren der Haarzellen durch ATP, das aus zerstörten Zellen austritt, aktiviert und Calcium fließt in die Zelle. Die NO-cGMP-PKG-Signalkaskade wird in Gang gesetzt, wobei das Zielprotein der cGMP abhängigen Proteinkinase I noch unbekannt ist (PKGI). nNOS: neuronale NO-Synthase, sGC: lösliche Guanylylcyclase, PDE5: Phosphodiesterase, Isoform 5, IHZ: innere Haarsinneszelle (modifiziert nach Prof. Dr. Jutta Engel).

### 3.10 Fragestellungen der Arbeit

#### 3.10.1 Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle der inneren Haarsinneszellen

Bei Mäusen konnte eine protektive Rolle der NO-cGMP-PKG-Signalkaskade für das Hörvermögen und für den Phänotyp von Haarsinneszellen gezeigt werden. Eine Hemmung des cGMP-Abbaus schützt vor den Auswirkungen eines Schalltraumas, welches ansonsten zur Schädigung der IHZ und einem damit verbundenen Hörverlust führen würde (Jaumann et al., 2012). Das Zielprotein dieser Signalkaskade in IHZ ist bisher jedoch nicht bekannt. In anderen Geweben konnte bereits gezeigt werden, dass der BK-Kanal ein mögliches Zielprotein darstellt (Carrier et al., 1997; Lim et al., 2005; Lu et al., 1998). Um zu überprüfen, ob dies auch in den IHZ der Fall sein könnte, wurden elektrophysiologische Messungen von Ganzzell-BK-Strömen an maturaen IHZ durchgeführt. Zur Stimulation der Signalkaskade wurde das nicht hydrolysierbare cGMP-Analog 8-Bromo-cGMP in der intrazellulären Lösung verwendet. Die biophysikalischen Eigenschaften der BK-Ströme in diesen Ableitungen wurden mit denen von Kontrollmessungen verglichen.

#### 3.10.2 Einfluss einer mutierten $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit auf innere Haarsinneszellen und das Hörvermögen

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle bestehen aus der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und den akzessorischen Untereinheiten  $\beta$  und  $\alpha_2\delta$ . Von der  $\alpha_1$ -Untereinheit existieren 10 verschiedene Gene, für die  $\beta$  und  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten wurden jeweils vier Gene gefunden. Es ist von Zelltyp und teilweise subzellulärem Kompartiment abhängig, welche Kombination der Calciumkanal-Untereinheiten vorhanden ist. Die Hauptform der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calciumkanals in IHZ ist bereits bekannt: Mehr als 90 % des Calciumstroms fließen durch  $Ca_v1.3$ -Kanäle (Dou et al., 2004; Platzer et al., 2000). Als dominante, akzessorische  $\beta$ -Untereinheit wurde die  $\beta_2$ -Untereinheit identifiziert (Neef et al., 2009). Die Deletion der  $Ca_v1.3$ - oder der  $\beta_2$ -Untereinheit führt in beiden Mausmodellen zu Taubheit. Welche der vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in den IHZ eine entscheidende Rolle spielt, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden (Pirone et al., in Revision; Wycisk, PhD thesis, Zürich, 2006). Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss darüber bringen, welche  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in IHZ vorkommen und welche Auswirkungen eine Mutation der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit auf

die IHZ, aber auch das Hörvermögen insgesamt hat. Hierzu wurden Transkriptanalysen der mRNA aller vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten von IHZ und ÄHZ durchgeführt. Des Weiteren wurden Mäuse mit einer Spontanmutation der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit (du/du-Mäuse) hinsichtlich des Hörvermögens untersucht. Zudem wurden Barium-, Calcium- und Kaliumströme (BK-Kanal) in IHZ gemessen und ihre biophysikalischen Eigenschaften analysiert. Immunhistochemische Färbungen hinsichtlich  $\beta_2$ -Untereinheit, Ribbon-Synapsen-Anzahl, Postsynapsen-Struktur, Stereozilien-Morphologie und Otoferlin-Expression vervollständigten die Phänotypisierung der IHZ der du/du-Maus.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Mauslinien

Die Haltung der Tiere und Versuche mit Tieren erfolgten gemäß Tierschutzgesetz in Verbindung mit dem Saarländischen Gesetz über das öffentliche Veterinärwesen und die amtliche Lebensmittelüberwachung (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz). Die Tiere wurden in einem 12h-Tag-Nacht-Zyklus gehalten und hatten ständigen Zugang zu Wasser und Futter (ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse). Neben NMRI-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) wurden die folgenden Mauslinien genutzt:

- (1) *Cacna1d*-defiziente Mäuse (Platzer et al., 2000):  
Mäuse mit NMRI- oder C57BL/6-Hintergrund mit einer Deletion der porenbildenden Untereinheit des  $Ca_v1.3$ -Kanals
- (2) *Cacna2d2*-defiziente Mäuse (ducky- oder du/du-Mäuse, Barclay et al., 2001):  
Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund mit einer Mutation in der akzessorischen Calciumkanal-Untereinheit  $\alpha_2\delta_2$ .

### 4.2 Genotypisierung von ducky-Mäusen

Die du/du-Mäuse wurden nach folgendem Protokoll (modifiziert nach Prof. Dr. Gerald Obermair, Innsbruck; Brodbeck et al., 2002) genotypisiert: Aus 1-2 mm großen Gewebestücken (Ohrstanzen oder Schwanzstücke) wurde die DNA mit dem NucleoSpin® Tissue Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) laut Anleitung isoliert (in 50  $\mu$ l BE Puffer). Anschließend wurde eine PCR (Thermocycler TGradient, Biometra, Göttingen) nach folgendem Ansatz und mit dem in Tabelle 4.1 beschriebenen PCR-Programm durchgeführt: 2  $\mu$ l DNA (~ 200-400 ng), 0.5  $\mu$ l Primer *forward* (5'-ACCTATCAGGCAAAGGACG-3', Biomers.net GmbH, Ulm), 0.5  $\mu$ l Primer *reverse* (5'-AGGGATGGTGGTTGGA-3'), 7  $\mu$ l destilliertes Wasser, 10  $\mu$ l GoTaq® GreenMaster Mix (Promega GmbH, Mannheim).

**Tabelle 4.1: PCR-Programm für die du/du-Genotypisierung**

Temperatur	Zeit
95 °C	3 min
95 °C	40 sec
56 °C	30 sec
72 °C	35 sec
72 °C	5 min
8 °C	∞

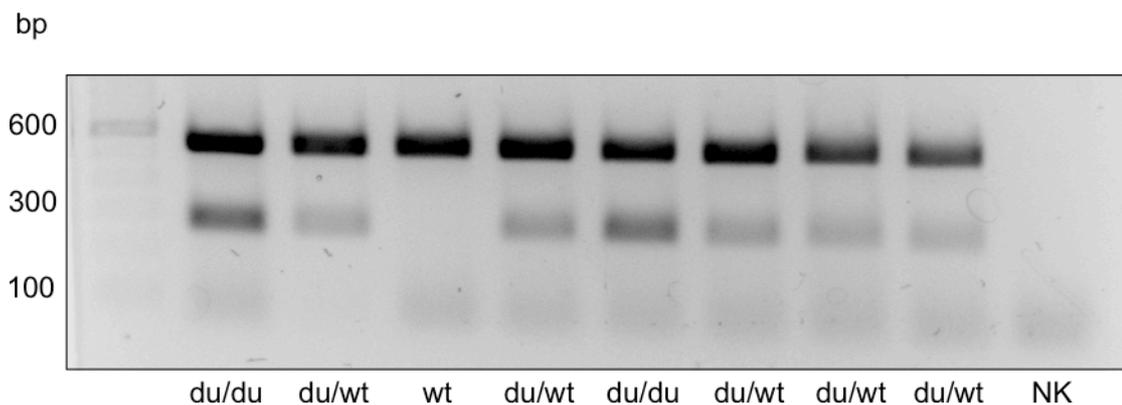
10 µl des PCR-Produktes wurden für den anschließenden Enzymverdau mit 2 µl NEB4-Puffer, 0.2 µl *BspHI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) und 7.8 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt. Der Ansatz inkubierte 60 - 80 Minuten bei 37°C. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit 10 µl des Enzymverdaus mit einer Gelelektrophorese (1.8%iges, Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel) in TAE-Puffer (50XTAE: 2 M TRIS-Base, 50 mM EDTA (Sigma, Taufkirchen), 5.7 % (v/v) Eisessig (VWR International GmbH, Radnor, PA, USA)) mit 120 V. Die Banden wurden mit der EBox-VX2 (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) detektiert.

Die Primer amplifizieren eine Region des Gens, die außerhalb des eigentlichen *Cacna2d2*-Gens liegt. Die Bande für das Wildtyp-*Cacna2d2*-Allel (541 bp) ist unabhängig vom Genotyp immer vorhanden. Bei der du/du-Mutation im *Cacna2d2*-Allel ist diese Region dupliziert und zudem mutiert. Man erhält durch die Duplikation folglich ein Fragment mit gleicher Größe wie für den Wildtyp (541 bp). Durch die in diesem Genabschnitt befindliche Mutation kann dieser Bereich allerdings durch ein Restriktionsenzym (*BspHI*) in zwei Fragmente (beide ca. 280 bp groß) geschnitten werden. In Tabelle 4.2 sind die zu erwartenden Genotypen mit ihrer Bandengröße dargestellt.

**Tabelle 4.2: Bandengrößen der du/du-Genotypisierung**

Genotyp	Bandengröße
Wildtyp (wt)	541 bp
Heterozygot für du/du (du/wt)	541 bp und 280 bp
Homozygot für du/du (du/du)	541 bp und 280 bp (stärker als bei du/wt)

Ein Beispielbild einer Genotypisierung ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Auswahl der du/du-Mäuse für Experimente erfolgte sowohl anhand des Geno- als auch des Phänotyps. Die du/du-Mäuse waren deutlich kleiner und leichter ( $4.6 \text{ g} \pm 0.7 \text{ g}$ ,  $n = 8$ ) als ihre Wildtyp-Geschwistertiere ( $12.2 \text{ g} \pm 2.3 \text{ g}$ ,  $n = 9$ ), wie die Ermittlung des Gewichtes für die Narkose bei Hörmessungen ergab. Zu diesem Zeitpunkt waren die du/du-Mäuse zwischen 20 und 25 Tagen alt, die Wildtyp-Mäusen zwischen 21 und 30 Tagen. Des Weiteren besaßen du/du-Mäuse einen ataktischen Gang und litten unter epileptischen Anfällen (s. auch Kapitel 3.7 Die ducky- (du/du) Maus). Die du/du-Mäuse wurden nicht älter als 28 Tage (P28). Bei der Präparation der Cochlea (s.4.5 Präparation der Cochlea) wurde beobachtet, dass die Cochleae von du/du-Mäusen brüchiger waren als die der Wildtyp-Geschwistertiere. Ansonsten ergaben sich keine auffälligen, morphologischen Unterschiede.

**Abbildung 4.1: Beispielgel einer du/du-Genotypisierung**

Die obere Bande hat eine Größe von 541 bp, die untere von etwa 280 bp. Ist das du/du-Allel nicht vorhanden, schneidet das Enzym nicht und es erscheint nur eine Bande bei 541 bp (wt). Bei Vorhandensein des du/du-Allels schneidet das Enzym und man erhält eine Bande bei etwa 280 bp. Ist das du/du-Allel homozygot (du/du) vorhanden, dann ist die 280 bp-Bande intensiver, bei heterozygoten Tieren schwächer (du/wt). Marker: TrackIt 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). NK:

Negativkontrolle, d. h. keine DNA.

### 4.3 Genotypisierung von $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen

Die  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäuse wurden mit den Primern  $Ca_v1.3$  *sense* (5'-GCA AAC TAT GCA AGA GGC ACC AGA-3'),  $Ca_v1.3$  *antisense* (5'-TAC TTC CAT TCC ACT ATA CTA ATG CAG GCT-3') und  $Ca_v1.3$  *neosense* (5'-TTC CAT TTG TCA CGT CCT GCA CCA-3') nach Striessnig et al. (2006) genotypisiert.

### 4.4 Lösungen

Tabelle 4.3 zeigt die in dieser Arbeit zur Herstellung der intra- und extrazellulären Lösungen verwendeten Chemikalien mit Hersteller. Einstellung des pH-Wertes und der Osmolarität erfolgten mit dem pH-Meter HI221 (HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein) und dem Osmomat®030 (Gonotec GmbH, Berlin).

**Tabelle 4.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Hersteller**

Chemikalie	Hersteller
Apamin (sApamin)	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel
ATP	Alfa Aesar, Karlsruhe
BaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub>	Calbiochem, Darmstadt
Cäsiummethansulfonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glukose	AppliChem GmbH, Darmstadt
GTP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HEPES acid	Merck KGaA, Darmstadt
Kalilauge	Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Calbiochem, Darmstadt

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Kalium-Glukonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Laktobionat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Molekula Limited, Dorset, UK
Linopirdin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphokreatin Dinatrium Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TEA-Cl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

#### 4.5 Präparation der Cochlea

Für elektrophysiologische Messungen an inneren Haarsinneszellen (IHZ) und immunhistochemische Färbungen der apikalen Windung des Corti-Organs wurden NMRI-Mäuse, Mäuse der Ca<sub>v</sub>1.3-Linie und Mäuse der ducky-Linie zwischen dem postnatalen Tag 15 und 25 laut Tierschutzgesetz mit Isofluran (Baxter GmbH, Unterschleißheim) narkotisiert und anschließend dekapitiert. Für die Gewinnung von Haarzellen für qRT-PCR-Experimente wurden zusätzlich neonatale Mäuse verwendet (zwischen postnatalem Tag 5 und 6). Die Schädelhälften wurden in einer physiologischen Lösung (153 mM NaCl, 5.8 KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 MgCl, 5.6 mM Glukose, 10 mM HEPES, 0.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.35, 320 mOsm) auf Eis gelagert und die Cochlea wurde entnommen. Weitere Präparationen erfolgten unter dem Stereomikroskop SZX-16 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg). Nach Entnahme des Innenohrs wurde der Knochen der Cochlea ausgehend vom apikalen Ende unter Zuhilfenahme feiner Pinzetten entfernt. Die dadurch freigelegte apikale Windung des Corti-Organs wurde entnommen, mit Cell-Tak (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) aufgeklebt und die Tektorialmembran vorsichtig entfernt.

## 4.6 Transkriptanalyse an Haarsinneszellen

Für die Transkriptanalyse wurden innere und äußere Haarsinneszellen (IHZ, ÄHZ) abgesaugt, die RNA in cDNA umgeschrieben und diese mit Hilfe der qRT-PCR weiter analysiert. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben.

### 4.6.1 Gewinnung von Haarsinneszellen

Zur Isolation von Haarsinneszellen wurde die Cochlea wie unter Kapitel 4.5 (Präparation der Cochlea) beschrieben präpariert. Vor Öffnung der Cochlea wurde diese in eine Lösung überführt, die ein vorzeitiges Schwellen der Haarzellen durch Zugabe von Glukonat verhindern sollte (45 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.95 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.8 mM Glukose, 10 mM HEPES, 0.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120 mM Natrium-Glukonat, pH 7.35, 320 mOsm). Die apikale Windung des Corti-Organs wurde herauspräpariert und mit Cell-Tak aufgeklebt. Unter dem Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, 40x Achroplan Objektiv) wurden die Haarsinneszellen (30-90 IHZ, 120-220 ÄHZ) durch Absaugen mittels Borosilikatpipetten (Glasrohlinge für 4 h bei 200 °C ausgebacken) von etwa 10 µm Durchmesser gesammelt. Zum Teil wurde in die Pipettenspitzen ein RNase-Inhibitor (RNaseOUT™, Invitrogen Limited, Carlsbad, CA, USA) mit bis zu 0.5 µl vorgelegt. Während des Absaugens wurde das Corti-Organ ständig bei hoher Geschwindigkeit mit der Glukonat-haltigen Lösung überspült. Nach dem Gewinnen der Haarsinneszellen wurden diese durch schwachen Überdruck und Abbrechen der Pipettenspitze in ein autoklaviertes Kryogefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden maximal eine Woche bei -70 °C gelagert. Die Haarsinneszellen wurde teilweise von Dr. Niels Brandt (Fachrichtung 2.5 Biophysik, Universität des Saarlandes, Homburg) isoliert.

### 4.6.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Die Transkription der RNA in cDNA erfolgte nach folgendem Protokoll (s. Baig et al., 2011): Die Zellen wurden zum Aufbrechen der Zellmembranen dreimal bei 37 °C aufgetaut und in flüssigem Stickstoff wieder eingefroren. Anschließend wurde das Volumen für jede Reaktion mit RNase-freiem Wasser (Promega GmbH, Mannheim) auf 9 µl aufgefüllt. Hinzu kamen Random Hexamer Primer (finale Konzentration 5 µM, Applied Biosystems, Carlsbad, CA,

USA) und dNTPs (finale Konzentration: 0.5 mM, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, danach für mindestens eine Minute auf Eis gelagert. Es wurden DTT (final: 10 mM, Invitrogen Limited, Carlsbad, CA, USA), RNaseOUT (40 U) und die SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U, Invitrogen Limited, Carlsbad, CA, USA) hinzugefügt und mit 5xFS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Umschreibung erfolgte bei 50 °C für 2.5 Stunden. Eine Inaktivierung der Transkriptase dauerte 30 Minuten bei 70 °C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert und zur weiteren Analyse auf Trockeneis versandt.

#### 4.6.3 Transkriptanalyse mit quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Transkripte der abgesaugten Haarsinneszellen wurden mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-PCR von Prof. Dr. Gerald Obermair (Sektion für Physiologie, Medizinischen Universität Innsbruck) analysiert. Dabei wird die Anzahl an mRNA- bzw. cDNA-Molekülen mittels TaqMan™-Sonden in jedem PCR-Zyklus ermittelt. Die TaqMan™-Sonden sind - neben den „normalen“ *forward* und *reverse* Primern - Oligonukleotide, die an der zu untersuchenden Sequenz binden. Sie enthalten an einem Ende einen Reporterfluoreszenz-Farbstoff, am anderen Ende einen sogenannten Quencher-Farbstoff. Der Quencher-Farbstoff unterdrückt durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer die Fluoreszenz des Reporters. Wird die betreffende Sequenz amplifiziert und die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, kommt es zur Trennung von Reporter und Quencher und damit zur Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge des PCR-Produkts. Die für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten verwendeten Expressions-Assays (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sind in Tabelle 4.4 aufgeführt (Schlick et al., 2010). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden teilweise mehrere Proben zusammengefügt (gepoolt). Zur Quantifizierung wurden die Werte auf ein mitgeführtes, mitamplifiziertes Haushaltsgen (hier Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase) normiert.

**Tabelle 4.4: Verwendete TaqMan™ Expressions-Assays für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten**

Unter- einheit	Gen Bank Accession	Assay-Nummer	Fragmentgröße in bp	Exongrenze
$\alpha_2\delta_1$	NM_009784N	Mm00486607_m1	100	33–34
$\alpha_2\delta_2$	NM_020263	Mm00457825_m1	84	1-2

Unter- einheit	Gen Bank Accession	Assay-Nummer	Fragmentgröße in bp	Exongrenze
$\alpha_2\delta_3$	NM_009785	Mm00486613_m1	109	5-6
$\alpha_2\delta_4$	NM_001033382	Mm01190105_m1	61	8-9

## 4.7 Hörmessungen

Das Hörvermögen der du/du-Mäuse wurde von Dipl.-Ing. Dietmar Hecker in Zusammenarbeit mit Dr. Julia Dlugaiczyk und Prof. Dr. Bernhard Schick an der HNO Universitätsklinik des Saarlandes (Abteilung Experimentelle Audiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Schick) untersucht. ABR (*auditory brainstem responses*) und DPOAE (*distortion product of otoacoustic emissions*)-Messungen wurden in einer schalldichten Kammer an Mäusen im Alter von etwa 21-30 (wt) und 20-25 Tagen (du/du) durchgeführt.

### 4.7.1 ABR-Messungen

Der Schallreiz wird von der Cochlea ausgehend über die zentrale Hörbahn, die mehrere Stationen umfasst, an die Hörrinde weitergeleitet. Mit ABR-Messungen wurde die Reaktion des auditorischen Hirnstammes auf einen akustischen Reiz getestet. Die Hirnstammpotentiale wurden mit Hilfe von subcutan angebrachten Elektroden gemessen. Die Messelektrode befand sich hinter dem Ohr, die Referenzelektrode auf der Stirn und die Erdungselektrode am Rücken. Anhand des Auftretens der typischen ABR-Wellenformen ließen sich individuelle Hörschwellen bestimmen. Zum Ermitteln der Hörschwelle wurden Klick- (10  $\mu$ s, „Rauschen“/noise) und frequenzspezifische (3 ms, 2 - 45 kHz) Impulse präsentiert (Engel et al., 2006; Zuccotti et al., 2012).

### 4.7.2 DPOAE-Messungen

Otoakustische Emissionen (OAE) sind akustische Signale, die im Innenohr entstehen und mit einem Mikrofon im Gehörgang detektiert werden. Sie dienen als Maß für die Funktion des cochleären Verstärkermechanismus und damit auch der ÄHZ. Es wird angenommen, dass

die aktive Verstärkung des Schalls durch die ÄHZ zur Bildung dieser Signale führt (Kemp, 2002). Die Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) sind eine spezielle Form der OAEs. Sie werden ausgelöst durch die simultane Präsentation zweier Töne. Da der Verstärkermechanismus der Cochlea nicht-linear ist, entsteht als Folge ein Ton bei einer Frequenz, die nicht proportional zu den eingespielten Tönen ist. Es kommt zur Distorsion, wobei das charakteristische Produkt bei  $2 \cdot f_1 - f_2$  die größte Amplitude hat und daher zur Auswertung herangezogen wird. Die hier verwendeten Töne zur Stimulation hatten ein Verhältnis von  $f_2 = 1.2 \cdot f_1$  (mit  $Lf_1 = 55$  dB SPL und  $Lf_2 = 45$  dB SPL). Die Messung erfolgte bei 16 kHz und über den Bereich von 10 bis 18 kHz, wobei die Signale in diesem Bereich in 0.5 kHz-Schritten gemittelt wurden (Hecker et al., 2011; Schimmang et al., 2003).

#### **4.8 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen**

Alle Patch-Clamp-Messungen erfolgten an IHZ der apikalen Windung des Corti-Organs bei Raumtemperatur (21-23 °C) in der Ganzzell-Konfiguration im Voltage-Clamp-Modus. Die Präparate wurden kontinuierlich mit Extrazellulärlösung überspült, die (außer für Bariumströme) wie folgt zusammengesetzt war: 70 mM Laktobionat, 83 mM NaCl, 5.8 KCl, 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.95  $\text{MgCl}_2$ , 5.3 mM Glukose, 10 mM HEPES, 0.7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.35, 320 mOsm. Als Mikroskop diente das Axioskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen) unter Beleuchtung mit einem differentiellen Interferenzkontrast und einem 40x-Objektiv (Achromplan) mit Wasserimmersion. Patch-Pipetten wurden aus Quarzglas mit einem Laserpuller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) gezogen und hatten in der oben angegebenen Badlösung mit den unten genannten Pipettenlösungen Widerstände von 6 bis 8 M $\Omega$ .

##### **4.8.1 Effekt von 8-Bromo-cGMP auf BK-Ströme der inneren Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen**

Der Effekt von 8-Bromo-cGMP auf Kaliumströme der IHZ wurde an NMRI-Mäusen im Alter von 15-25 Tagen gemessen. Dazu wurden intrazelluläre Lösungen mit unterschiedlichen freien Calciumkonzentrationen verwendet. Die Pipettenlösung war wie folgt zusammengesetzt: 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 10 mM Phosphokreatin, 0.1 mM GTP, 20 mM KCl, 4 mM ATP, 110 mM Kalium-Glukonat, pH 7.35, 305 mOsm. Für eine niedrigere freie Calciumkonzentration wurden 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , für eine höhere Calciumkonzentration

1 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. Die Berechnung des freien Calciums erfolgte mit Hilfe einer Website der Stanford University (Information gemäß Stanford University, 2011: <http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>, Temperatur: 22 °C, pH-Wert: 7.35 und Ionenstärke: 0.16 N für physiologische Lösungen). Für eine Lösung mit 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  ergab sich eine freie Calciumkonzentration von 22.4 nM (~20 nM), für die Lösung mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ergaben sich 1.8 nM freies Calcium (~2 nM). 8-Bromo-cGMP (Tocris Bioscience, Bristol, UK) wurde mit einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  dazu gegeben.

#### **4.8.2 Barium- und Calciumströme der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Barium- und Calciumströme wurden an IHZ von 19-23 Tage alten du/du-Mäusen gemessen und mit denen von Wildtyp-Tieren im Alter von 16-24 Tagen verglichen. Für die Barium- und Calciumstrom-Messungen war die Pipette mit folgender Intrazellulärlösung gefüllt: 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 10 mM Phosphokreatin, 0.3 mM GTP, 20 mM CsCl, 4 mM ATP, 110 mM Cäsiummethansulfonat, pH 7.35, 305 mOsm. Die extrazelluläre Lösung für die Bariumströme enthielt im Gegensatz zur üblichen Extrazellulärlösung 72.5 mM Laktobionat, 40 mM NaCl, 5.6 KCl, 10 mM  $\text{BaCl}_2$ , 0.9 MgCl, 5.6 mM Glukose, 10 mM HEPES, 35 mM TEA-Cl und 15 mM 4-AP (pH 7.35, 320 mOsm). Durch die Barium-Ionen werden Kaliumkanäle blockiert, deren Ströme um ein Vielfaches größer sind als die durch die Calciumkanäle fließenden Ströme. Zudem können mit Barium als Ladungsträger höhere Stromamplituden durch den Calciumkanal gemessen werden und es lässt sich spannungs- von calciumabhängiger Inaktivierung trennen. Für Calciumströme wurden die Zellen mit normaler Extrazellulärlösung (Zusammensetzung s. Kapitel 4.8 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen) überspült. Während der Ableitung der IHZ wurde folgende Lösung mit erhöhter Calciumkonzentration und Kaliumkanal-Blockern mit einer Thetaglas-Pipette, die dicht an den Haarzellen positioniert war, appliziert: 72.5 mM Laktobionat, 40 mM NaCl, 5.6 KCl, 0.9 MgCl, 5.6 mM Glukose, 10 mM HEPES, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 35 mM TEA-Cl, 500 nM Apamin, 100  $\mu\text{M}$  Linopirdine, 15 mM 4-AP, pH 7.35, 320 mOsm.

#### **4.8.3 Kaliumströme der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Die Kaliumströme der IHZ von 21-22 Tage alten du/du-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-IHZ (21-22 Tage alt) wurden mit folgender Intrazellulärlösung gemessen: 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 4 mM

MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 10 mM Phosphokreatin, 0.1 mM GTP, 20 mM KCl, 4 mM ATP, 110 mM Kalium-Glukonat, pH 7.35, 305 mOsm. Die Zellen wurden mit normaler Extrazellulärlösung (Zusammensetzung s. Kapitel 4.8 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen) überspült.

#### 4.8.4 Allgemeiner Messaufbau

Als Patch-Clamp-Verstärker diente ein AXOPATCH 200B (Molecular Devices GmbH, Sunnyvale, CA, USA). Die Daten wurden mit der Software Pulse++ 1.73 (Ulrich Rexhausen, Institut für Physiologie II, Eberhard-Karls-Universität Tübingen und Klaus Bauer, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg) und einem ITC16 Computer Interface (Instrutech, Greatneck, NY, USA) aufgezeichnet. Die Stromspuren wurden mit einer Frequenz von 100 kHz (Programme mit einer Länge von 30 ms) und 5 kHz (Programme mit einer Länge von 500 ms) abgetastet und mit 10 bzw. 1.3 kHz gefiltert (LPBF 48DG, npi electronic GmbH, Tamm).

Die Zellen wurden bei -80 mV (Kaliumströme), -88 mV (Bariumströme) oder -86 mV (Calciumströme) gehalten. Nach einem Testpuls mit einer Hyperpolarisation (von -10 mV zur Berechnung des Leckstroms) wurden die Zellen zur Messung von Kalium- und Bariumströmen vom Haltepotential ausgehend in 24 bzw. 28 5 mV-Schritten für eine Dauer von 8 ms depolarisiert. Für Calciumströme wurde ein Startpotential von -111 mV gewählt (30 5 mV-Schritte). Inaktivierungsprotokolle depolarisierten die Zellen für 400 ms in 13 10 mV-Schritten.

#### 4.8.5 Auswertung der Patch-Clamp-Daten

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) und verschiedenen, von Dr. Stefan Münkner (Fachrichtung 2.5 Biophysik, Universität des Saarlandes, Homburg) programmierten Analyseprogrammen in Igor (Igor-Makros) ausgewertet. Bei den Strömen erfolgte ein Abzug des Leckstroms, bei den Spannungen wurde das *Liquid Junction Potential* (LJP) (Neher, 1992) mit einberechnet. Dieses betrug für die Lösungen zur Messung der Kaliumströme -10 mV, zwischen den Lösungen für die Bariumströme -8 mV und bei den Calciumströmen -6 mV. Dabei ist zu beachten, dass für die Calciumströme ein

LJP einer Drei-Lösungssituation hätte berechnet werden müssen (Neher, 1992). Da das LJP für die Applikations- und Extrazellulärlösung nur bei -2.4 mV lag, wurde dieses vernachlässigt. Bei Kaliumströmen wurde der Serienwiderstand am Verstärker um 60-80 % korrigiert und diese Korrektur wurde bei der Datenauswertung berücksichtigt. Bei Messung der Barium- und Calciumströme erfolgte keine Serienwiderstands-Korrektur am Verstärker, um erhöhtes Rauschen der Stromspuren zu vermeiden. Außerdem war der daraus resultierende Spannungsfehler bei den sehr geringen Stromamplituden der Barium- und Calciumströme (bis maximal 250 pA) so gering, dass eine Korrektur des Serienwiderstandes nicht nötig war. Für die Ermittlung der Strom-Spannungskurve ( $I$ - $V$ ) wurde bei Kaliumstrom-Messungen der korrigierte Serienwiderstand zur Berechnung der tatsächlich angelegten Spannung einbezogen. Bei Barium- und Calciumströmen war der Spannungsfehler vernachlässigbar klein und wurde daher nicht berücksichtigt.

Zur Erstellung der Strom-Spannungskurve bei Kaliumströmen wurden die Stromwerte zwischen 1.2 und 1.3 ms nach Depolarisationsstart gemittelt. Zu diesem Zeitpunkt sollten nur die schnellen BK-Ströme der Haarzelle aktiviert sein (Kros et al., 1998; Kurt et al., 2012). Die  $I$ - $V$ -Kurven der Kaliumströme wurden mit Gleichung 1 gefittet (Boltzmann-Fit erster Ordnung, multipliziert mit der treibenden Spannung).

$$(1) \quad I = G_{\max} \frac{(V - V_{\text{rev}})}{1 + e^{(V_{\text{half}} - V) / k}}$$

$V$  = Membranpotential,  $V_{\text{rev}}$  = Umkehrpotential von Kalium (-73 mV),  $G_{\max}$  = maximale Leitfähigkeit der Zelle,  $V_{\text{half}}$  = halbmaximale Aktivierungsspannung,  $k$  = Steigungsfaktor (Steepness) der Boltzmann-Funktion (Kros and Crawford, 1990).

Die Aktivierungszeitkonstanten der Kaliumströme wurden während der ersten Millisekunde nach Start der Depolarisation mit Hilfe folgender Gleichung angefitet (monoexponentielle Hodgkin-Huxley Aktivierungskinetik):

$$(2) \quad I(t) = I_{\text{ss}} \cdot m(t)^2 \quad \text{wobei} \quad m(t) = m_{\infty} + (m_0 - m_{\infty}) \cdot e^{-t/\tau}$$

mit  $I_{ss}$  = steady-state-Strom,  $\tau$  = Aktivierungszeitkonstante,  $m_{\infty}$  und  $m_0$  = Wahrscheinlichkeiten, dass sich ein „gating particle“ des Hodgkin-Huxley-Modells zu einem entsprechenden Zeitpunkt ( $t = 0$  oder  $t = \infty$ ) im offenen Zustand befindet.

Für die  $I$ - $V$ -Kurven der Barium- und Calciumströme wurden die Werte 7-8 ms nach Start der Depolarisation gemittelt.

Die Strom-Spannungskurven der Barium- und Calciumströme wurden mit Gleichung 4 (Boltzmann-Funktion zweiter Ordnung, Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für die Beschreibung der treibenden Spannung für Barium und Calcium (Hille, 1991; modifiziert nach Knirsch et al., 2007) angefitet:

$$(4) \quad I = -P_{\max} \cdot z \cdot F \cdot \left( \frac{[\text{Ba}]_0}{e^v - 1} + \frac{[\text{Ba}]_i}{e^{(-v)} - 1} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + e^{(V - V_{\text{half}}) / k}} \right)^2$$

$I = I_{\text{Ba}}$  oder  $I_{\text{Ca}}$  zum Zeitpunkt der  $I$ - $V$ -Bestimmung,  $P_{\max}$  = maximale Permeabilität, für  $v = z \cdot F \cdot V / (RT)$  gilt  $z = 2$ ;  $F$  = Faraday-Konstante,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = Temperatur,  $V$  = Membranpotential,  $[\text{Ba}]_i$  und  $[\text{Ba}]_0$  = intra- und extrazelluläre Barium-Konzentration (bzw.  $[\text{Ca}]_i$  und  $[\text{Ca}]_0$  bei Calcium),  $V_{\text{half}}$  = halbmaximale Aktivierungsspannung,  $k$  = Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion.  $[\text{Ca}]_i$  und  $[\text{Ba}]_i$  wurden jeweils auf 50 nM gesetzt.

Die prozentuale Inaktivierung der Barium- und Calciumströme nach 300 ms Depolarisation wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$(5) \quad \text{Inaktivierung} = 1 - \frac{I_{\text{test}}}{I_{\text{peak}}} \cdot 100\%$$

mit  $I_{\text{peak}}$  = Maximalstromamplitude der Stromspur bei  $V_{\text{max}} + 10$  mV zum Zeitpunkt  $t = t_{\text{peak}}$  und  $I_{\text{test}}$  der Strom zum Zeitpunkt  $t = t_{\text{peak}} + 300$  ms und  $I_{\text{test}}$  der Strom zum Testzeitpunkt (Knirsch et al., 2007).

Die Zeitkonstante der Inaktivierung dieser Ströme wurde mit folgender Gleichung durch Anfitzen ermittelt:

$$(6) \quad I(t) = A_1 \cdot e^{-t/\tau} + A_0$$

$I = I_{Ca}$  oder  $I_{Ba}$ ,  $A_1$  = Stromamplitude,  $A_0$  = Offset-Strom,  $\tau$  = Zeitkonstante der Inaktivierung.

Die gemessenen Zellen wurden anhand von Leck- und Serienwiderstand selektiert: Für alle Messungen gingen nur solche Zellen in die Auswertung ein, die einen Leckwiderstand größer als 100 M $\Omega$  und einen unkorrigierten Serienwiderstand kleiner als 18 M $\Omega$  hatten. Die Serienwiderstände der Barium- und Calciumstrommessungen lagen im Mittel zwischen 13 und 15 M $\Omega$ , die der Kaliumströme nach Korrektur zwischen 2.5 und 3.1 M $\Omega$ . Bei der Analyse der Kaliumströme wurden zudem die Zellen ausgeschlossen, deren aus dem Boltzmann-Fit resultierenden Parameter ( $V_{half}$  und Strom bei -10 mV) außerhalb des Messbereiches der jeweiligen Zelle lagen. Die Leckwiderstände betragen bei Kaliumstrom-Messungen im Mittel 160 - 180 M $\Omega$ , bei Barium- und Calciumstrom-Messungen zwischen 1800 und 2600 M $\Omega$ . Bei den Messungen von Barium- und Calciumströmen wurden alle Kaliumkanäle blockiert, die unblockiert bei den Kaliumstrom-Messungen für eine beachtliche Leitfähigkeit beim Haltepotential von -80 mV und damit für einen kleinen „Leckwiderstand“ verantwortlich sind. Durch die großen Kaliumströme ergeben sich aufgrund der Serienwiderstände für jede Zelle individuelle Spannungswerte. Damit die Strom-Spannungskurven und Aktivierungszeitkonstanten dennoch gemittelt werden konnten, wurden die Spannungswerte in 5 mV-Intervallen zusammen gefasst, ggf. gemittelt und die Werte bei der betragsmäßig kleineren Intervallgrenze aufgetragen.

## 4.9 Immunhistochemie

### 4.9.1 Fixierung

Für immunhistochemische Experimente wurden die Maus-Cochleae wie unter Kapitel 4.5 (Präparation der Cochlea) beschrieben entnommen und anschließend fixiert. Die Fixierung

der Zellen erfolgte für 8 bis 15 Minuten auf Eis mit Zambonis Fixativ (Tabelle 4.5) (Stefanini et al., 1967) oder 2 % PFA (Ausgangslösung: 16 %, Polysciences Europa GmbH, Eppelheim) in PBS (Invitrogen Limited, Carlsbad, CA, USA). Die Pikrinsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in Zambonis Fixativ sorgt für eine schnellere Fixierung und damit besseren Gewebeerhalt. Die Wahl des Fixativs war von den verwendeten primären Antikörpern abhängig. Für die Fixierung wurde der Steigbügel vom ovalen Fenster der Cochlea entfernt. Nach Überführung der Cochlea in das entsprechende Fixativ wurde mit Hilfe der Injektionsnadel einer 1 ml-Insulinspritze vorsichtig ein Loch in den Apex gestochen. Das nachfolgend durch ovales und rundes Fenster injizierte Fixativ (1 ml) konnte an dieser Stelle wieder entweichen, was einen gründlichen Austausch des Mediums in der Cochlea gewährleistete. Nach der Inkubationszeit wurde die Cochlea in PBS überführt und die Reaktion wurde durch Injektion mit PBS gestoppt. Es folgte die Präparation der apikalen Windung des Corti-Organs (s. Kapitel 4.5 Präparation der Cochlea), welches dann in PBS mit Cell-Tak innerhalb eines ImmunoPen™-Kreises (Calbiochem, Darmstadt) von 1 cm Durchmesser auf Objektträgern aufgeklebt wurde.

**Tabelle 4.5: Zambonis Fixativ**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
8 % PFA	50 ml
2 % PFA	50 ml
PBS (10x)	2.5 ml
destilliertes Wasser	25 ml
NaCl	1.7 g
NaOH (1 M)	500 µl
Pikrinsäure (gesättigt)	22.5 ml

#### 4.9.2 Immunfärbung

Alle Inkubations- und Färbeschritte erfolgten auf den Objektträgern in einer lichtundurchlässigen, feuchten Kammer und mit je 50 µl Puffer. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 4.6 aufgeführt. Nach 10-minütiger PBS-Inkubation wurden die Zellen mit Triton-X 100 (VWR International GmbH, Darmstadt) permeabilisiert (10 min, PP). Unspezifische

Bindungsstellen wurden mit BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) blockiert (30 min, BP). Die Inkubation des primären Antikörpers (in RP) erfolgte in entsprechender Verdünnung (s. Tabelle 4.7) für 90 Minuten bei Raumtemperatur oder für 14-16 Stunden bei 4 °C. Nach zwei Waschschritten (2 x 15 min WP) wurde der sekundäre Antikörper (in RP) (s. Tabelle 4.8) für 70 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte. Sekundäre Antikörper-Lösungen wurden vor Benutzung immer für 3 min bei 6000 g zentrifugiert, primäre Antikörper-Lösungen je nach Datenblatt. Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen mitgeführt, um zu testen, ob der sekundäre Antikörper unspezifische Bindungen eingeht.

Bei den immunhistochemischen Färbungen sind zum Vergleich Kontrollen sehr wichtig. Da nicht immer Wildtyp-Tiere verfügbar waren, wurden in einigen Fällen auch heterozygote Tiere verwendet. Heterozygote Geschwistertiere der *du/du*- und *Ca<sub>v</sub>1.3*-defizienten Mäuse zeigen keinen Phänotyp. Auf die Verwendung heterozygoter Kontrolltiere wurde in den Abbildungsunterschriften hingewiesen.

**Tabelle 4.6: Verwendete Puffer für immunhistochemische Färbungen**

Substanz	Menge
BSA	aus 10 % Stocklösung in PBS
Blockierpuffer (BP)	1 % BSA in 1X PBS
Permeabilisierungspuffer (PP)	0.5 % Triton X-100 in 1X PBS
Reaktionspuffer (RP)	0.5 %BSA, 0.2 % Triton X-100 in 1X PBS
Waschpuffer (WP)	0.1 % Triton X-100 in 1X PBS
primäre Antikörper-Lösung	entsprechende Verdünnung in RP
sekundärer Antikörper-Lösung	entsprechende Verdünnung in RP

Bei manchen Präparaten wurde eine DAPI-Färbung zur Verbesserung der Kernfärbung durchgeführt, in manchen Fällen eine zusätzliche Phalloidin-Färbung (Acti-stain™ 670 Fluorescent Phalloidin, Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) zur Markierung der Stereozilien und Kutikularplatte. Für die DAPI-Färbung wurden die Präparate zuerst 5-6 Minuten in PBS gewaschen. DAPI-Stocklösung (0.5 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde auf 1.5 µg/ml verdünnt und die Präparate für 3 Minuten darin inkubiert. Es folgten drei

Waschschritte mit PBS (je 1 min). Bei der zusätzlichen Acti-Stain Phalloidin-Färbung wurde die Stocklösung (14  $\mu$ M) in der primären Antikörper-Lösung auf 200 nM verdünnt.

Schließlich wurden die Präparate mit 6-10  $\mu$ l DAPI-enthaltendem VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) und Präzisionsdeckgläsern (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen) eingedeckelt. Die Objektträger lagerten dunkel bei 4 °C.

**Tabelle 4.7: Verwendete primäre Antikörper**

Epitop	Wirt	Verdünnung	Firma	Lot
Ca $\nu$ β2, polyklonal	Kaninchen	1:500	Eigenherstellung AG Flockerzi	
BK <sub>Ca</sub> , polyklonal	Kaninchen	1:50	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	AN-08
Cacna2d2 (H-210), polyklonal	Kaninchen	1:50 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	H3109
Ca $\nu$ 1.3, polyklonal	Kaninchen	1:100 1:200 1:500	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	AN-14 AN-15
CtBP2/RIBEYE, monoklonal	Maus	1:100	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	04274
Otoferlin, polyklonal	Kaninchen	1:8000	Eigenherstellung AG Knipper; Schug et al., (2006)	
PSD-95, monoklonal	Maus	1:1000	Neuromab, Davies, USA	

**Tabelle 4.8: Verwendete sekundäre Antikörper**

Fluoreszenz	Epitop	Wirt	Verdünnung	Firma	Lot
Alexa488	Kaninchen	Ziege	1:500	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	774904

Fluoreszenz	Epitop	Wirt	Verdünnung	Firma	Lot
Cy3	Maus	Ziege	1:1500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Westgrove, PA, USA	94213

### 4.9.3 Auswertung

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 700) mit der Software ZEN der Firma Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen) angesehen, aufgenommen und ausgewertet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit Lasern der folgenden Wellenlängen: 405 nm (DAPI), 488 nm (Alexa488), 555 nm (Cy3), 633 nm (Acti-Stain-Phalloidin 670 nm). Zur Aufnahme von Übersichtsbildern wurde ein 20x-Objektiv ohne Immersion (Plan Apochromat 20x, numerische Apertur 0.5), für die z-Stapel ein Öbobjektiv (Plan Apochromat 63x, numerische Apertur 1.4) verwendet. Die Anregung erfolgte bei du/du- und Wildtyp-Präparaten jeweils mit der gleichen Laserintensität (1-2 % der maximalen Laserintensität) und der gleichen Verstärkung für die Photomultiplier (Faktor 400-900). Die Aufnahme der zugehörigen Negativkontrolle erfolgte ebenfalls mit den gleichen Parametern. Sie sind in Anhang I dargestellt. Die Einzelbilder oder Bilder eines z-Stapels wurden mit 12 bit und variablen Kantenmaßen (maximal 2048 x 2048 Pixel) aufgenommen. Bei Detailbildern mit dem 63x-Öbobjektiv wurde darauf geachtet, dass die Kantenlänge eines Pixels etwa 0.07 µm groß war. Die aufgenommenen z-Stapel werden in dieser Arbeit als Maximumintensitätsprojektionen dargestellt: jedes Pixel zeigt den Wert aus der Ebene, in der es die maximale Intensität hat.

### ***Auszählung der Ribbon-Synapsen***

Um die Anzahl der Ribbon-Synapsen pro Zelle vergleichen zu können, wurde diese anhand der CtBP2-Färbungen ausgezählt. Dazu wurden alle Ribbon-Synapsen in einer Maximumintensitätsprojektion von 4-6 inneren Haarsinneszellen gezählt und durch die Anzahl der Zellen geteilt.

#### 4.10 Dot-Blot-Analyse zur Charakterisierung des $\alpha_2\delta_2$ -Antikörpers

Die Analyse zur Ermittlung der genauen Bindungsstelle des  $\alpha_2\delta_2$ -Antikörpers wurde von PD Dr. Martin Jung an der Universität des Saarlandes (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Richard Zimmermann) durchgeführt. Dies wurde mit sogenannten Dot-Blot-Analysen untersucht. Dazu wurde die Aminosäuresequenz, gegen die der Antikörper gerichtet ist, bzw. die als Immunisierungspeptid verwendet wurde, mit einem repetitiven Versatz von zwei Aminosäuren auf eine derivatisierte Cellulosemembran geblottet. Auf dieser wurde der zu testende Antikörper inkubiert und mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper detektiert. Es erschienen dunkle Kreise (Dots) im Bereich der Aminosäuren, an die der Antikörper gebunden hatte.

##### 4.10.1 Software

Tabelle 4.9 zeigt die in dieser Arbeit verwendete Software mit Hersteller.

**Tabelle 4.9: Verwendete Software und Hersteller**

Software	Hersteller
GraphPad Prism Version 6, Testlizenz	GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA
IBM® SPSS® Statistics, Version 19	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
Igor Software Package, Version 6.2	Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA
ImageJ 64 1.45r	Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
Inkscape, Version 0.48	Free Software Foundation, Boston, MA, USA
Pulse ++ 1.73	entwickelt von Ullrich Rexhausen und Klaus Bauer (Institut für Physiologie II, Eberhard-Karls-Universität Tübingen; Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg)
PyRAT (Python Based Relational Animal Tracking) Software, Version 3.0 Build 7793	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden
OpenOffice™ Apache, Version 3.4.1	The Apache Software Foundation, Forest Hill,

---

Software	Hersteller
ZEN	MD, USA Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Zotero, Version 3.0.8.1	Center for History and New Media, Fairfax, VA, USA

---

#### 4.11 Statistik

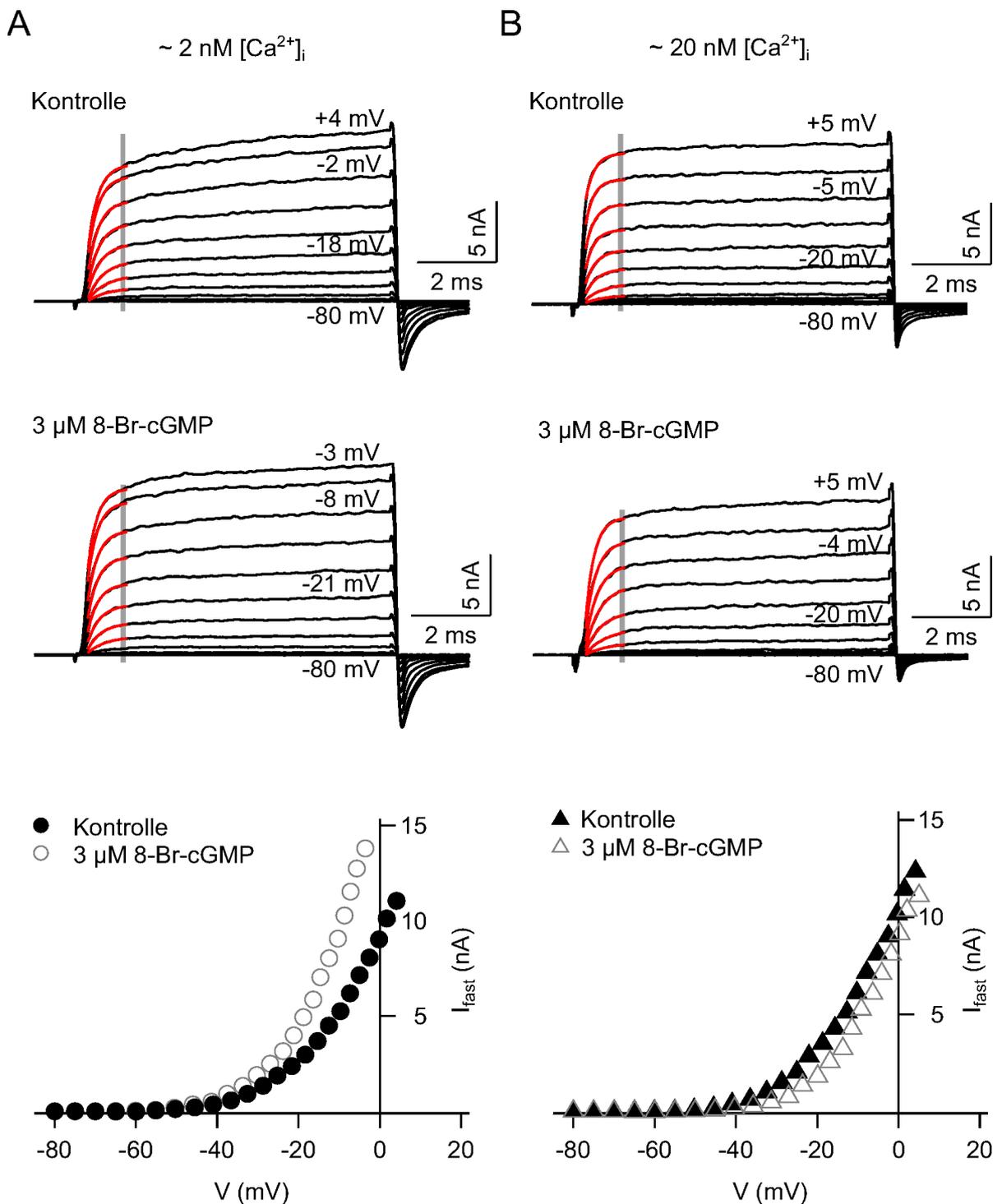
Für den Vergleich von Einzelwerten zwischen zwei Gruppen (IHZ oder Hörmessungen von du/du- oder Wildtyp-Mäuse; IHZ von NMRI-Mäusen mit oder ohne 8-Bromo-cGMP) wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Für die Auswertung der frequenzspezifischen ABR-Schwellen, der gemittelten Barium-, Calcium- und Kalium-I-V-Kurven sowie der Aktivierungszeitkonstanten wurde eine *two-way ANOVA (analysis of variance)* mit Bonferroni Post-Hoc-Test durchgeführt.

## 5 Ergebnisse I: Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle

Durch ein Schalltrauma kommt es zur Schädigung und dem Verlust von inneren Haarsinneszellen (IHZ). Die in IHZ vorkommende NO-cGMP-PKG-Signalkaskade spielt dabei eine entscheidende Rolle (Gosepath et al., 1997; Heinrich et al., 2000; Jaumann et al., 2012). Wird der Abbau von cGMP gehemmt, schützt dies die IHZ vor einem Schalltrauma (Jaumann et al., 2012). Die Zielproteine dieser Kaskade sind in IHZ bisher jedoch unbekannt. In einigen Geweben wurde der BK-Kanal als Zielprotein der NO-cGMP-PKG-Signalkaskade identifiziert (Carrier et al., 1997; Lim et al., 2005; Lu et al., 1998). Um zu überprüfen, ob der BK-Kanal auch in IHZ ein möglicher Angriffspunkt der Signalkaskade ist, wurden BK-Ströme mit und ohne 3  $\mu\text{M}$  8-Bromo-cGMP in der intrazellulären Lösung gemessen. Zudem wurden die Messungen mit zwei verschiedenen intrazellulären, freien Calciumkonzentrationen durchgeführt ( $[\text{Ca}^{2+}]_i = 2 \text{ nM}$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 20 \text{ nM}$ ), die durch die jeweilige Pipettenlösung eingestellt wurden.

### 5.1 Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle maturer innerer Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen

Abbildung 5.1 zeigt BK-Ströme von vier individuellen IHZ mit den dazugehörigen Strom-Spannungskurven (*I-V*-Kurven). Bei einer niedrigen intrazellulären Calciumkonzentration (2 nM) nahm der Strom durch Zusatz von 8-Bromo-cGMP zu (Abbildung 5.1A), bei einer Calciumkonzentration von 20 nM wurde er dadurch etwas niedriger (Abbildung 5.1B).

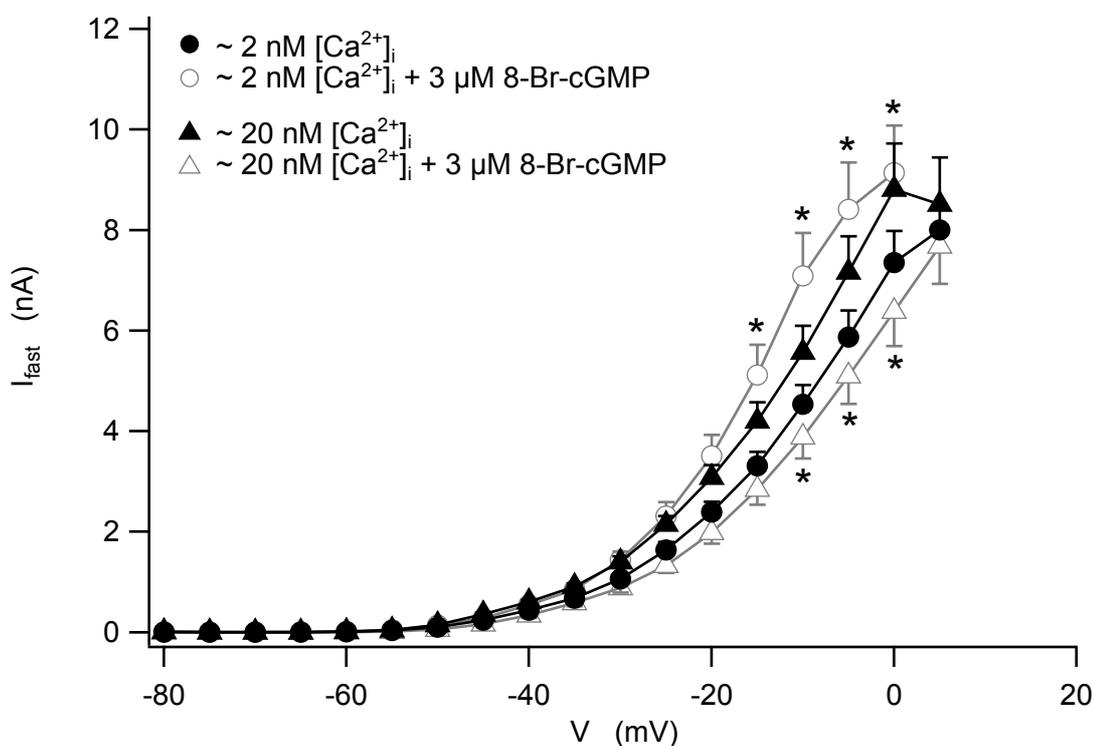


**Abbildung 5.1: Exemplarische BK-Ströme von IHZ bei Zugabe von 8-Bromo-cGMP in unterschiedlichen Calciumkonzentrationen**

Einzelne Stromspuren von BK-Strömen als Antwort auf 8 ms andauernde Depolarisationen auf die angegebenen Spannungen für jeweils eine Kontrollzelle (oben), eine mit 8-Bromo-cGMP gemessene Zelle (Mitte) und die zugehörigen *I-V*-Kurven (unten). Die Messungen wurden mit 2 nM (**A**) und 20 nM (**B**) freiem Calcium in der intrazellulären Lösung durchgeführt. Die rot markierten Spuren zeigen die

Fits der monoexponentiellen Hodgkin-Huxley Aktivierungskinetik über die schnelle Komponente des BK-Stroms. Die  $I$ - $V$ -Kurven wurden aus dem gemittelten Strom 1.2 bis 1.3 ms nach Beginn der Depolarisation (grau unterlegt) ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt ist nur der schnell aktivierbare BK-Kanal offen (Kros et al., 1998; Kurt et al., 2012).

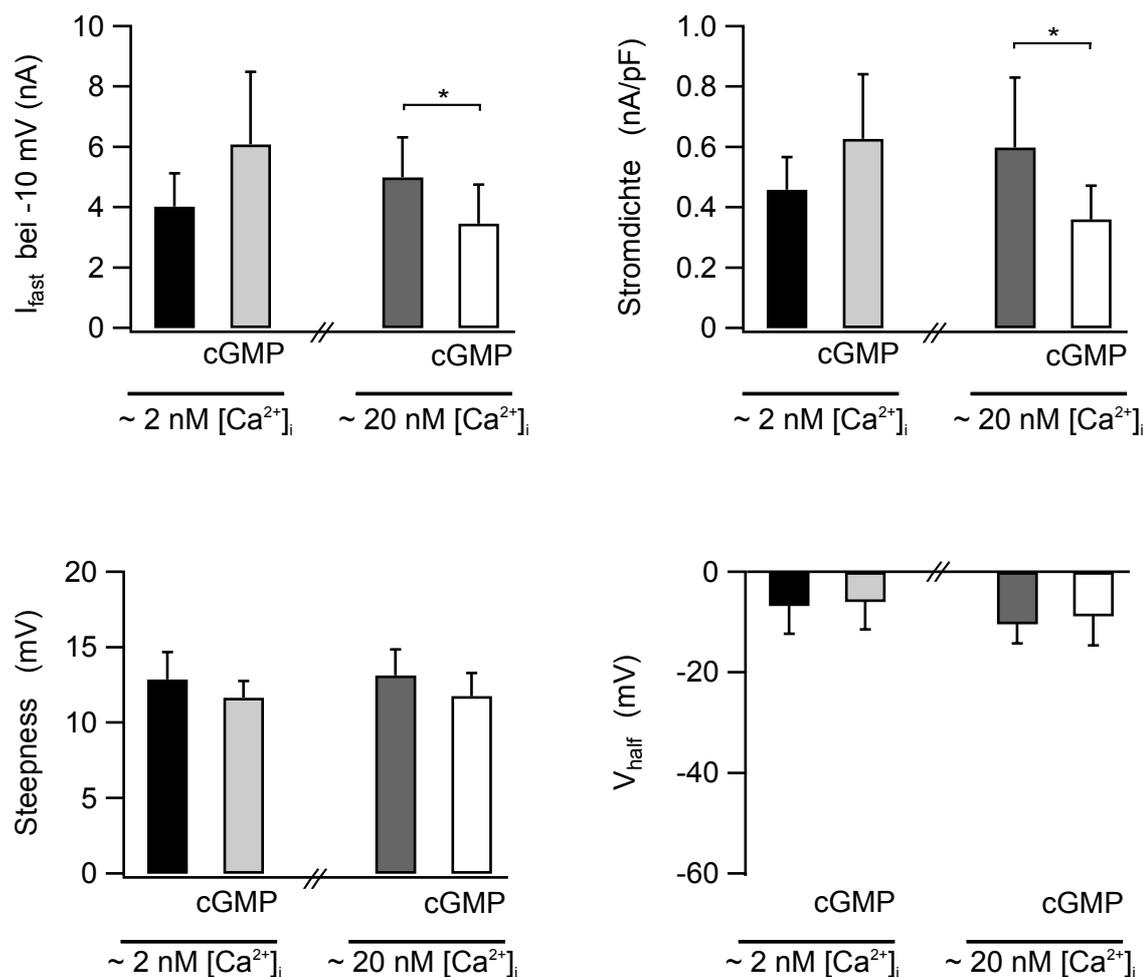
Die für die jeweilige Messbedingung gemittelten  $I$ - $V$ -Kurven aller gemessenen Zellen zeigt Abbildung 5.2. Bei Zugabe von 8-Bromo-cGMP in niedriger Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i = 2$  nM) führte eine Depolarisation auf -15 mV, -10 mV, -5 mV und 0 mV zu einem signifikant erhöhten Strom ( $p < 0.05$ ). Ein gegenteiliger Effekt wurde mit der höheren Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i = 20$  nM) gemessen, bei der der Strom bei Spannungswerten von -15 mV, -5 mV und 0 mV signifikant kleiner wurde ( $p < 0.05$ ).



**Abbildung 5.2: Calciumabhängige Änderung der BK-Ströme in IHZ durch 8-Bromo-cGMP**

Gemittelte Stromspannungskurven  $\pm$  SEM von BK-Strömen mit oder ohne Zugabe von 8-Bromo-cGMP bei zwei intrazellulären Calciumkonzentration (2 nM und 20 nM). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der Standardfehler jeweils nur in eine Richtung dargestellt. 2 nM  $[Ca^{2+}]_i$ : Kontrollen,  $n = 9$ ; 8-Bromo-cGMP  $n \geq 6$ ; 20 nM  $[Ca^{2+}]_i$ : Kontrollen  $n = 9$ ; 8-Bromo-cGMP  $n = 12$ . \* $p < 0.05$ , two-way ANOVA, verglichen wurde innerhalb der jeweiligen Calciumkonzentration

Um genauere Aussagen über die Ströme treffen zu können, wurden an die *I-V*-Kurven Funktionen angefügt, die das Produkt einer Boltzmann-Funktion für die Aktivierung des BK-Kanals mit der treibenden Spannung darstellen. Der Fit wurde über einen Spannungsbereich von -65 mV bis  $-2.5 \text{ mV} \pm 0.9 \text{ mV}$  angelegt. Daraus ergaben sich die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Stroms (Steepness) und die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_{\text{half}}$ ), die zusammen mit Stromamplitude und Stromdichte bei -10 mV in Abbildung 5.3 dargestellt sind. Die Stromamplitude wurde bei der höheren Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i = 20 \text{ nM}$ ) durch Zugabe von 8-Bromo-cGMP signifikant von  $5.0 \text{ nA} \pm 1.3 \text{ nA}$  (Kontrolle;  $n = 9$ ) auf  $3.5 \text{ nA} \pm 1.3 \text{ nA}$  (8-Bromo-cGMP;  $n = 12$ ) reduziert ( $p < 0.05$ ). Die Kapazitäten der Zellen waren ähnlich (nicht dargestellt, 8-Bromo-cGMP:  $9.5 \text{ pF} \pm 1.5 \text{ pF}$ ; Kontrolle:  $8.8 \text{ pF} \pm 1.6 \text{ pF}$ ). Die Stromdichte wurde bei  $20 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$  somit durch das 8-Bromo-cGMP ebenfalls signifikant reduziert (8-Bromo-cGMP:  $0.60 \text{ nA/pF} \pm 0.23 \text{ nA/pF}$ , Kontrollen:  $0.36 \text{ nA/pF} \pm 0.11 \text{ nA/pF}$ ;  $p < 0.05$ ). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (8-Bromo-cGMP:  $11.8 \text{ mV} \pm 1.5 \text{ mV}$ ; Kontrolle:  $13.2 \text{ mV} \pm 1.7 \text{ mV}$ ) und die halbmaximale Aktivierungsspannung (8-Bromo-cGMP:  $-8.8 \text{ mV} \pm 5.9 \text{ mV}$ ; Kontrolle:  $-10.4 \text{ mV} \pm 3.8 \text{ mV}$ ) waren unverändert.

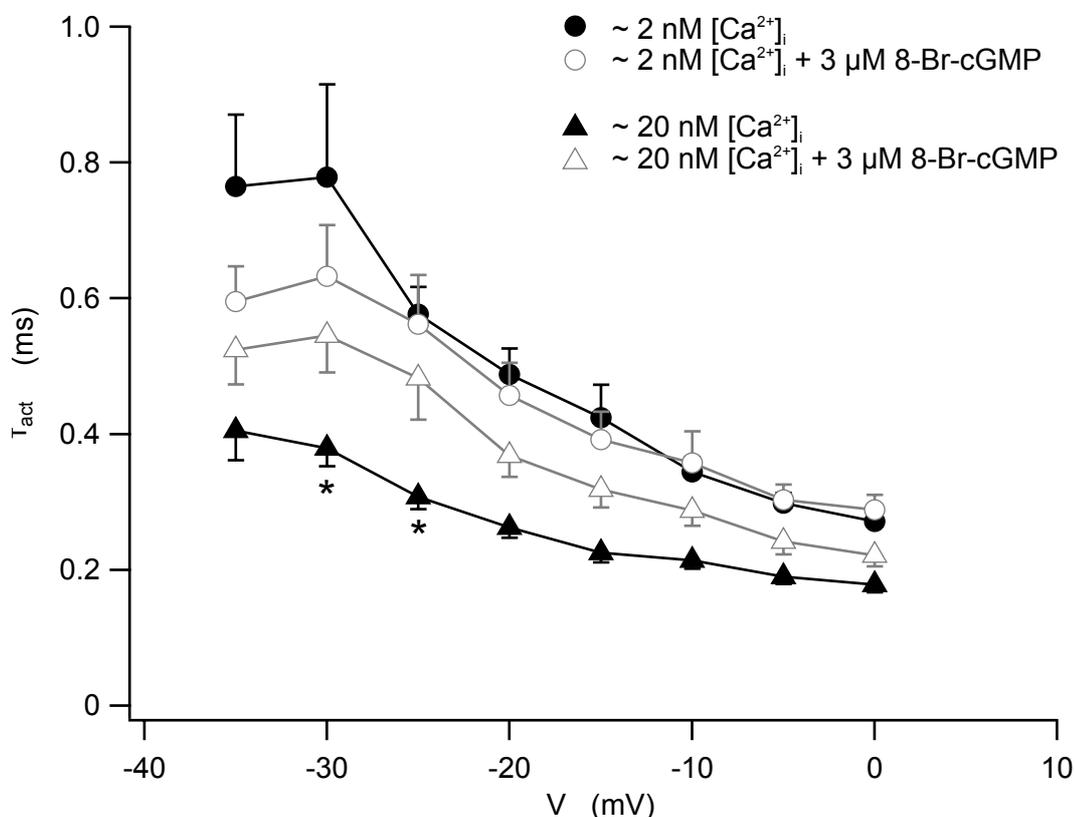


**Abbildung 5.3: Parameter der BK-Ströme bei Zugabe von 8-Bromo-cGMP in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration**

Mittelwerte  $\pm$  SD des Stroms ( $I_{fast}$ ) und der Stromdichte bei -10 mV (oben), Steepness und  $V_{half}$  (unten). Steepness und  $V_{half}$  wurden aus einem Boltzmann-Fit berechnet. 2 nM  $[Ca^{2+}]_i$ : Kontrollen, n = 9; 8-Bromo-cGMP, n = 10; 20 nM  $[Ca^{2+}]_i$ : Kontrollen, n = 9; 8-Bromo-cGMP, n = 12. \*p < 0.05, Mann-Whitney-U-Test

Bei einer freien intrazellulären Calciumkonzentration von 2 nM wurde der Strom bei -10 mV ( $I_{fast}$ ) durch 8-Bromo-cGMP nicht signifikant verändert (8-Bromo-cGMP: 6.1 nA  $\pm$  2.4 nA; n = 10; Kontrollen: 4.0 nA  $\pm$  1.1 nA; n = 9). Auch die durchschnittliche Kapazität und die mittlere Stromdichte bei -10 mV waren nicht unterschiedlich (Kapazität 8-Bromo-cGMP: 9.6 pF  $\pm$  0.9 pF; Kapazität Kontrollen: 8.8 pF  $\pm$  1.1 pF; Stromdichte 8-Bromo-cGMP: 0.63 nA/pF  $\pm$  0.21 nA/pF; Stromdichte Kontrollen: 0.46 nA/pF  $\pm$  0.11 nA/pF). Ebenso zeigten die aus dem Boltzmann-Fit errechneten Parameter Steepness und  $V_{half}$  keinen signifikanten Unterschied bei 2 nM  $[Ca^{2+}]_i$  (Steepness 8-Bromo-cGMP: 11.7 mV  $\pm$  1.1 mV; Steepness Kontrollen:

12.9 mV  $\pm$  1.8 mV;  $V_{\text{half}}$  8-Bromo-cGMP: -5.9 mV  $\pm$  5.5 mV;  $V_{\text{half}}$  Kontrollen: -6.7 mV  $\pm$  5.6 mV).



**Abbildung 5.4: Effekt von 8-Bromo-cGMP auf die Aktivierungszeitkonstanten der BK-Ströme in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration**

Gemittelte Aktivierungszeitkonstanten ( $T_{\text{act}}$ )  $\pm$  SEM mit oder ohne 8-Bromo-cGMP Zugabe bei zwei verschiedenen intrazellulären Calciumkonzentrationen (2 nM und 20 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der Standardfehler jeweils nur in eine Richtung dargestellt. 2 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ : Kontrollen,  $n \geq 7$ ; 8-Bromo-cGMP,  $n \geq 7$ ; 20 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ : Kontrollen,  $n = 9$ ; 8-Bromo-cGMP,  $n \geq 7$ . \* $p < 0.01$ , two-way ANOVA, verglichen wurden innerhalb der jeweilige Calciumkonzentration

Zur weiteren Charakterisierung der BK-Ströme wurden die Aktivierungszeitkonstanten wie unter Kapitel 4.8.5 (Auswertung der Patch-Clamp-Daten) beschrieben, ermittelt (Abbildung 5.4, siehe auch Abbildung 5.1). Bei der niedrigeren Calciumkonzentration (2 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) veränderte die Anwesenheit von 8-Bromo-cGMP die Aktivierungsgeschwindigkeit des Kanals nicht. Die Zeitkonstanten nahmen von etwa 0.6 ms bei -25 mV bis auf etwa 0.3 ms bei 0 mV kontinuierlich ab. Bei höherer Calciumkonzentration (20 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) aktivierte der BK-Kanal schneller als bei 2 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Zugabe von 3  $\mu\text{M}$  8-Bromo-cGMP verlangsamte die Aktivie-

nungsgeschwindigkeit der BK-Ströme jedoch wieder. In den Kontrollzellen fiel die Aktivierungszeitkonstante von  $\sim 0.4$  ms bei  $-35$  mV auf  $\sim 0.2$  ms bei  $0$  mV, mit 8-Bromo-cGMP hingegen von  $\sim 0.55$  ms ( $-35$  mV) auf  $\sim 0.25$  ms bei  $0$  mV ( $p < 0.01$  bei Depolarisation auf  $-30$  mV und  $-35$  mV).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der BK-Kanal der IHZ durch 8-Bromo-cGMP abhängig von der intrazellulären freien Calciumkonzentration beeinflusst wird. Bei sehr niedrigen Calciumkonzentrationen ( $[Ca^{2+}]_i = 2$  nM) führt 8-Bromo-cGMP zu höheren BK-Strömen, bei 10fach höherer Calciumkonzentration verursacht es dahingegen eine Reduktion der Ströme. Darüber hinaus aktivieren die Kanäle bei höheren Calciumkonzentrationen insgesamt schneller, 8-Bromo-cGMP verlangsamt diesen Effekt jedoch wieder.

## 6 Ergebnisse II: $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Reizweiterleitung in inneren Haarsinneszellen (IHZ). Sie vermitteln einen durch Depolarisation ausgelösten Calciumeinstrom, der die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat und damit die Weiterleitung des Stimulus an Spiralganglien-Neurone verursacht. Die in IHZ dominierende porenbildende  $\alpha_1$ -Untereinheit des Calciumkanals ist  $Ca_v1.3$  (Platzer et al., 2000). In Bezug auf die  $Ca_v\beta$ -( $\beta$ )-Untereinheit wird in IHZ der  $\beta_2$ -Untereinheit die wichtigste Rolle zugeschrieben (Neef et al., 2009). Die  $Ca_v\alpha_2\delta$ -Untereinheit ( $\alpha_2\delta$ ) ist wie die  $\beta$ -Untereinheit eine akzessorische Untereinheit von spannungsgesteuerten Calciumkanälen.

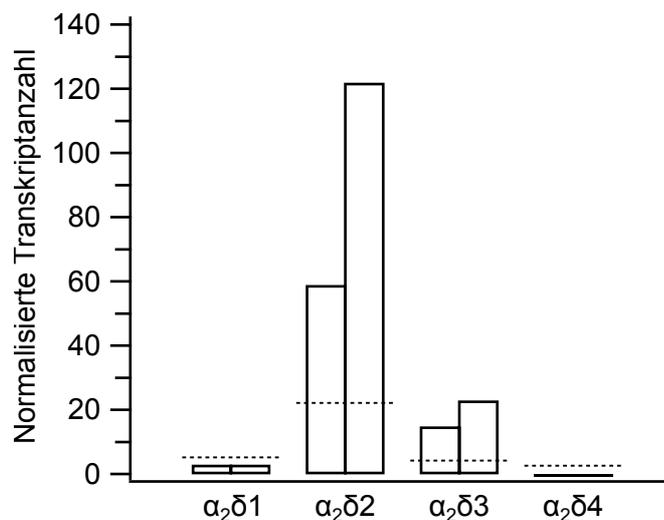
Die folgenden Kapitel stellen Versuchsergebnisse dar, die Aufschluss darüber geben sollen, welche der vier bekannten  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in IHZ vorkommen und inwiefern ein Funktionsverlust der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit die IHZ und das Hören beeinflusst.

### 6.1 $\alpha_2\delta$ -Transkripte in inneren und äußeren Haarsinneszellen der Maus (Prof. Dr. Gerald Obermair)

Um zu ermitteln, welche der vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen transkribiert werden, wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Die cDNA wurde mittels reverser Transkriptase aus mRNA isolierter Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen synthetisiert. Aufgrund der Reifung der Haarsinneszellen und den damit einhergehenden Änderungen des Calciumstroms ist es möglich, dass an dem Calciumkanal-Aufbau bei neonatalen Haarsinneszellen andere akzessorische Untereinheiten beteiligt sind als bei maturen. Daher wurden die Transkriptzahlen neonataler und maturer IHZ sowie ÄHZ bestimmt. Hierzu muss angemerkt werden, dass für den Nachweis der vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten und einer endogenen Kontrolle mit jeweiliger Doppelbestimmung das Ausgangsmaterial in 10 Einzelproben aufgeteilt wurde.

In neonatalen IHZ kam bei zwei unabhängigen, auf ein Haushaltsgen normalisierten cDNA-Proben von ca. 40 und 120 gepoolten Haarzellen die  $\alpha_2\delta_2$  Untereinheit mit 59 und 122 Mole-

külen am häufigsten vor. Für die  $\alpha_2\delta_3$ -mRNA wurden in diesen Zellen 15 und 23 Moleküle detektiert.  $\alpha_2\delta_1$  konnte kaum (je 3 Moleküle) und  $\alpha_2\delta_4$  überhaupt nicht nachgewiesen werden (Abbildung 6.1). Bei einer Probe mit 240 neonatalen ÄHZ (2 Proben mit je 120 ÄHZ gepoolt) wurde die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit mit 30 Molekülen nachgewiesen. Die anderen Untereinheiten zeigten geringere Molekülzahlen:  $\alpha_2\delta_1$  mit 6 Molekülen,  $\alpha_2\delta_3$  mit 5 Molekülen,  $\alpha_2\delta_4$  mit 3 Molekülen (nicht dargestellt). Insgesamt lagen die Werte teilweise über der Detektionsschwelle, jedoch unter der Quantifizierungsgrenze.



**Abbildung 6.1: Transkriptzahlen der  $\alpha_2\delta_1$  bis  $\alpha_2\delta_4$ -Untereinheiten in NMRI-Mäusen**

(A) Hprt1\*-normalisierte Transkriptzahlen zweier unabhängiger cDNA Proben mit 40 und 120 gepoolten, neonatalen IHZ. Die Detektionsschwellen sind mit gestrichelten Linien für jede  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit angedeutet. (\*Hprt1 = Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase)

Die Ergebnisse zu maturen IHZ und ÄHZ ergaben, dass die mRNA der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit vorherrschend vorkommt (nicht dargestellt). Zwar konnten trotz vieler Versuche die Detektionsschwellen nicht erreicht werden, jedoch lief bei einigen Proben eine Nullkontrolle ohne cDNA mit, wodurch dennoch Aussagen zum Vorhandensein der  $\alpha_2\delta_2$ -mRNA getroffen werden können. So konnte nur die  $\alpha_2\delta_2$ -mRNA in vier unabhängigen IHZ-Proben (40 – 170 Zellen pro Probe, teilweise Zellen aus mehreren Einzelproben gepoolt) mit 8, 9, 9 und 12 Molekülen vorhanden. In 5 Proben maturer ÄHZ (120 – 630 ÄHZ, teilweise Zellen aus mehreren Einzelproben gepoolt) wurden zwischen 6 und 21 Moleküle  $\alpha_2\delta_2$  detektiert.

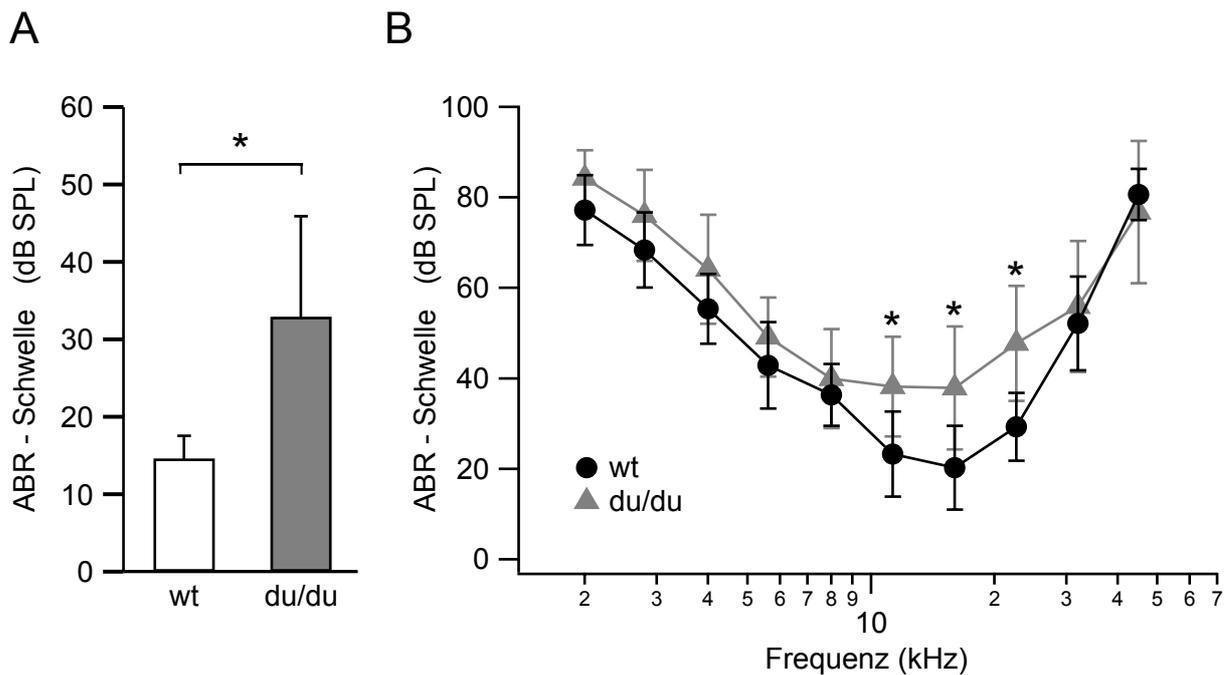
Insgesamt konnte sowohl in neonatalen als auch maturen IHZ und ÄHZ hauptsächlich  $\alpha_2\delta$ -mRNA nachgewiesen werden.

## **6.2 Hörmessungen an ducky-Mäusen (Prof. Dr. Bernhard Schick, Dr. Julia Dlugaiczky, Dipl.-Ing. Dietmar Hecker)**

Die in dieser Arbeit untersuchten ducky (du/du) - Mäuse haben eine Mutation in der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit. Diese könnte für den Calciumkanal in Haarsinneszellen ( $Ca_v1.3$ ) eine wichtige Funktion erfüllen. Mit ABR- (*auditory brainstem response*) und DPOAE- (*distortion products of otoacoustic emissions*) Messungen wurde an du/du-Mäusen untersucht, ob diese Mutation eine Beeinträchtigung in der Hörfunktion auslöst und damit eventuell eine zentrale Rolle für Haarsinneszellen hat.

### **6.2.1 ABR-Messungen**

ABR-Messungen wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob es bei du/du-Mäusen eine korrekte Reizweiterleitung von den Haarsinneszellen bis zum auditorischen Kortex gibt. Abbildung 6.2A zeigt die für Wildtyp- und du/du-Mäuse jeweils gemittelten ABR-Schwellen als Antwort auf Klick-Stimuli. Die ABR-Schwellen waren bei den du/du-Mäusen mit  $33.0 \text{ dB SPL} \pm 12.9 \text{ dB SPL}$  ( $n = 8/16$  Tiere/Ohren) signifikant höher als bei den Wildtyp-Mäusen, bei denen eine Schwelle von  $14.7 \text{ dB SPL} \pm 2.9 \text{ dB SPL}$  ( $n = 8/15$  Tiere/Ohren) gemessen wurde ( $p < 0.001$ ). Auch in den frequenzabhängigen ABR-Messungen zeigten sich bei den du/du-Mäusen erhöhte Schwellen (s. Abbildung 6.2B), die sich bei den Frequenzen 11.3, 16 und 22.6 kHz signifikant von ABR-Schwellen der Wildtyp-Mäusen unterschieden ( $p < 0.01$ ). Bei den Frequenzen 2, 2.8, 4, 5.6, 32 und 45 kHz gab es keinen signifikanten Unterschied in den ABR-Schwellen. Im Bereich von 2 – 5.6 kHz lagen die Mittelwerte der ABR-Schwellen der du/du-Mäuse jedoch stets höher als die der Wildtyp-Mäuse. Es ist wahrscheinlich, dass sich bei einer Erhöhung der Zahl der gemessenen Tiere auch bei diesen Frequenzen eine signifikante Schwellenerhöhung bei den du/du-Mäusen ergeben würde.

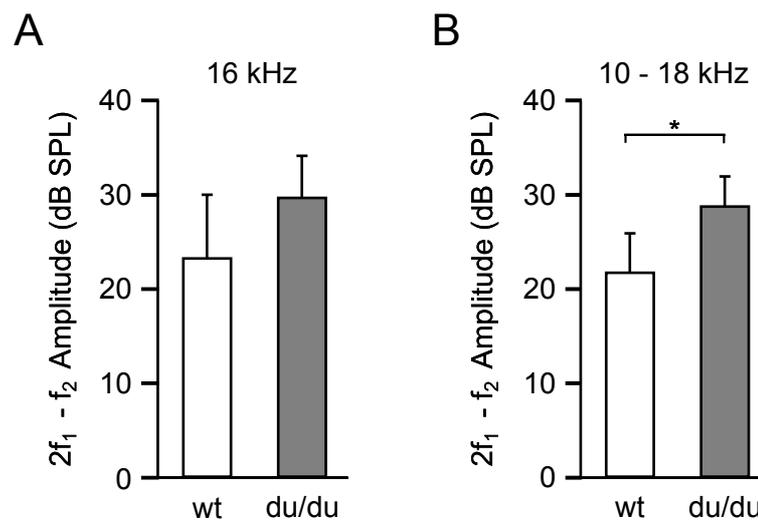


**Abbildung 6.2: ABR-Schwellen von du/du-Mäusen**

Mittelwerte  $\pm$  SD der ABR-Schwellen bei Klickreizen (**A**) oder Reintönen (**B**) bei Wildtyp- und du/du-Mäusen. **A:** Wildtyp: n = 8/16 Tiere/Ohren; du/du: n = 8/15 Tiere/Ohren; \*p < 0.001, Mann-Whitney-U-Test. **B:** ABR-Schwellen als Funktion der Frequenzen der Reintöne bei 2, 2.8, 4, 5.6, 11.3, 16, 22.3, 32 und 45 kHz; Wildtyp: n  $\leq$  8/16 Tiere/Ohren; du/du: n  $\leq$  7/14 Tiere/Ohren; \*p < 0.01, two-way ANOVA

### 6.2.2 DPOAE-Messungen

Um die Hörfunktion weiter zu untersuchen wurden DPOAE-Messungen durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber bringen, ob die cochleäre Verstärkung bei du/du-Mäusen beeinträchtigt war. Die Messungen erfolgten im Bereich des besten Hörens, zum Einen bei der Bestfrequenz von 16 kHz (Abbildung 6.3A), zum Anderen in 0.5 kHz-Schritten gemittelt über einen Bereich von 10 – 18 kHz (Abbildung 6.3B). Die maximale  $2f_1 - f_2$ -Amplitude über dem Hintergrundrauschen betrug für die 16 kHz Messung bei den du/du-Mäusen 29.8 dB SPL  $\pm$  4.3 dB SPL (n = 8) und bei den Wildtyp-Mäusen 23.4 dB SPL  $\pm$  6.6 dB SPL (n = 6). Die Erhöhung der DPOAE-Amplitude war bei der Mittelung über den Frequenzbereich von 10 – 18 kHz signifikant. Die Amplitude betrug 28.9 dB SPL  $\pm$  3.0 dB SPL (n = 8) bei du/du-Mäusen und 21.9 dB SPL  $\pm$  4.0 dB SPL (n = 6) bei Wildtyp-Mäusen (p < 0.01).



**Abbildung 6.3: DPOAE-Amplituden von  $du/du$ -Mäusen**

Mittelwerte + SD der maximalen  $2f_1 - f_2$ -Amplitude in dB SPL über dem Hintergrundrauschen. Wildtyp:  $n = 3/6$  Tiere/Ohren,  $du/du$ :  $n = 4/8$  Tiere/Ohren; **A**: DPOAE-Amplituden mit  $f_2 = 16$  kHz **B**: DPOAE-Amplituden mit  $f_2 = 10 - 18$  kHz, \* $p < 0.01$ , Mann-Whitney-U-Test

Diese Ergebnisse zeigten, dass die  $du/du$ -Mäuse ein verändertes Hörvermögen besitzen. Die ABR-Schwellen waren über einen großen Frequenzbereich, teilweise signifikant, erhöht. Im Bereich des besten Hörens (10 - 18 kHz) waren DPOAEs bei  $du/du$ -Mäusen vorhanden und wiesen gegenüber den Wildtyp-Mäusen sogar höhere Amplituden auf.

### 6.3 Charakterisierung der Calciumkanäle in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

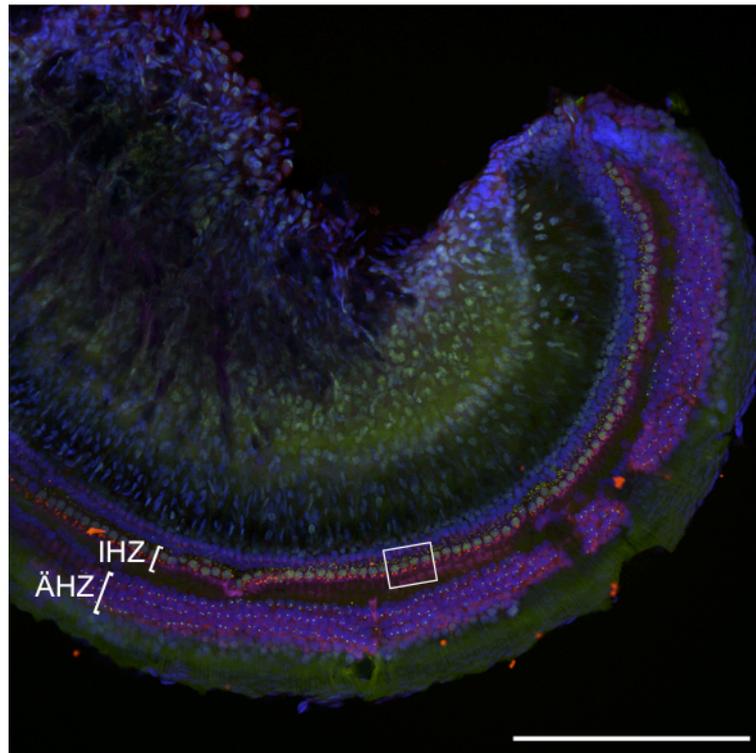
Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob die  $\alpha 2\delta 2$ -Mutation der  $du/du$ -Mäuse einen Einfluss auf die Lokalisation oder Funktion der Calciumkanäle ( $Ca_v1.3$ ) in inneren Haarsinneszellen hat. Dazu wurde ein  $Ca_v1.3$ -Antikörper getestet, die Lokalisation des Kanals sowie der Ribbon-Synapsen immunhistochemisch bestimmt und die Funktionalität des Kanals mittels elektrophysiologischen Messungen der Barium- und Calciumströme überprüft.

### **6.3.1 Lokalisation von Ribbon-Synapsen und Calciumkanälen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Die Mutation der du/du-Mäuse betrifft eine akzessorische Calciumkanal-Untereinheit ( $\alpha_2\delta_2$ ). Der  $Ca_v1.3$ -Antikörper wurde an einer  $Ca_v1.3$ -defizienten Maus auf Spezifität getestet. Immunhistochemische Experimente mit  $Ca_v1.3$ - und CtBP2/RIBEYE-Antikörpern sollten zeigen ob der in IHZ fast exklusiv vorkommende Calciumkanal  $Ca_v1.3$  bei du/du-Mäusen weiterhin exprimiert wird, ob die Ausbildung der Ribbon-Synapsen bei diesen Mäusen verändert ist und ob die Kolo-kalisation des Calciumkanals mit der Ribbon-Synapse noch vorhanden ist.

#### ***Überblick über das Corti-Organ***

Zur Orientierung in den Abbildungen der immunhistochemischen Versuche zeigt Abbildung 6.4 exemplarisch einen Überblick über das Präparat. Zu sehen ist die apikale Halbwindung des Corti-Organs, wie sie in allen Versuchen dieser Art verwendet wurde. Die Ribbon-Synapsen der IHZ und ÄHZ sind als grüne Punkte zu sehen. Die ÄHZ sind in drei Reihen nach außen orientiert zu sehen, die IHZ liegen weiter innen, d.h. zum Zentrum der Cochlea gerichtet. Außerdem ist in den IHZ eine Färbung des oberhalb der Zellkerne lokalisierten BK-Kanals (rote Punkte) zu sehen. In dieser Arbeit lag der Fokus auf den IHZ. Der weiße Rahmen in Abbildung 6.4 zeigt einen Bereich mit 3-5 IHZ, wie er typischerweise in allen folgenden, immunhistochemischen Abbildungen ausgewählt wurde.



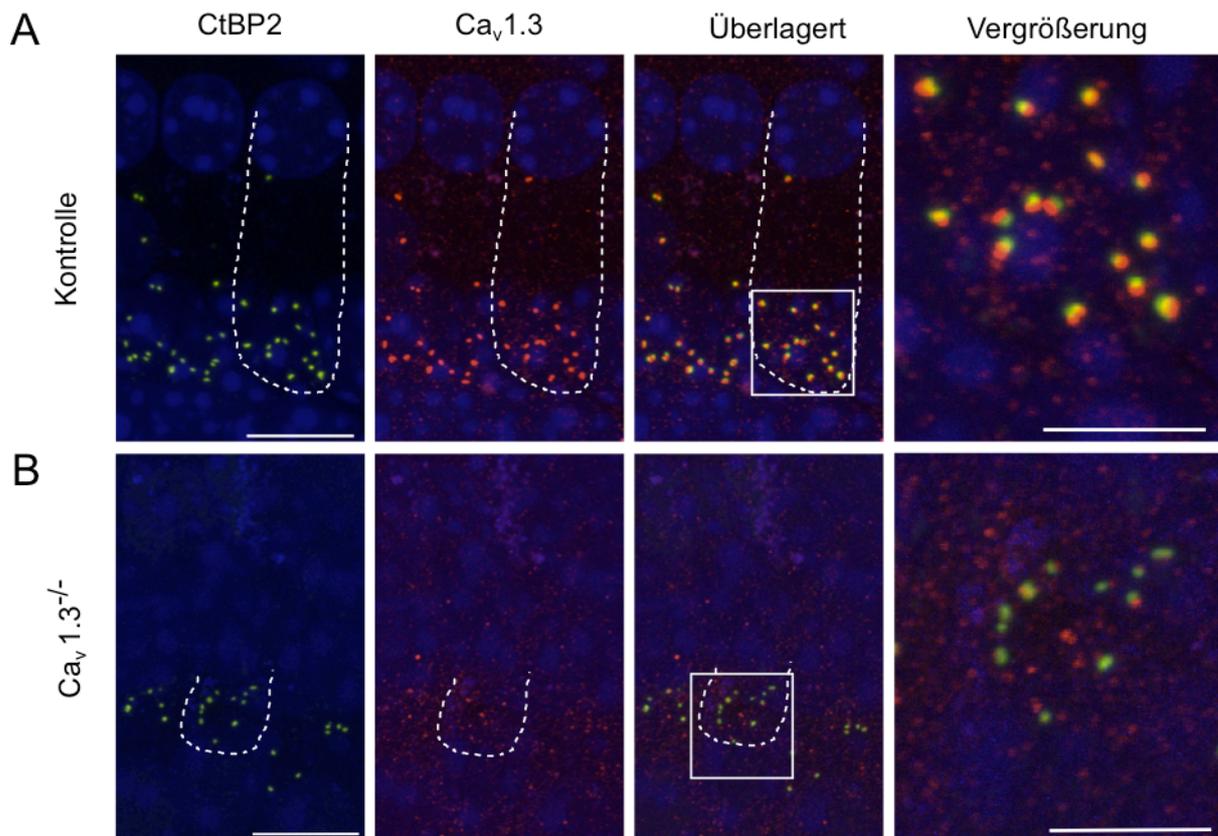
**Abbildung 6.4: Übersichtsaufnahme einer apikalen Windung des Corti-Organs**

Immunhistochemische Färbung eines *whole mount*-Präparats einer apikalen Windung des Corti-Organs, aufgenommen mit einem 20x-Objektiv ohne Immersion an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die Reihe IHZ und drei Reihen ÄHZ sind markiert. Es wurden primäre Antikörper gegen CtBP2/RIBEYE (grün) und den BK-Kanal (rot) eingesetzt, Zellkerne sind mit DAPI markiert (blau). Das weiße Rechteck umrahmt exemplarisch einen Bereich von etwa 3-5 IHZ, der in allen nachfolgenden immunhistochemischen Abbildungen jeweils mit einem 63x-Ölobjektiv betrachtet wurde. Maßstab: 200  $\mu$ m

**Test des  $Ca_v1.3$ -Antikörpers**

Einen ersten Hinweis, ob an der Verteilung der Calciumkanäle in IHZ von *du/du*-Mäusen etwas verändert ist, sollte ein immunhistochemischer Versuch mit einem entsprechenden Antikörper geben. Dazu wurde ein Antikörper der Firma Alomone, der gegen den in den Haarsinneszellen prominent vorkommenden  $Ca_v1.3$ -Kanal gerichtet ist, bei  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen ( $Ca_v1.3^{-/-}$ ; Platzer et al., 2000) getestet (Abbildung 6.5). An den zwei dargestellten Haarsinneszellen sind die Zellkerne (blau) am oberen Bildrand klar zu erkennen, außerdem die für Haarsinneszellen charakteristischen Ribbon-Synapsen (CtBP2/RIBEYE-Antikörper, grün dargestellt), die am basalen Zellpol liegen. Bei den Kontrolltieren fand sich

an jeder Ribbon-Synapse ebenfalls die Färbung des Calciumkanals, was in dem vergrößerten Bereich noch deutlicher zu sehen ist. Bei den  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen war die Calciumkanal-Färbung deutlich reduziert und schwächer. Vereinzelt Punkte wurden detektiert, jedoch war in der Vergrößerung keine Kolokalisation auszumachen ( $n = 2$   $Ca_v1.3^{-/-}$  Tiere mit je 3-6 Haarsinneszellen).



**Abbildung 6.5: Spezifität des  $Ca_v1.3$ -Antikörpers**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer heterozygoten Kontroll- (P20) (**A**) und einer  $Ca_v1.3$ -defizienten Maus ( $Ca_v1.3^{-/-}$ , P20) (**B**). Dargestellt sind jeweils zwei Haarszellen, wobei der Umriss des basalen Teils einer Haarszelle angedeutet ist (weiß gestrichelt). Der CtBP2/RIBEYE-Antikörper (grün) markiert die Ribbon-Synapsen. Die anti- $Ca_v1.3$ -Färbung ist in rot dargestellt. Zellkerne sind mit DAPI markiert (blau). Das jeweils letzte Bild in der Reihe zeigt eine Vergrößerung der überlagerten Färbung. Die gelben Punkte lassen auf eine Kolokalisation der beiden Antikörper schließen. Maßstäbe: Übersichten: 10  $\mu$ m, Vergrößerungen: 5  $\mu$ m

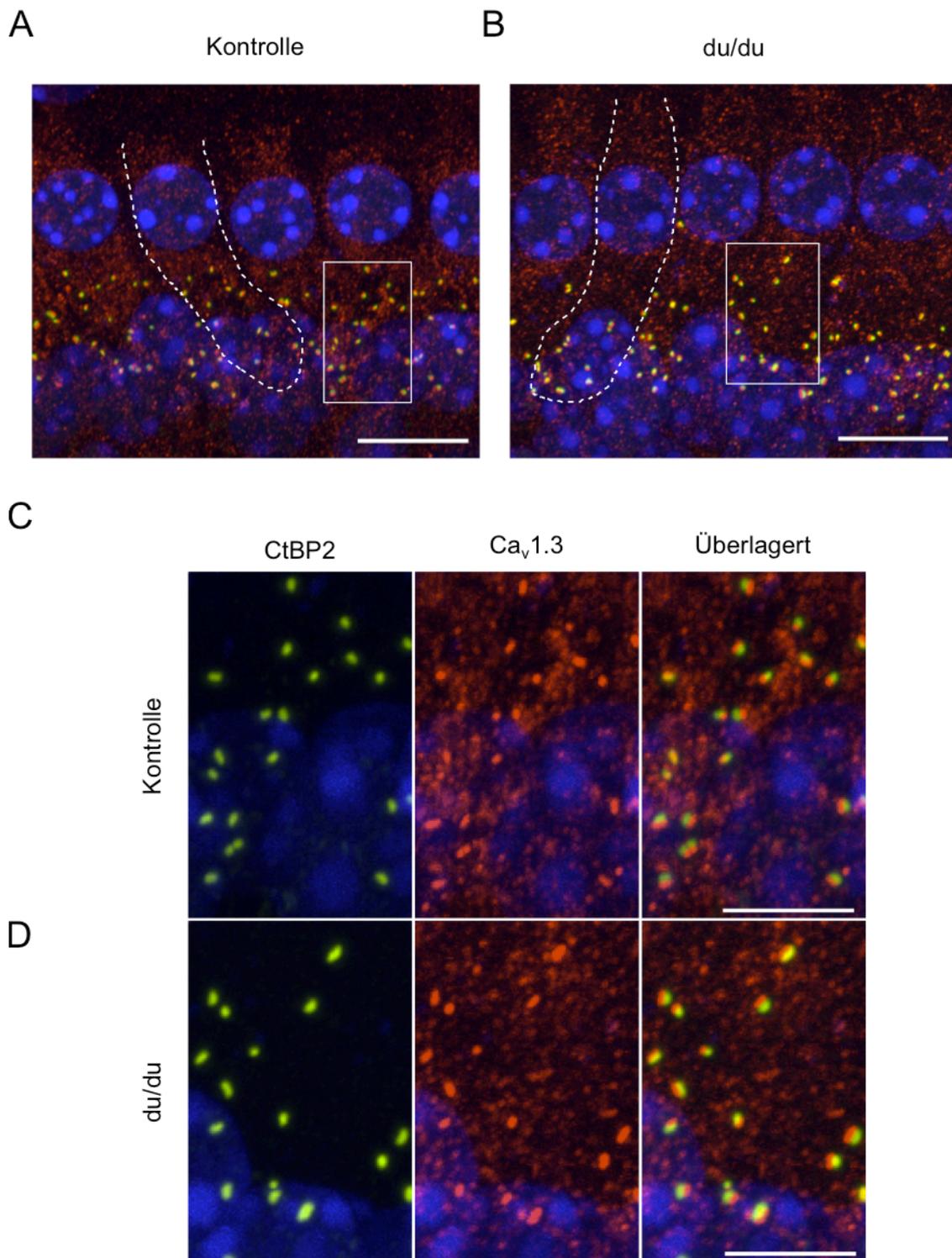
Der  $Ca_v1.3$ -Antikörper lieferte dann ein zuverlässiges Ergebnis, wenn er mit dem CtBP2/RIBEYE-Antikörper gleichzeitig eingesetzt wurde. Die in den  $Ca_v1.3$ -defizienten IHZ vorhandenen Fluoreszenzsignale bei Färbung mit dem  $Ca_v1.3$ -Antikörper wurden als relativ hoher, aber unspezifischer Hintergrund interpretiert.

### ***Anzahl der Ribbon-Synapsen***

Die Anzahl der Ribbon-Synapsen pro Zelle bei du/du- und Wildtyp-Mäusen wurde anhand immunhistochemischer Experimente unter Verwendung des CtBP2/RIBEYE-Antikörpers verglichen. IHZ von du/du- und Wildtyp-Mäusen besaßen eine ähnliche Anzahl an Ribbon-Synapsen in der apikalen Windung des Corti-Organs (du/du-Mäuse:  $15.3 \pm 3.4$  Ribbon-Synapsen pro Zelle;  $n = 7/6$  Präparate/Tiere mit je 3-6 Haarsinneszellen; Wildtyp-Mäuse:  $16.3 \pm 3.1$  Ribbon-Synapsen pro Zelle;  $n = 7/6$  Präparate/Tiere).

### ***Kolokalisation von Calciumkanal und Ribbon-Synapsen***

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob der Calciumkanal auch bei du/du-Mäusen noch mit den Ribbon-Synapsen kolokalisiert ist (Abbildung 6.6). Die Färbung des  $Ca_v1.3$ -Antikörpers war bei du/du- und Kontroll-Mäusen vorhanden und hob sich von der relativ hohen Hintergrundfärbung als stärker gefärbte und größere Punkte ab (s. auch Abbildung 6.5). Die vergrößerten Ausschnitte (Abbildung 6.6C, D) zeigen eine Kolokalisation des Calciumkanals mit den Ribbon-Synapsen bei beiden Genotypen. Eine Analyse mehrerer Färbungen ergab, dass an jeder Ribbon-Synapse in den IHZ von du/du-Mäusen eine Calciumkanal-Färbung vorhanden war ( $n = 3$  du/du-Mäuse mit je 3-6 IHZ), genau so, wie es auch in IHZ von Kontroll-Mäusen der Fall war ( $n = 3$  Kontroll-Mäuse mit je 3-6 IHZ).



**Abbildung 6.6: Kolokalisation von Ca<sub>v</sub>1.3 mit CtBP2/RIBEYE in IHZ der du/du-Maus**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer heterozygoten Kontroll- (**A, C**) und einer du/du-Maus (**B, D**). **A, B:** Übersicht über jeweils 5 IHZ, wobei der Umriss einer Haarzelle angedeutet ist (weiß gestrichelt). Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen, die Ca<sub>v</sub>1.3-Färbung ist in rot dargestellt, Zellkerne sind mit DAPI markiert

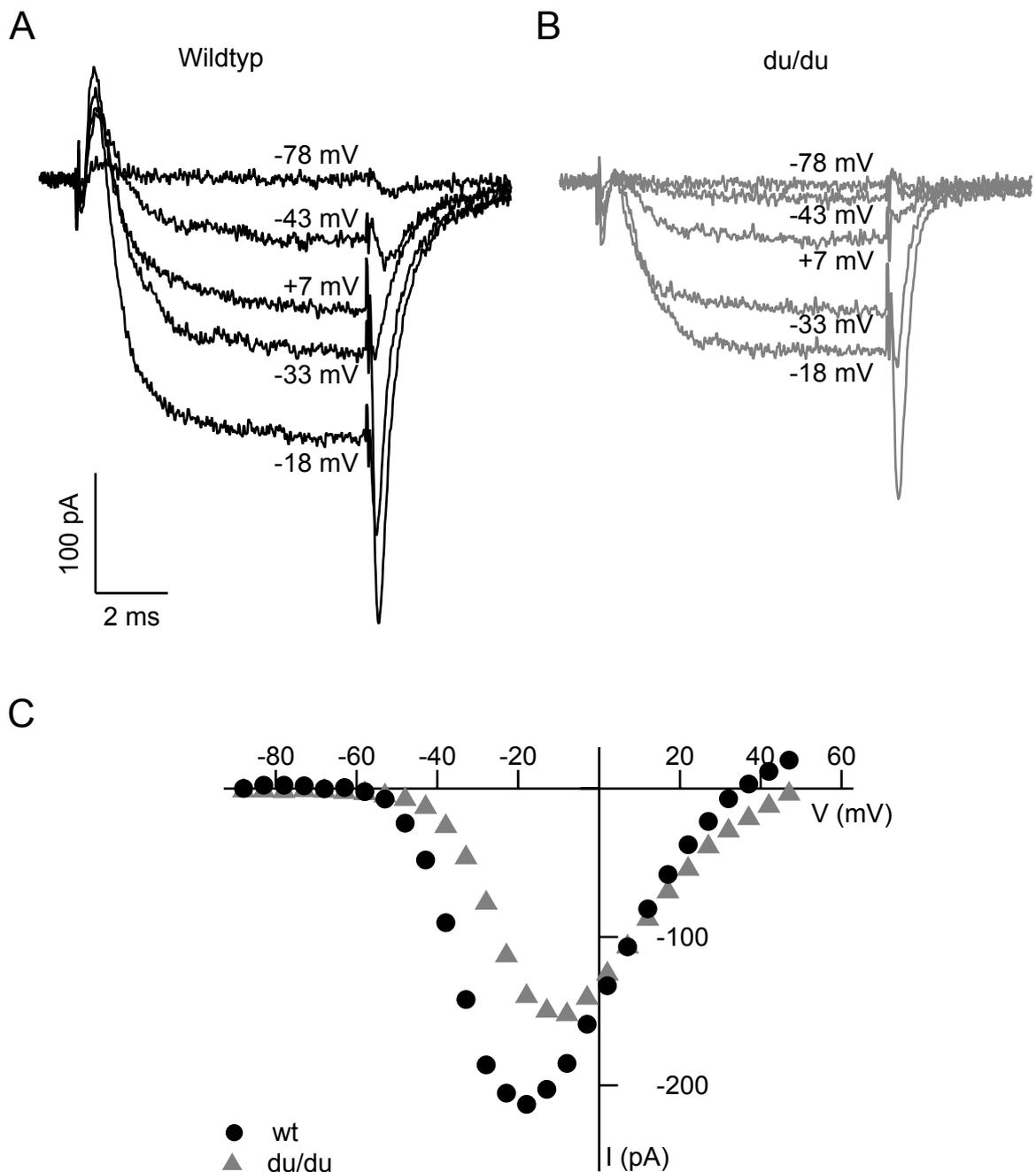
(blau). Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Weiße Rahmen deuten die Bereiche an, die unten als vergrößerte Einzelfärbungen dargestellt sind. **C, D:** Darstellung der Einzelfärbungen einer IHZ mit CtBP2/RIBEYE- (grün, links) und  $\text{Ca}_v1.3$ - (rot, Mitte) Antikörper. Rechts ist die Überlagerung der beiden Kanäle zu sehen. Zellkerne der Stützzellen sind mit DAPI markiert (blau). Maßstab: 5  $\mu\text{m}$

Die Lokalisation und Anzahl der Ribbon-Synapsen in IHZ der apikalen Windung des Corti-Organs waren durch die Mutation der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in du/du-Mäusen nicht verändert. Der Calciumkanal war in den IHZ der du/du-Mäuse vorhanden. Die Färbung des  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals, dessen Spezifität anhand der Färbungen einer  $\text{Ca}_v1.3$ -defizienten Maus ermittelt wurde, zeigte bei den du/du-Mäusen eine clusterförmige Kolo-kalisation mit den Ribbon-Synapsen. Mit elektrophysiologischen Messungen von Ganzzell-Strömen sollte nun überprüft werden, ob die Funktion der Calciumkanäle verändert ist.

### **6.3.2 Eigenschaften von Bariumströmen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Durch elektrophysiologische Ableitungen von Bariumströmen im Ganzzell-Modus wurde untersucht, ob die Funktion der Calciumkanäle apikaler IHZ von du/du-Mäusen durch die Mutation der akzessorischen Calciumkanal-Untereinheit  $\alpha_2\delta$  beeinträchtigt wird. Die Verwendung von Barium als Ladungsträger hat zum Einen den Vorteil, dass durch die Bariumionen Kaliumkanäle blockiert werden und somit eine Zugabe weiterer extrazellulärer Kaliumkanal-Antagonisten nicht mehr nötig ist. Zum Anderen kann das Inaktivierungsverhalten des Calciumkanals untersucht werden. Der Kanal inaktiviert mit Barium nur spannungsabhängig (*voltage dependent inactivation*, VDI), die calciumabhängige Inaktivierung bleibt jedoch aus (*calcium dependent inactivation*, CDI).

Die Abbildungen 6.7A und 6.7B zeigen Bariumströme zweier exemplarischer Zellen einer Wildtyp- und einer du/du-Maus als Antwort auf 8 ms andauernde Depolarisationen auf verschiedene Spannungen. Bei der Wildtyp-Zelle war der Bariumstrom bei einer Depolarisation auf -18 mV mit 210 pA maximal, während der Strom der du/du-Zelle bei dieser Depolarisation mit ungefähr 130 pA um etwa 40 % kleiner war. Abbildung 6.7C zeigt in dem Zeitraum von 7-8 ms nach Depolarisationsbeginn gemittelte Strom-Spannungskurven (*I-V*-Kurven) der Beispielen. Neben dem reduzierten Bariumstrom der du/du-Zelle wird hier ebenfalls deutlich, dass die *I-V*-Kurve in Richtung positiver Potentiale verschoben ist.

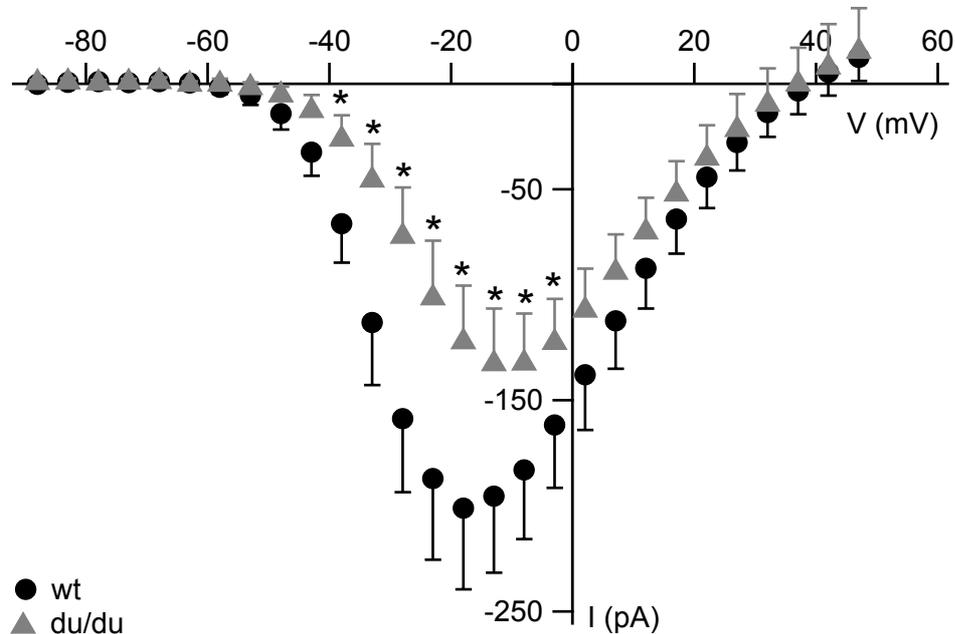


**Abbildung 6.7: Exemplarische Bariumströme in IHZ der du/du-Maus**

Repräsentative Bariumströme einer Wildtyp- (wt, P21) **(A)** und einer du/du-IHZ (P23) **(B)**. Ausgewählte Stromspuren in Antwort auf 8 ms andauernde Depolarisationen zu den angegebenen Spannungswerten mit 10 mM Bariumchlorid in der Extrazellulärlösung. **C**: Strom-Spannungskurven zu den in A und B gezeigten Zellen, gemittelt zwischen Sekunde 7 und 8 nach Beginn der Depolarisation.

Die Mittelung der *I-V*-Kurven aller gemessenen IHZ (Abbildung 6.8) bestätigte das Ergebnis der gezeigten Einzelzellen: Die *I-V*-Kurve der du/du-Zellen war in Richtung positiver Poten-

tiale verschoben und der Bariumstrom war über den Spannungsbereich von etwa -38 bis -1 mV signifikant geringer als bei den Wildtyp-Zellen (\* $p < 0.01$ ).

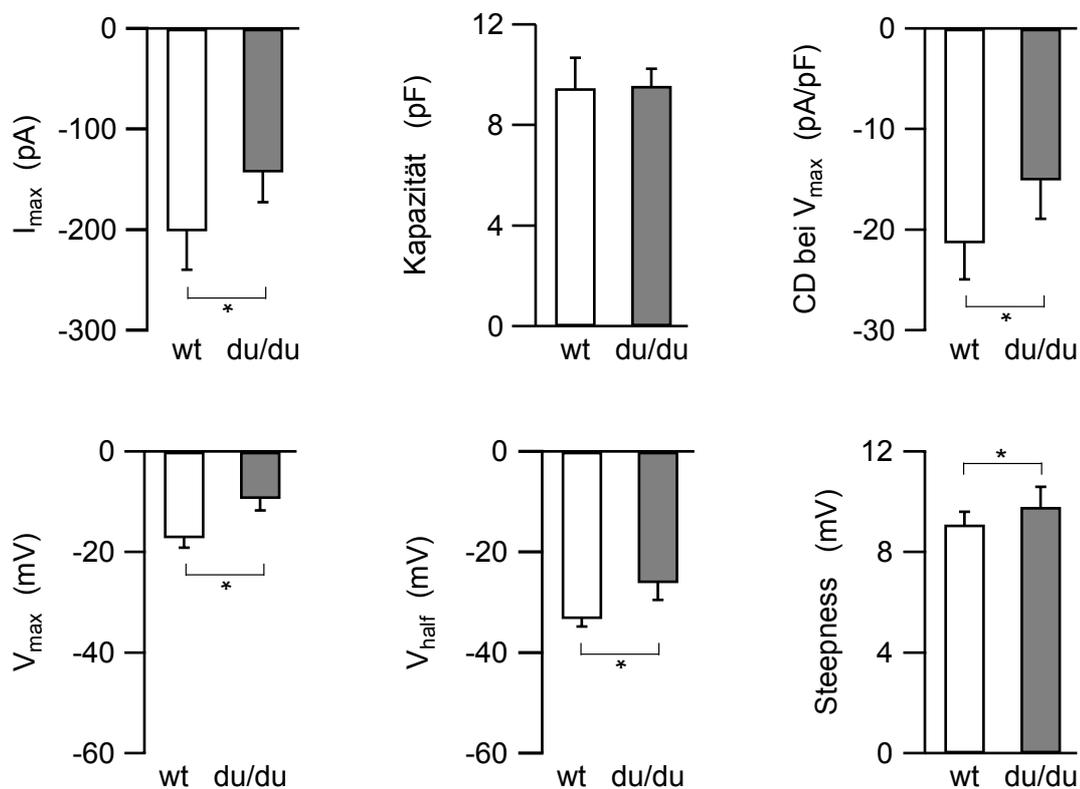


**Abbildung 6.8: Strom-Spannungskurven der Bariumströme in IHZ von du/du-Mäusen**

Gemittelte Strom-Spannungskurven  $\pm$  SD von Wildtyp- (wt) und du/du-Mäusen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Standardabweichung jeweils nur in eine Richtung dargestellt. Die Ströme wurden mit 10 mM Barium in der Extrazellulärlösung gemessen. Wildtyp-Zellen:  $n = 12$ ; du/du-Zellen:  $n = 11$ ; \* $p < 0.01$ , *two-way* ANOVA

Abbildung 6.9 zeigt die Eigenschaften der IHZ und deren Bariumströme, die aus den einzelnen *I-V*-Kurven und den daran angelegten Boltzmann-Fits ermittelt wurden. Der maximale Bariumstrom  $I_{\max}$  der du/du-Zellen war mit  $-142.9 \text{ pA} \pm 29.6 \text{ pA}$  ( $n = 11$ ) vom Betrag her um 30 % geringer als in den Wildtyp-Zellen ( $-201.6 \text{ pA} \pm 38.3 \text{ pA}$ ,  $n = 12$ ;  $p < 0.01$ ). Die gemittelten Kapazitäten und damit die Zellgrößen unterschieden sich hingegen nicht (du/du:  $9.6 \text{ pF} \pm 0.7 \text{ pF}$ ; Wildtyp:  $9.5 \text{ pF} \pm 1.2 \text{ pF}$ ). Daraus folgte, dass auch die für jede Zelle individuell aus Maximalstrom und Kapazität errechneten Stromdichten (CD bei  $V_{\max}$ ) der du/du-Zellen im Mittel mit  $-15.1 \text{ pA/pF} \pm 3.8 \text{ pA}$  um 30 % gegenüber den Wildtyp-Zellen mit  $-21.3 \text{ pA/pF} \pm 3.6 \text{ pA}$  reduziert waren ( $p < 0.01$ ). Die Spannung, bei welcher der maximale Bariumstrom erreicht wurde ( $V_{\max}$ ), lag für die du/du-Zellen bei  $-9.4 \text{ mV} \pm 2.3 \text{ mV}$  und damit um 7.8 mV positiver als bei den Wildtyp-Zellen ( $-17.2 \text{ mV} \pm 1.9 \text{ mV}$ ;  $p < 0.001$ ). Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen ( $V_{\text{half}}$ ), die aus dem Boltzmann-Fit an die Strom-

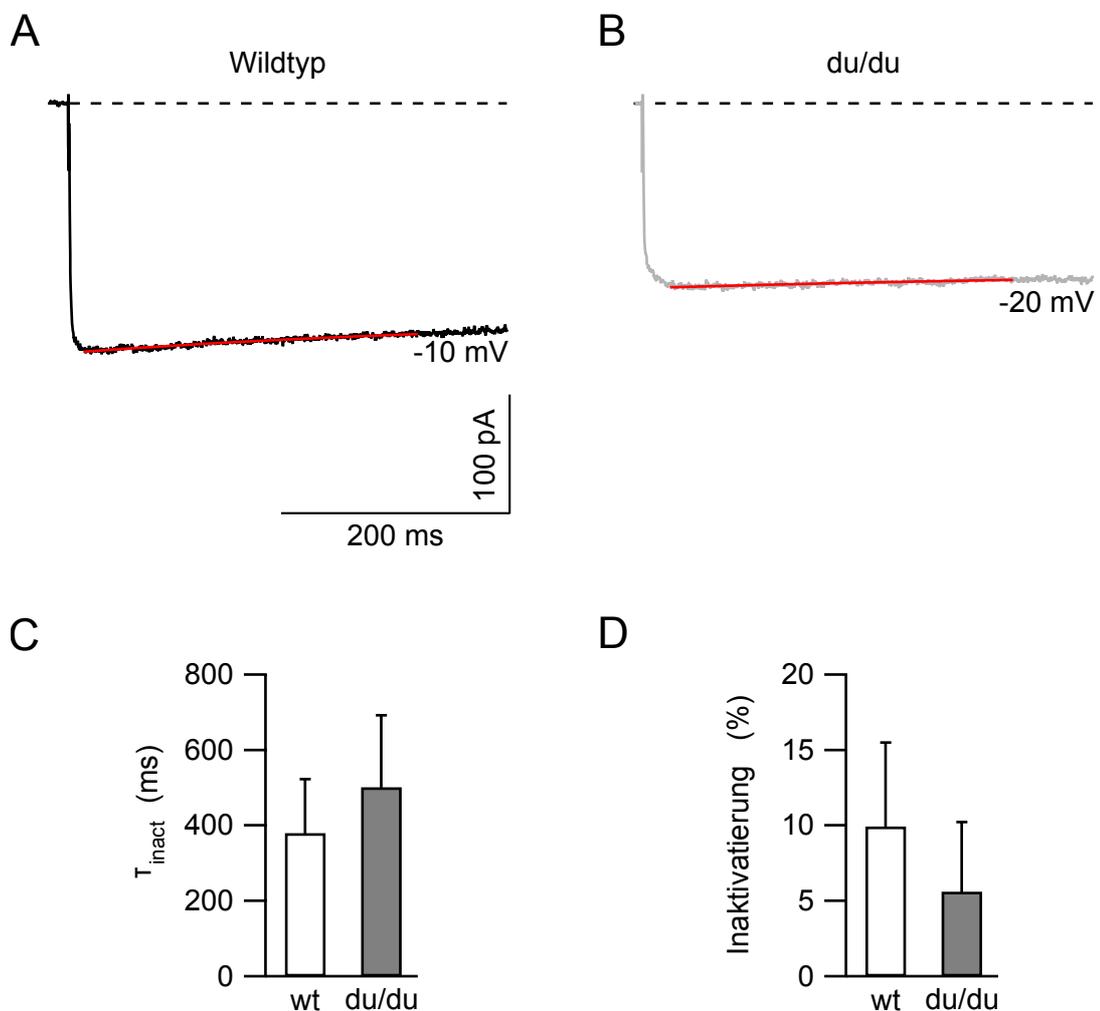
Spannungskurven ermittelt wurden, bestätigten die Rechtsverschiebung der  $I$ - $V$ . Die halbmaximale Aktivierungsspannung betrug für die  $du/du$ -Zellen  $-26.1 \text{ mV} \pm 3.4 \text{ mV}$  und für die Wildtyp-Zellen  $-33.3 \text{ mV} \pm 1.5 \text{ mV}$  ( $p < 0.001$ ), d. h. die Aktivierung der Bariumströme war in den  $du/du$ -Zellen im Mittel um  $7.2 \text{ mV}$  zu positiven Spannungen hin verschoben. Die Steepness, ein Maß für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, die ebenfalls aus dem Boltzmann-Fit hervorgeht, war mit  $9.8 \text{ mV} \pm 0.8 \text{ mV}$  ( $du/du$ -Zellen) und  $9.1 \text{ mV} \pm 0.5 \text{ mV}$  (Wildtyp) signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ).



**Abbildung 6.9: Parameter der Bariumströme in IHZ von  $du/du$ -Mäusen**

Mittelwerte  $\pm$  SD der Eigenschaften der Bariumströme von Wildtyp- ( $n = 12$ ) und  $du/du$ -Zellen ( $n = 11$ ) im Vergleich. Obere Reihe: maximaler Bariumstrom  $I_{\max}$ , Kapazität, Stromdichte (CD bei  $V_{\max}$ ; \* $p < 0.05$ ). Untere Reihe: Maximale Spannung  $V_{\max}$ , halbmaximale Aktivierungsspannung  $V_{\text{half}}$ , Steepness als Maß für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.  $V_{\text{half}}$  und Steepness wurden aus dem Produkt von Boltzmann-Funktion und treibender Spannung ermittelt, mit dem die Strom-Spannungskurven angepasst wurden. \* $p < 0.01$  für  $I_{\max}$  und CD bei  $V_{\max}$ , \* $p < 0.001$  für  $V_{\text{half}}$  und  $V_{\max}$ , \* $p < 0.05$  für Steepness, Mann-Whitney-U-Test

Die spannungsabhängige Inaktivierung, die mit Barium als Ladungsträger gemessen werden kann, zeigte keinen Unterschied in den IHZ von du/du-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Abbildung 6.10 zeigt exemplarische Inaktivierungsströme bei -10 mV (Wildtyp) und -20 mV (du/du) während 400 ms andauernder Depolarisationen. In beiden Fällen war nur eine leichte Inaktivierung des Stroms zu sehen. Die mittlere Strominaktivierung nach 300 ms war bei den du/du-Zellen mit  $5.6 \% \pm 2.4 \%$  ( $n = 9$ ) ähnlich gering wie bei den Wildtyp-Zellen ( $10 \% \pm 5.6 \%$ ,  $n = 10$ ). Die Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{inact}}$ ), die aus den an die Stromspuren angelegten, monoexponentiellen Fits ermittelt wurden, zeigten mit  $501.6 \text{ ms} \pm 190.9 \text{ ms}$  für du/du-IHZ und  $380.4 \text{ ms} \pm 142.7 \text{ ms}$  für Wildtyp-IHZ keinen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 6.10: Inaktivierung von Bariumströmen in IHZ von du/du-Mäusen**

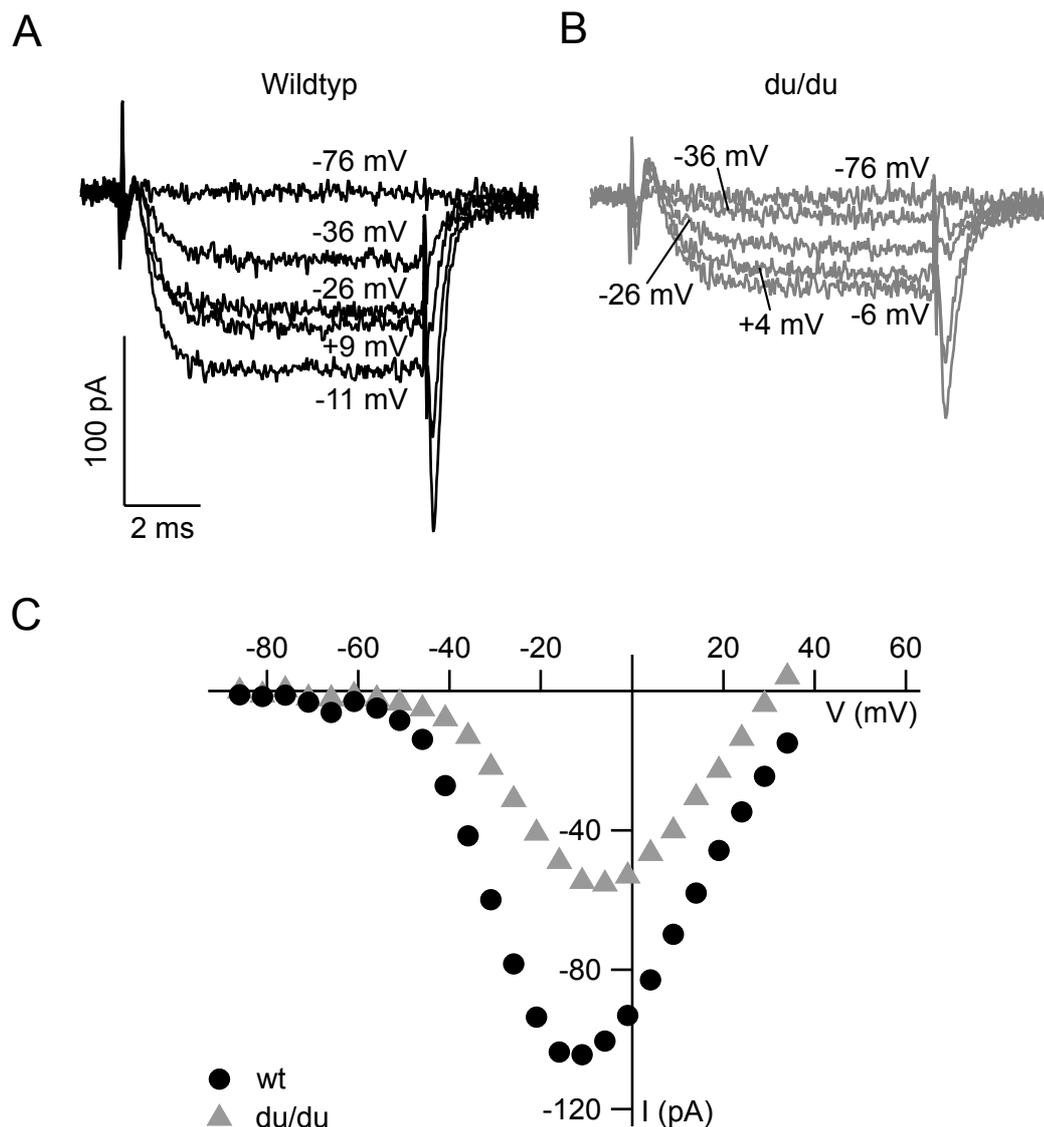
Exemplarische Barium-Inaktivierungsströme einer Wildtyp- (wt, P23) (A) und einer du/du-Zelle (P22) (B) in Antwort auf 400 ms andauernde Depolarisationen zu den angegebenen Spannungswerten

( $V_{max}$ ). Die rote Linie stellt den monoexponentiellen Fit zur Berechnung der Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{inact}$ ) dar. Mittelwerte + SD der Inaktivierungszeitkonstanten (**C**) und Grad der Inaktivierung (**D**) der Bariumströme nach 300 ms. Wildtyp-Zellen:  $n = 10$ ; du/du-Zellen:  $n = 9$

Zusammenfassend war der maximale Bariumeinstrom in IHZ der apikalen Windung des Corti-Organs bei du/du-Mäusen um 30 % reduziert. Die ermittelte Strom-Spannungskurve war um etwa 7 mV in Richtung depolarisierender Potentiale verschoben und zeigte über den Spannungsbereich von etwa -38 mV bis -1 mV einen signifikant geringeren Bariumeinstrom. Zudem zeigte der Bariumstrom der du/du-Zellen eine etwas geringere Spannungsabhängigkeit für die Aktivierung.

### **6.3.3 Eigenschaften von Calciumströmen in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Um den Calciumkanal apikaler IHZ der du/du-Mäuse weiter zu charakterisieren, wurden Calciumströme mit 10 mM Calciumchlorid in der Extrazellulärlösung gemessen. Diese Lösung wurde nicht über das Bad appliziert, sondern mit einer Applikationspipette während der Ableitung lokal über die Zellen gespült, um andere Teile des Präparats zu schonen. Abbildung 6.11 zeigt Beispiele solcher Ströme von einer Wildtyp- und einer du/du-Zelle mit den daraus berechneten  $I$ - $V$ -Kurven. Der Calciumstrom erreichte sein Maximum bei Depolarisation auf -11 mV in der Wildtyp-Zelle und -6 mV in der du/du-Zelle. Auch bei der  $I$ - $V$ -Kurve zeigte sich bei Potentialen ab etwa -40 mV ein kleinerer Calciumeinstrom in die du/du- als in die Wildtyp-IHZ. Des Weiteren erreichte die du/du-Zelle ihren Maximaleinstrom erst bei einer Depolarisation auf einen höheren Spannungswert.

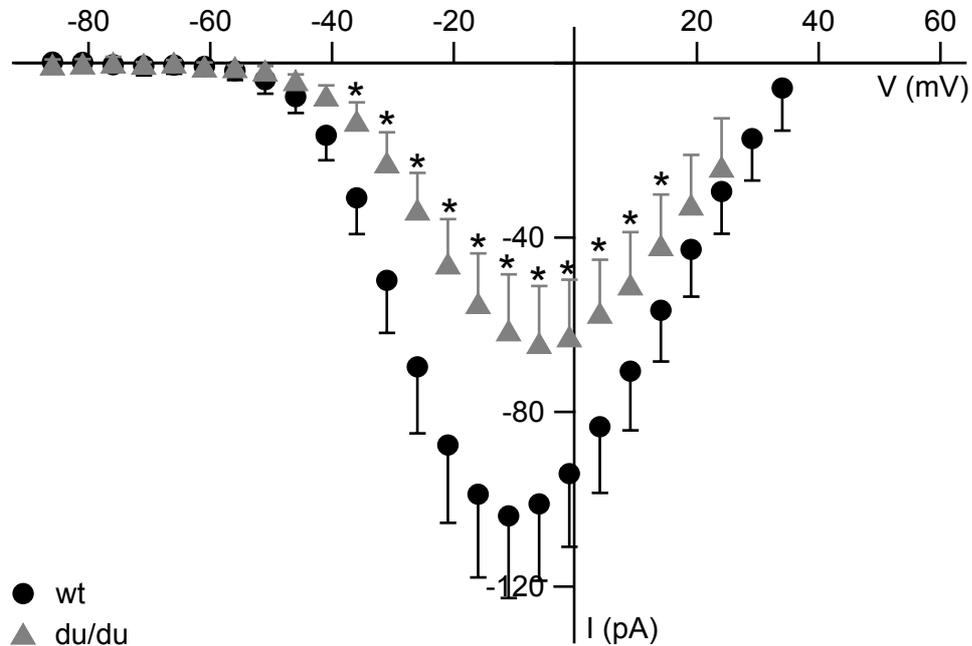


**Abbildung 6.11: Exemplarische Calciumströme in IHz der du/du-Maus**

Repräsentative Calciumströme einer Wildtyp (wt, P20) - **(A)** und einer du/du-Zelle (P21) **(B)**. Ausgewählte Stromspuren als Antworten auf 8 ms andauernde Depolarisationen auf die angegebenen Spannungswerte mit 10 mM Calciumchlorid und Kaliumkanal-Blockern in der Extrazellulärlösung. **C**: Strom-Spannungskurven zu den in A und B gezeigten Zellen, gemittelt zwischen Sekunde 7 und 8 nach Beginn der Depolarisation.

Was diese Einzelbeispiele von Calciumströmen der IHz bereits zeigten, bestätigten auch hier die gemittelten  $I$ - $V$ -Kurven (Abbildung 6.12). Der mittlere Calciumeinstrom der du/du-Zellen war kleiner als der der Wildtyp-Zellen. Ab der Öffnung des Kanals bei Spannungswerten von etwa -40 mV zeigten sich bei den nachfolgend gemessenen Potentialsprüngen kleinere Stromwerte, die über den Bereich von -36 mV bis +12 mV signifikant unterschiedlich waren

( $p < 0.01$ ). Auch der Maximalstrom wurde in den du/du-Zellen mit  $-5.2 \text{ mV} \pm 1.9 \text{ mV}$  ( $n = 12$ ) erst bei höheren Spannungen erreicht als in den Wildtyp-Zellen ( $-10.3 \text{ mV} \pm 1.8 \text{ mV}$ ,  $n = 20$ ).

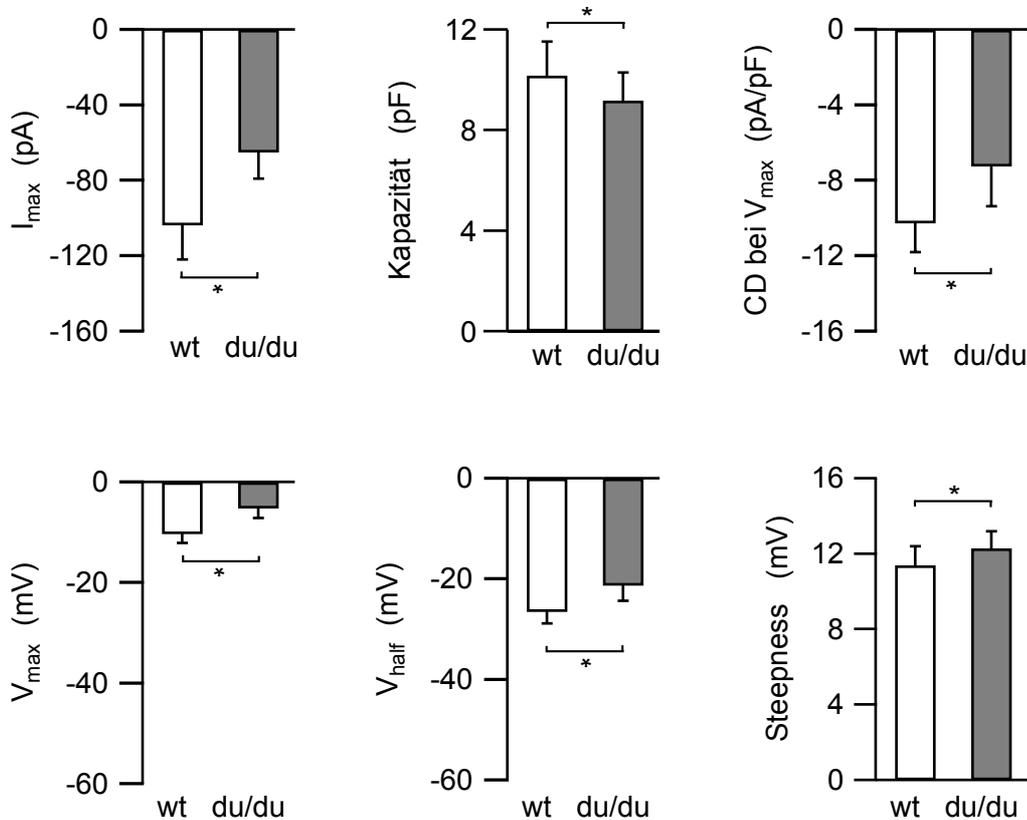


**Abbildung 6.12: Strom-Spannungskurven der Calciumströme in IHZ von du/du-Mäusen**

Gemittelte Strom-Spannungskurven  $\pm$  SD von Wildtyp (wt)- und du/du-Mäusen (s. zum Vergleich mit Bariumströmen Abbildung 6.8. Wildtyp-Zellen:  $n = 20$ ; du/du-Zellen:  $n = 12$ ; \* $p < 0.01$ , two-way ANOVA

Die sich aus den Boltzmann-Fits an die  $I$ - $V$ -Kurven ergebenden Parameter sind zusammen mit den Zellkapazitäten in Abbildung 6.13 gezeigt. Der maximale Calciumeinstrom  $I_{\max}$  war mit  $-65.1 \text{ pA} \pm 14.0 \text{ pA}$  ( $n = 12$ ) in den du/du-Zellen signifikant reduziert (Wildtyp:  $-103.8 \text{ pA} \pm 18.2 \text{ pA}$ ,  $n = 20$ ;  $p < 0.001$ ). Bei diesen Messungen waren die Kapazitäten der du/du-Zellen kleiner (du/du:  $9.2 \text{ pF} \pm 1.1 \text{ pF}$ ; Wildtyp:  $10.2 \text{ pF} \pm 1.4 \text{ pF}$ ;  $p < 0.05$ ). Die sich aus dem individuellen maximalen Calciumeinstrom und der zugehörigen Kapazität ergebende Stromdichte (CD bei  $V_{\max}$ ) war im Mittel bei den du/du-Zellen um 30 % reduziert (du/du:  $-7.3 \text{ pA/pF} \pm 2.1 \text{ pA/pF}$ , Wildtyp:  $-10.3 \text{ pA/pF} \pm 1.5 \text{ pA/pF}$ ;  $p < 0.001$ ). Sowohl  $V_{\max}$  (du/du:  $-5.2 \text{ mV} \pm 1.9 \text{ mV}$ ; Wildtyp:  $-10.3 \text{ mV} \pm 1.8 \text{ mV}$ ;  $p < 0.001$ ) als auch die aus dem Boltzmann-Fit berechnete halbmaximale Aktivierungsspannung  $V_{\text{half}}$  (du/du:  $-21.3 \text{ mV} \pm 2.9 \text{ mV}$ ; Wildtyp:  $-26.5 \text{ mV} \pm 2.3 \text{ mV}$ ;  $p < 0.001$ ) waren um 5 mV in Richtung positiver Potentiale verschoben. Die Steepness war mit  $12.3 \text{ mV} \pm 0.9 \text{ mV}$  in den du/du-Zellen leicht erhöht (Wildtyp:  $11.4 \text{ mV} \pm 1.0 \text{ mV}$ ;  $p < 0.05$ ), d. h. die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Calciumstroms war bei den

du/du-Zellen leicht vermindert. Auch der Leckwiderstand war bei diesen Messungen signifikant unterschiedlich (du/du:  $1848 \text{ M}\Omega \pm 430 \text{ M}\Omega$ ; Wildtyp:  $2296 \text{ M}\Omega \pm 621 \text{ M}\Omega$ ;  $p < 0.05$ ).

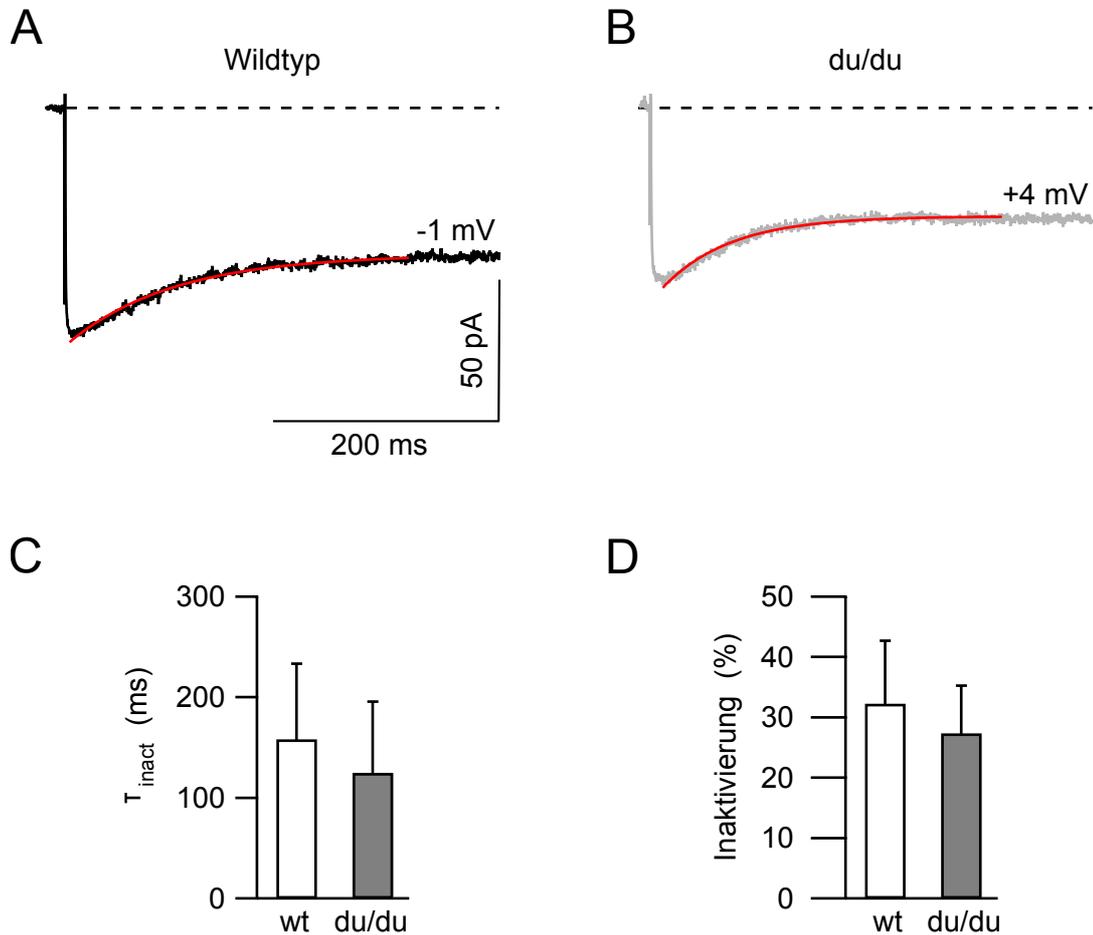


**Abbildung 6.13: Parameter der Calciumströme in IHZ von du/du-Mäusen**

Mittelwerte  $\pm$  SD der Eigenschaften der Calciumströme in Wildtyp- (wt;  $n = 20$ ) und du/du-Zellen ( $n = 12$ ) im Vergleich. Obere Reihe: maximaler Calciumstrom  $I_{\max}$ , Kapazität, Stromdichte (CD bei  $V_{\max}$ ; \* $p < 0.001$  für  $I_{\max}$  und CD; \* $p < 0.05$  für). Untere Reihe: Maximale Spannung  $V_{\max}$ , halbmaximale Aktivierungsspannung  $V_{\text{half}}$ , Steepness als Maß für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.  $V_{\text{half}}$  und Steepness wurden aus den Boltzmann-Fits errechnet, die an die Strom-Spannungskurven gelegt wurden. \* $p < 0.001$  für  $I_{\max}$ , CD,  $V_{\max}$ ,  $V_{\text{half}}$ , und CD; \* $p < 0.05$  für Kapazität und Steepness, Mann-Whitney-U-Test

Beispielströme der Inaktivierung von Calciumströmen in IHZ zeigt Abbildung 6.14. Die Inaktivierung des Stroms ist stärker als bei den Messungen mit Barium als Ladungsträger, da auch die calciumabhängige Inaktivierung hier zum Tragen kommt. Zwischen den beiden Zelltypen gab es keinen auffälligen Unterschied. Es wurde eine Inaktivierung des Calciumstroms nach 300 ms um  $27.4 \% \pm 7.9 \%$  bei den du/du-Mäusen ( $n = 12$ ) und um  $32.3 \% \pm 10.4 \%$  bei den

Wildtyp-Mäusen ( $n = 13$ ) gemessen. Auch die Zeitkonstanten der Inaktivierung zeigten keinen signifikanten Unterschied (du/du:  $125.1 \text{ ms} \pm 70.8 \text{ ms}$ ; Wildtyp:  $158.4 \text{ ms} \pm 75.0 \text{ ms}$ ).



**Abbildung 6.14: Inaktivierung von Calciumströmen in IHZ von du/du-Mäusen**

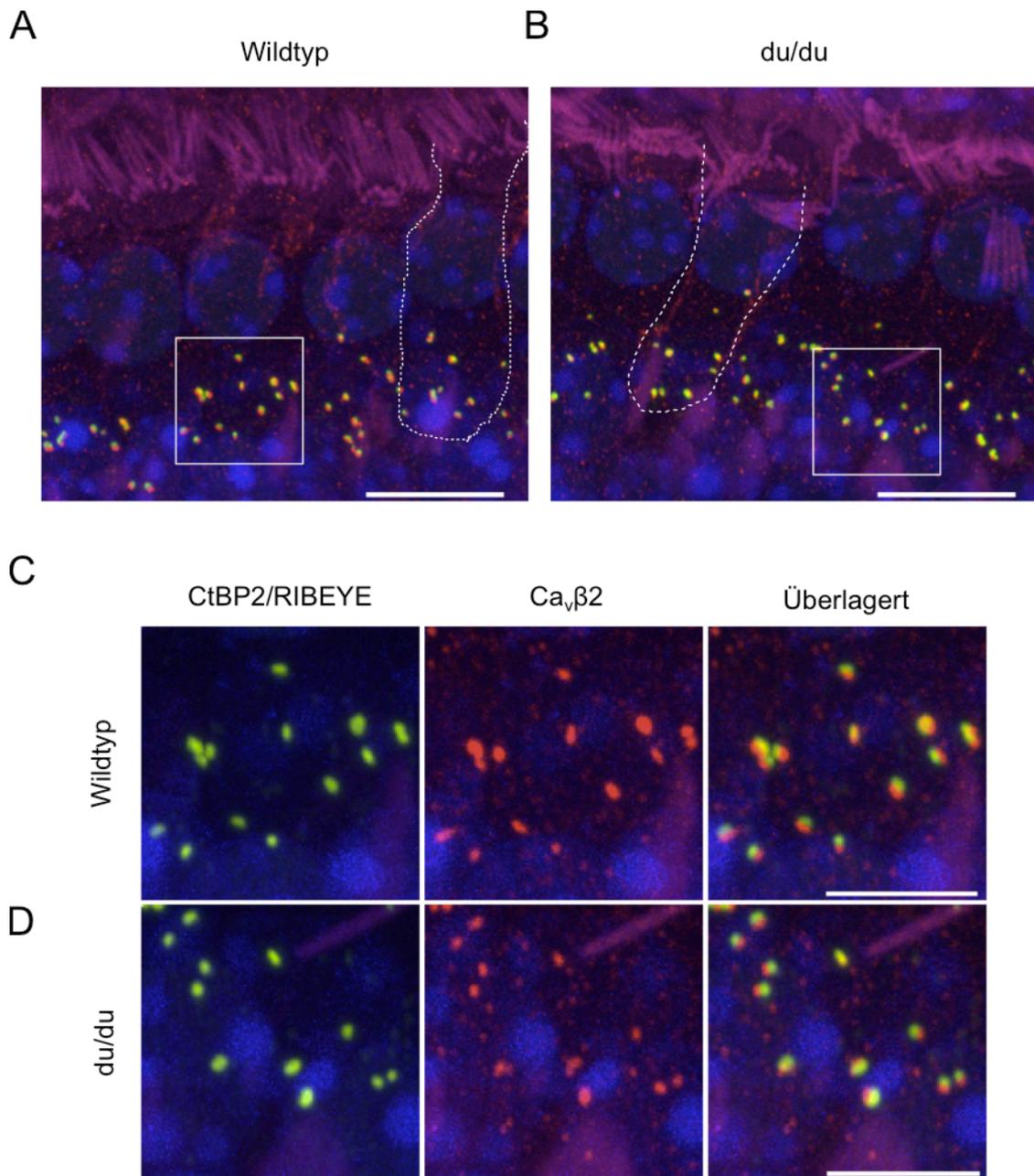
Repräsentative Calciumströme einer Wildtyp- (wt, P20) (A) und einer du/du-Zelle (P19) (B) auf 400 ms andauernde Depolarisationen auf die angegebenen Spannungswerte zur Berechnung der Inaktivierung. Die rote Linie stellt den monoexponentiellen Fit zur Berechnung der Inaktivierungszeitkonstanten und der Inaktivierung des Stroms nach 300 ms dar. Mittelwerte + SD der Inaktivierung (C) und Grad der Inaktivierung (D) des Stroms nach 300 ms. Wildtyp-Zellen,  $n = 13$ ; du/du-Zellen,  $n = 12$

Über die Calciumkanal-Eigenschaften in apikalen IHZ der du/du-Mäuse lässt sich zusammengefasst sagen, dass der maximale Calciumeinstrom um 30 % reduziert war. Die gemittelte Strom-Spannungskurve des Calciumstroms der du/du-Zellen war um 5 mV in Richtung depolarisierender Potentiale hin verschoben und zeigte bei allen Potentialen einen gerin-

geren Calciumeinstrom. Der Wert für die halbmaximale Aktivierung des Calciumstroms  $V_{\text{half}}$  der du/du-Zellen war ebenfalls um 5 mV zu positiven Potentialen verschoben. Die Zellkapazität war in den du/du-Zellen leicht reduziert und der Calciumstrom der du/du-Zellen zeigte eine etwas geringere Spannungsabhängigkeit für die Aktivierung.

#### **6.3.4 $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Der Calciumkanal besteht aus der  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -, der  $\beta$ - und der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit. Um zu testen, ob der Verlust der  $\alpha_2\delta$  Untereinheit einen Einfluss auf die bisher als in IHZ dominant vorkommende  $\beta_2$ -Untereinheit (Neef et al., 2009) hat, wurde diese zusammen mit den dem CtBP2/RIBEYE-Antikörper gefärbt (Abbildung 6.15).



**Abbildung 6.15: Vorkommen der  $\text{Ca}_v\beta 2$ -Untereinheit in IHZ der *du/du*-Maus**

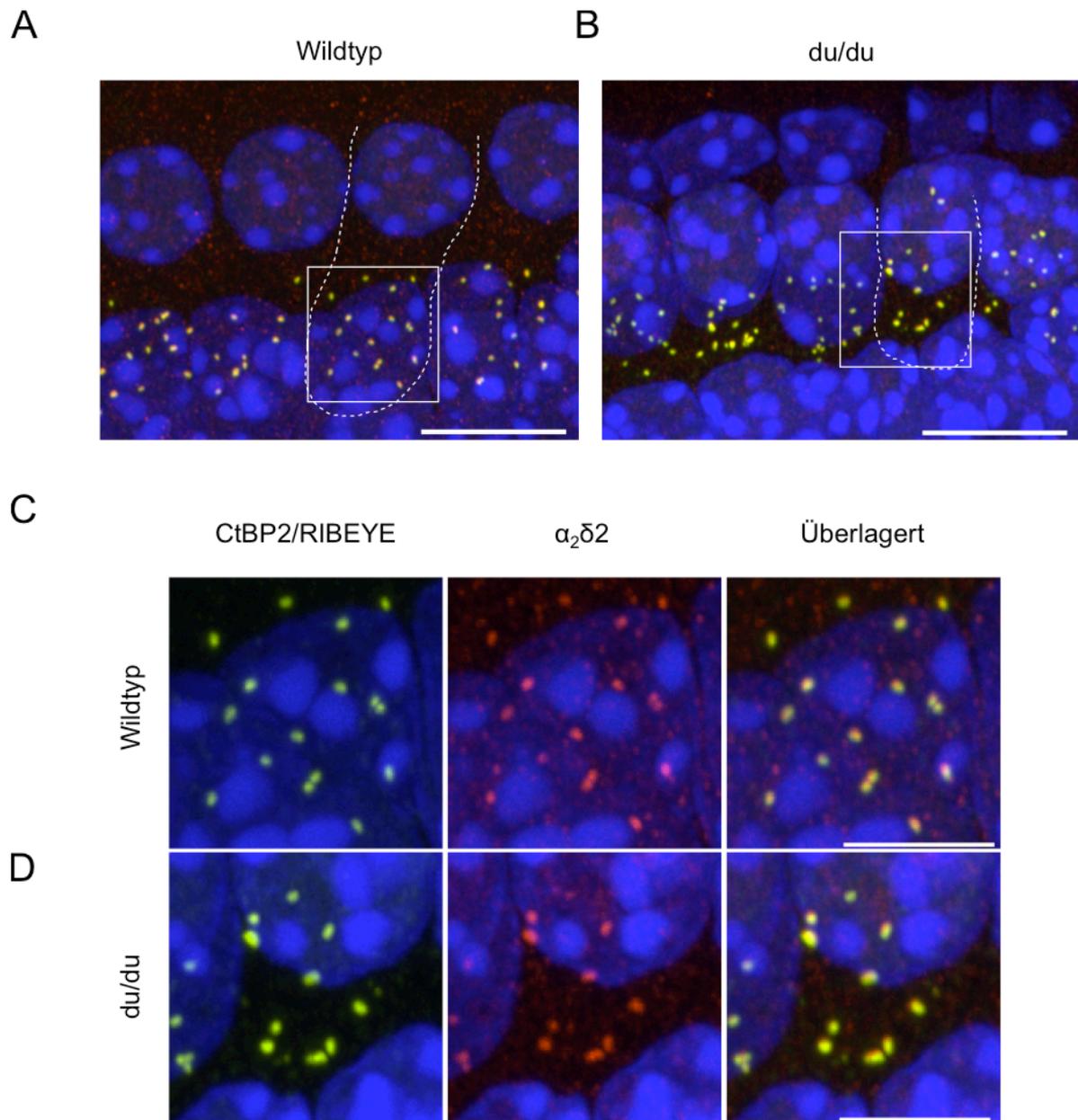
Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer Wildtyp- (A, C) und einer *du/du*-Maus (B, D). Überblick über jeweils 4 Haarzellen (A, B) mit Markierung des Umrisses einer Haarzelle (weiß gestrichelt). Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen, die  $\beta 2$ -Untereinheit ist rot markiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau), Stereozilien mit Phalloidin (violett) markiert. Vergrößerung der umrahmten Bereiche in (C) und (D) mit Auftrennung der einzelnen Kanäle: CtBP2/RIBEYE (grün, links),  $\beta 2$ -Untereinheit (rot, Mitte), Überlagerung der Kanäle (rechts). Maßstäbe: Übersicht: 10  $\mu\text{m}$ , Vergrößerung: 5  $\mu\text{m}$

Die Markierung der  $\beta_2$ -Untereinheit zeigte eine ähnliche Verteilung wie die der Ribbon-Synapsen oder der  $Ca_v1.3$ -Kanäle (s. Abbildung 6.6).  $\beta_2$ -spezifische Immunfluoreszenz fand sich am basalen Zellpol an den Ribbon-Synapsen. Neben jeder grünen Ribbon-Synapse war sowohl in Wildtyp- als auch in du/du-Zellen eine rote, punktförmige Färbung der  $\beta_2$ -Untereinheit zu finden (n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 3-6 IHZ), die mit dem Fluoreszenzsignal der Ribbon-Synapsen teilweise überlappte.

### 6.3.5 Test eines $\alpha_2\delta_2$ -Antikörpers an inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

Durch die Mutation im *Cacna2d2*-Gen kann die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit bei den du/du-Mäusen nicht korrekt exprimiert werden. Dies sollte dazu führen, dass das verkürzte  $\alpha_2\delta_2$ -Protein nicht an seinem Bestimmungsort, der Zellmembran, zu finden ist (Brodbeck et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde mit immunhistochemischen Färbungen getestet, ob dies tatsächlich der Fall ist.

Hierzu wurde ein Antikörper der Firma Santa Cruz, der laut Deklaration gegen den N-Terminus des  $\alpha_2\delta_2$ -Proteins gerichtet ist, an Gewebe der du/du-Mäuse verwendet (Abbildung 6.16). Sowohl bei den Wildtyp- als auch den du/du-Zellen ergab sich eine eventuell spezifische Färbung: ein Überblick über jeweils vier Haarzellen zeigte, dass die Verteilung von CtBP2/RIBEYE und  $\alpha_2\delta_2$  in beiden Genotypen identisch war. Eine Vergrößerung von 16 bzw. 20 Ribbon-Synapsen bestätigte die Markierung von  $\alpha_2\delta_2$  (rotes Signal) immer dicht lokalisiert mit der CtBP2/RIBEYE-Färbung der Ribbon-Synapsen, sowohl bei Wildtyp- als auch bei den du/du-Mäusen (n = 2 Tiere pro Genotyp mit je 3-6 IHZ).



**Abbildung 6.16:  $\alpha_2\delta$ -Färbung in IHZ der *du/du*-Maus**

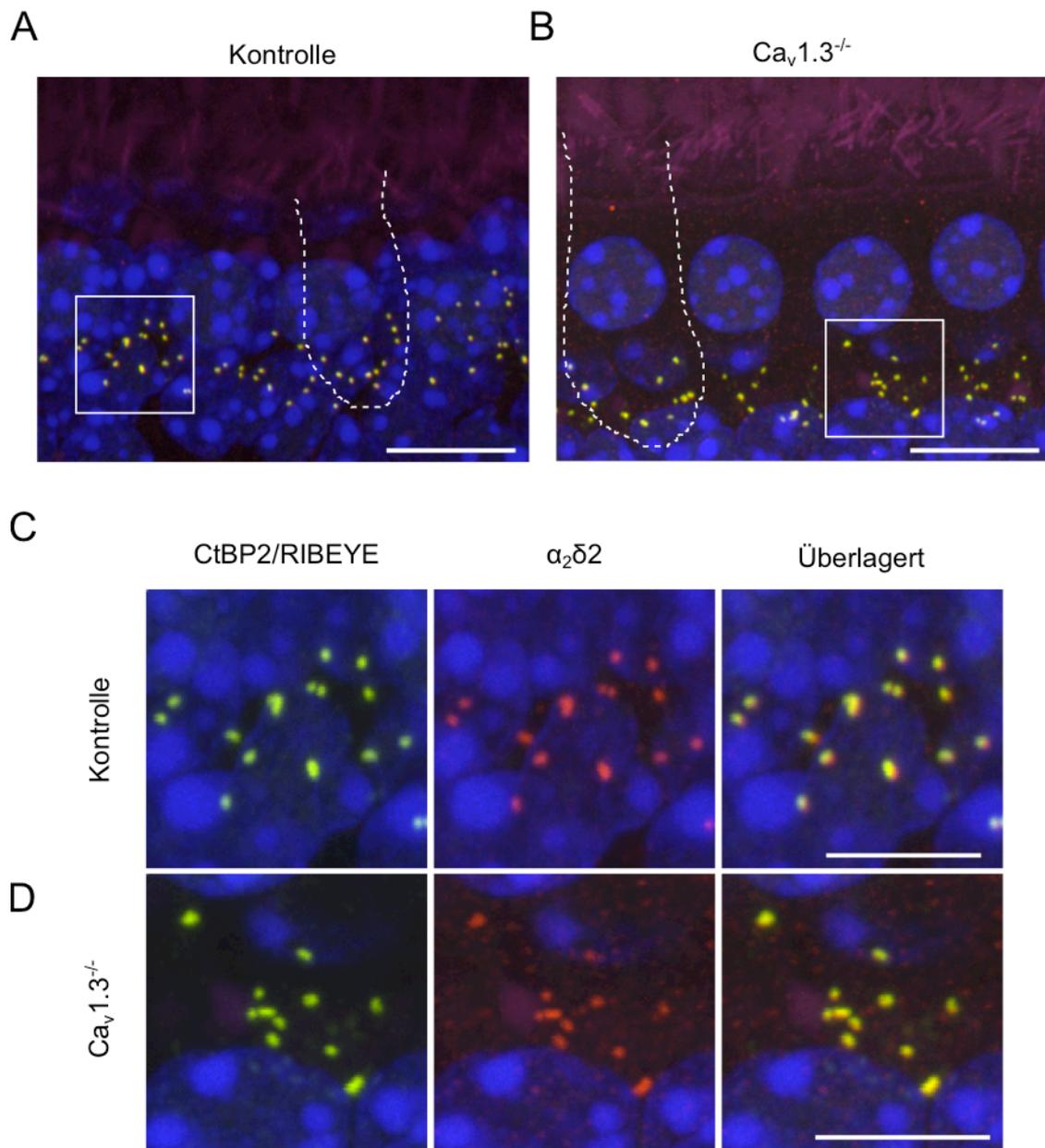
Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer Wildtyp- (A, C) und einer *du/du*-Maus (B, D). Überblick von jeweils 4 IHZ mit Andeutung des Umrisses einer Haarzelle (weiß gestrichelt) (A, B). Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen, die  $\alpha_2\delta_2$ -Markierung ist im roten Kanal dargestellt Verdünnung (1:200). Zellkerne sind mit DAPI markiert (blau). Maßstab: 10  $\mu$ m. Vergrößerung der umrahmten Bereiche in (C) und (D) mit Auftrennung und Überlagerung der einzelnen Kanäle: CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün, links),  $\alpha_2\delta_2$ -Färbung (rot, Mitte), Überlagerung der Kanäle (rechts). Maßstab: 5  $\mu$ m



an diese Membranstellen aufgebracht wurden, sind angegeben.

Ein weiterer Test des Antikörpers wurde von Prof. Dr. Gerald Obermair (Sektion für Physiologie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich) durchgeführt. Dazu wurden Zellkulturen hippocampaler Neurone immunhistochemisch gefärbt. In dieser Färbung war lediglich ein hoher Hintergrund, jedoch keine spezifische  $\alpha_2\delta$ -Färbung zu erkennen. Allerdings zeigten die Zellen bei einer Überexpression von  $\alpha_2\delta$  eine spezifische Färbung an der Zellmembran (ohne Abbildung, mündliche Mitteilung von Prof. Dr. Gerald Obermair, Prof. Dr. Jutta Engel).

Als letzter Test wurde mit dem  $\alpha_2\delta$ -Antikörper eine immunhistochemische Färbung an *whole mount*-Präparaten von  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen durchgeführt. Bei  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen wird die vorherrschende  $\alpha_1$ -Kanalpore  $Ca_v1.3$  nicht exprimiert. Die Anzahl der Ribbon-Synapsen der inneren Haarsinneszellen nimmt ab einem Alter von vier Wochen ab und die Haarzellen degenerieren (Nemzou N et al., 2006; Platzer et al., 2000). Hier wurde untersucht, ob das Fehlen der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit auch Auswirkungen auf die akzessorische  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit hat. Aufgrund von Zuchtproblemen konnte der Versuch nur einmal und mit einer NMRI-Maus als Kontrolle durchgeführt werden. Abbildung 6.18 zeigt, dass Ribbon-Synapsen (CtBP2-RIBEYE-Antikörper, grün dargestellt) am basalen Zellpol in der  $Ca_v1.3$ -defizienten Maus (P20) noch vorhanden sind und der  $\alpha_2\delta$ -Antikörper (rot dargestellt) ein Epitop an derselben Stelle erkennt wie in der Kontroll-Maus. Jede Ribbon-Synapse ist mit einer  $\alpha_2\delta$ -Färbung kolokalisiert. Geht man davon aus, dass der verwendete Antikörper gegen  $\alpha_2\delta$  spezifisch ist, muss hieraus geschlossen werden, dass das  $\alpha_2\delta$ -Protein auch ohne  $\alpha_1$ -Untereinheit im Bereich der Ribbon-Synapsen und wahrscheinlich extrazellulär vorhanden ist.



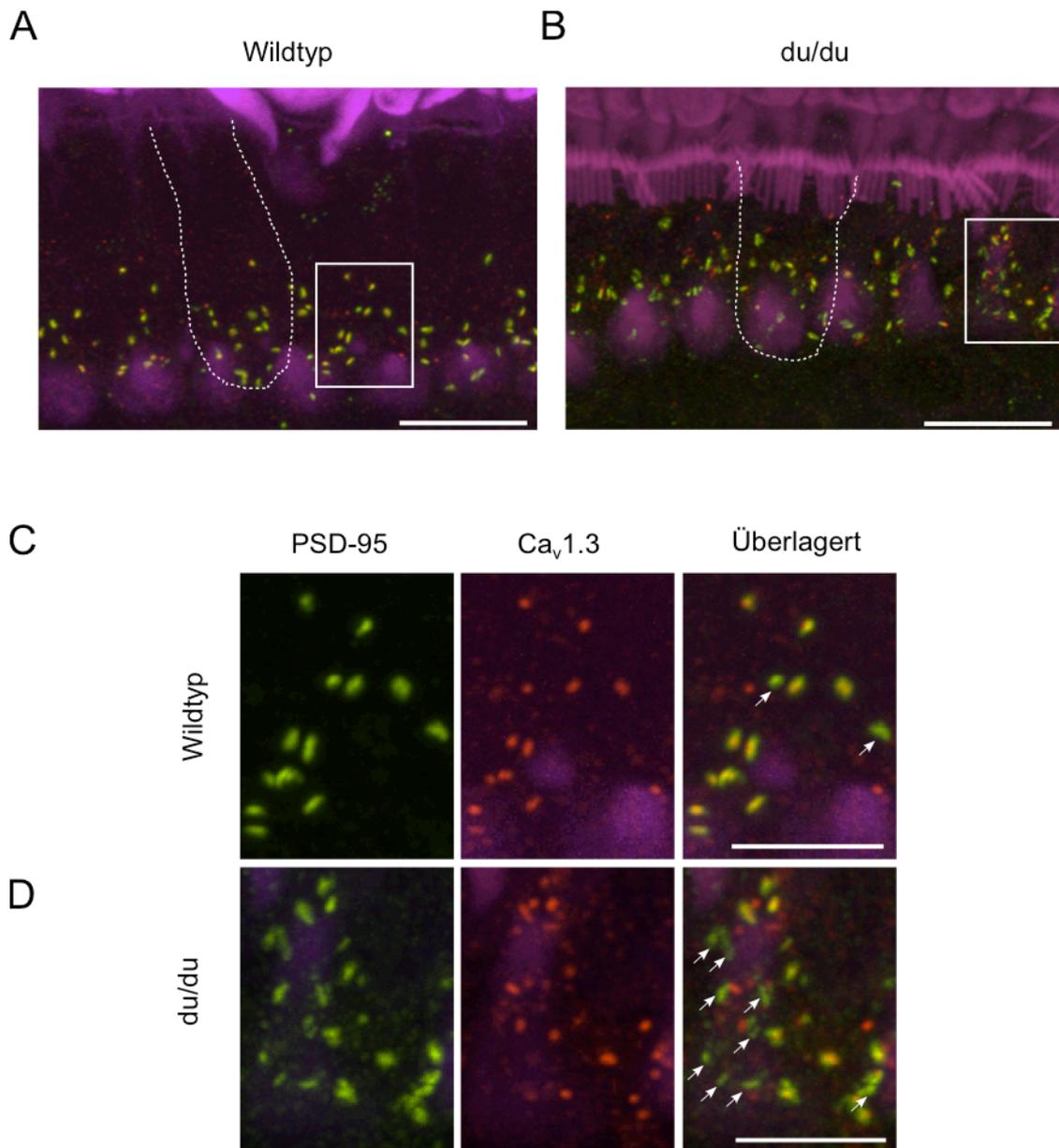
**Abbildung 6.18:  $\alpha_2\delta$ -Antikörper in IZH einer  $Ca_v1.3$ -defizienten Maus**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer Kontroll (P24, NMRI) - (A, C) und einer  $Ca_v1.3^{-/-}$ -Maus (P23) (B, D). Überblick von jeweils vier IZH mit Andeutung des Umrisses einer Haarzelle (weiß gestrichelt) (A, B). Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen, die  $\alpha_2\delta$ -Färbung ist in rot dargestellt (Verdünnung 1:50). Zellkerne sind mit DAPI markiert (blau). Vergrößerung der umrahmten Bereiche in (C) und (D) mit Auftrennung und Überlagerung der einzelnen Farbkanäle: CtBP2/RIBEYE (grün, links),  $\alpha_2\delta$  (rot, Mitte), Überlagerung (rechts). Maßstäbe: Übersicht: 10  $\mu$ m, Vergrößerung: 5  $\mu$ m

All diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl Ribbon-Synapsen als auch Calciumkanäle maturer apikaler IHZ in ihrer Lokalisation in du/du-Mäusen unverändert sind. Die Anzahl der Ribbon-Synapsen und deren Verteilung war gegenüber Wildtyp-Zellen nicht verändert, außerdem war die  $Ca_v1.3-\alpha_1$ -Untereinheit und die akzessorische Untereinheit  $\beta_2$  weiterhin dicht an den Ribbon-Synapsen lokalisiert. Auch die Färbung mit einem  $\alpha_2\delta$ -Antikörper, der den Untersuchungen zu Folge spezifisch bindet, brachte keinen Unterschied in den du/du-Mäusen. Erst bei der Betrachtung der physiologischen Eigenschaften des Calciumkanals der IHZ konnten Veränderungen in der du/du-Maus beobachtet werden. So fand sich in den IHZ der du/du-Mäuse ein um 30 % verringerter, maximaler Einstrom sowohl des Barium- als des Calciumeinstroms. Des weiteren war die *I-V*-Kurve in Richtung positiver Potentiale verschoben.

#### **6.4 Postsynaptische Struktur unter inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

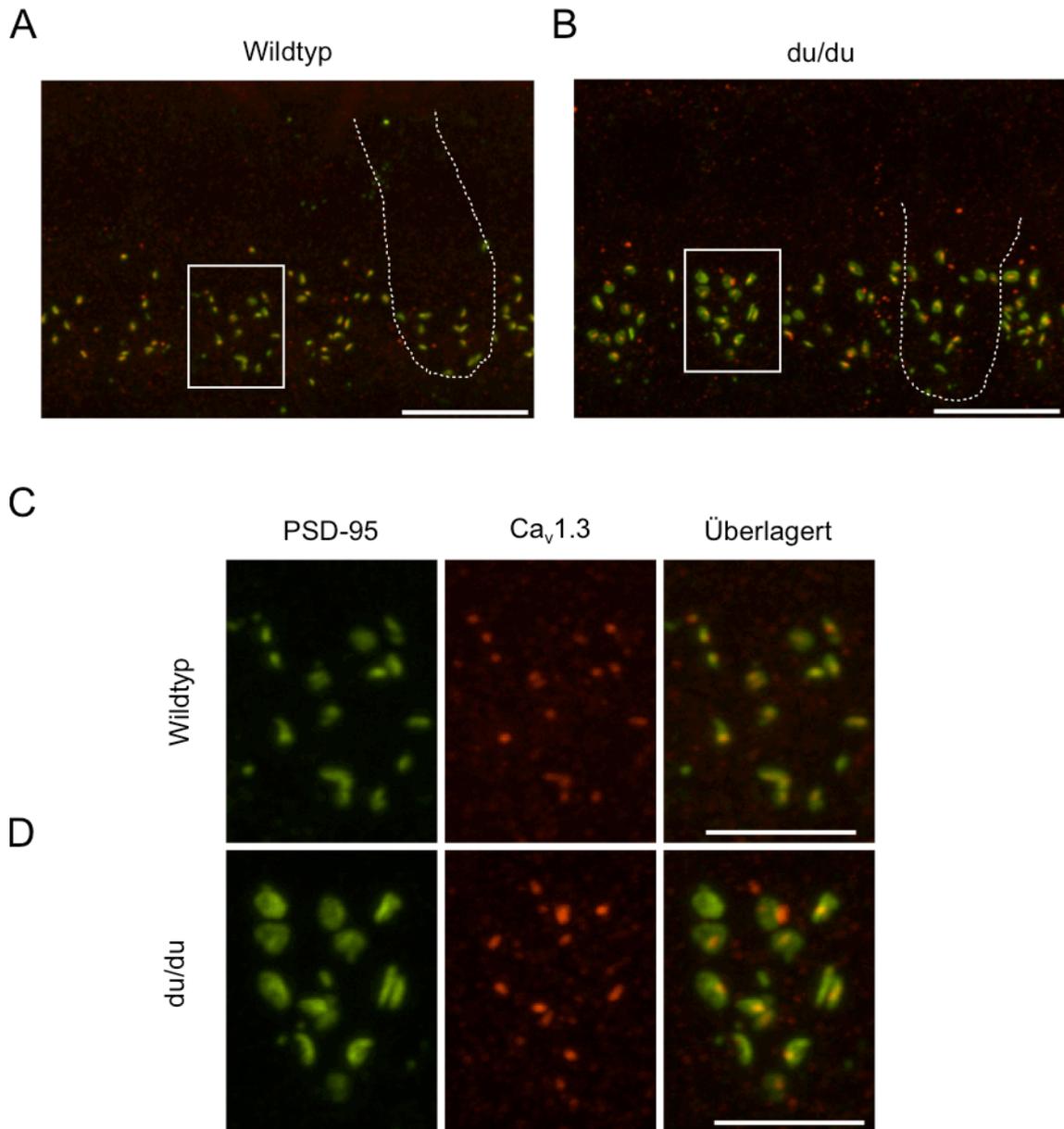
Um zu überprüfen, ob die Organisation der Postsynapsen durch eine mutierte  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit verändert ist, wurden immunhistochemische Experimente mit einem monoklonalen PSD-95 (*post synaptic density protein 95*) Antikörper und dem Antikörper gegen den  $Ca_v1.3$ -Kanal als Gegenfärbung gemacht. PSD-95 ist ein Protein, welches in der Postsynapse vorkommt und dort an der Organisation von postsynaptischen Rezeptoren, Signalmolekülen und Ionenkanälen beteiligt ist. Die Ergebnisse dieses Versuchs fielen bei den du/du-Mäusen heterogen aus, was auch auf Schwierigkeiten durch das variable unspezifische Hintergrundsignal des  $Ca_v1.3$ -Antikörpers zurückzuführen ist. Deswegen sind zur Anschaulichkeit zwei Beispiele dargestellt (Abbildungen 6.19 und 6.20).



**Abbildung 6.19: Postsynapsen-Struktur bei du/du-Mäusen, Beispiel 1**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer Wildtyp- (**A, C**) und einer du/du-Maus (**B, D**). Wildtyp und du/du-Präparat stammen von zwei verschiedenen Immunfärbungen, wobei die Helligkeit des grünen Kanals zur besseren Darstellung im Kontroll-Präparat herauf reguliert wurde. Diese Veränderung wurden vorgenommen, um trotz Heterogenität der Färbungen ein anschauliches Beispiel präsentieren zu können. **A, B**: Übersicht über 3-5 IHZ wobei der Umriss einer Haarzelle angedeutet ist (weiß gestrichelt). Die  $Ca_v1.3$ -Färbung zeigt die Calciumkanäle (rot), die PSD-95-Färbung (grün) die Postsynapsen. Stereozilien wurden mit Phalloidin angefärbt (violett). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die DAPI-Färbung ausgeblendet. Maßstab: 10  $\mu$ m. Weiße Rahmen deuten die Bereiche an, die als Einzel-Färbungen und vergrößert dargestellt sind (**C, D**). **C, D**: PSD-95 Färbung (grün, links),  $Ca_v1.3$ -Färbung (rot, Mitte),

Überlagerung der Kanäle (rechts); Die Pfeile zeigen PSD-95-Strukturen, die nicht mit einer Markierung des  $Ca_v1.3$ -Kanals kolokalisiert sind. Maßstab: 5  $\mu$ m



**Abbildung 6.20: Postsynapsen-Struktur bei *du/du*-Mäusen, Beispiel 2**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer Wildtyp- (**A, C**) und einer *du/du*-Maus (**B, D**). **A, B**: Übersicht über 3-5 IHZ wobei der Umriss einer Haarzelle angedeutet ist (weiß gestrichelt). Die  $Ca_v1.3$ -Färbung zeigt die Calciumkanäle (rot), die PSD-95-Färbung (grün) die Postsynapsen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die DAPI-Färbung ausgeblendet. Maßstab: 10  $\mu$ m. Weiße Rahmen deuten die Bereiche an, die als Einzel-Färbungen und vergrößert dargestellt sind (**C, D**). **C, D**: PSD-95 Färbung (grün, links),  $Ca_v1.3$ -Färbung (rot, mitte), Überlagerung (rechts).

(rot, Mitte), Überlagerung der Kanäle (rechts); Maßstab: 5  $\mu$ m

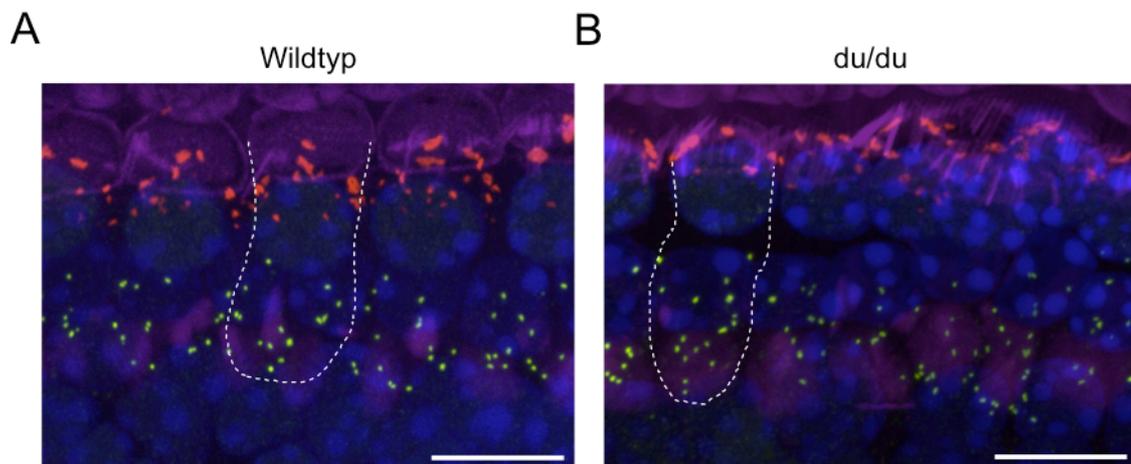
Die Markierung der Postsynapse mit dem PSD-95-Antikörper war wie die  $Ca_v1.3$ -Färbung am basalen Pol der Zelle zu finden. Die postsynaptische, PSD-95-positive Markierung war bei den du/du-Mäusen etwas ausgedehnter, was besonders gut an Beispiel 2 zu erkennen ist (Abbildung 6.20). In der vergrößerten Darstellung von Beispiel 1 wurde deutlich, dass sowohl bei Wildtyp- als auch bei du/du-IHZ nicht bei jeder PSD-95-Färbung auch eine  $Ca_v1.3$ -Färbung zu sehen ist. Jedoch war die Anzahl der nicht kolokalisierten PSD-95-positiven Markierungen bei der du/du-Maus höher (s. Pfeile in Abbildung 6.19). Insgesamt zeigte sich bei diesen Experimenten, dass die Postsynapsen-Struktur der IHZ durch die  $\alpha_2\delta$ -Mutation der du/du-Mäuse verändert wurde. Dies könnte zum Einen die Ausdehnung der Postsynapse selbst, zum Anderen die korrekte gegenüberliegende Ausrichtung von präsynaptischem  $Ca_v1.3$ -Kanal und Postsynapse betreffen (n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 3-6 IHZ).

## **6.5 Eigenschaften der BK-Kanäle in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Eine veränderte Expression der Calciumkanal-Untereinheiten oder ein beeinträchtigtter Calciumeinstrom können auch zur Beeinflussung anderer Kanäle in der Zelle führen. So ist der calciumabhängige BK-Kanal ein möglicher Kandidat, da er sowohl in  $Ca_v1.3$ - als auch in  $\beta_2$ -defizienten Mäusen betroffen ist (Neef et al., 2009; Nemzou N et al., 2006). Daher wurden Lokalisation und Stromeigenschaften des BK-Kanals in der du/du-Maus untersucht.

### **6.5.1 Lokalisation von BK-Kanälen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Um zu überprüfen, ob der BK-Kanal in der du/du-Maus exprimiert wird, wurden zuerst immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 6.21).



**Abbildung 6.21: Verteilung des BK-Kanals in IHZ der du/du-Maus**

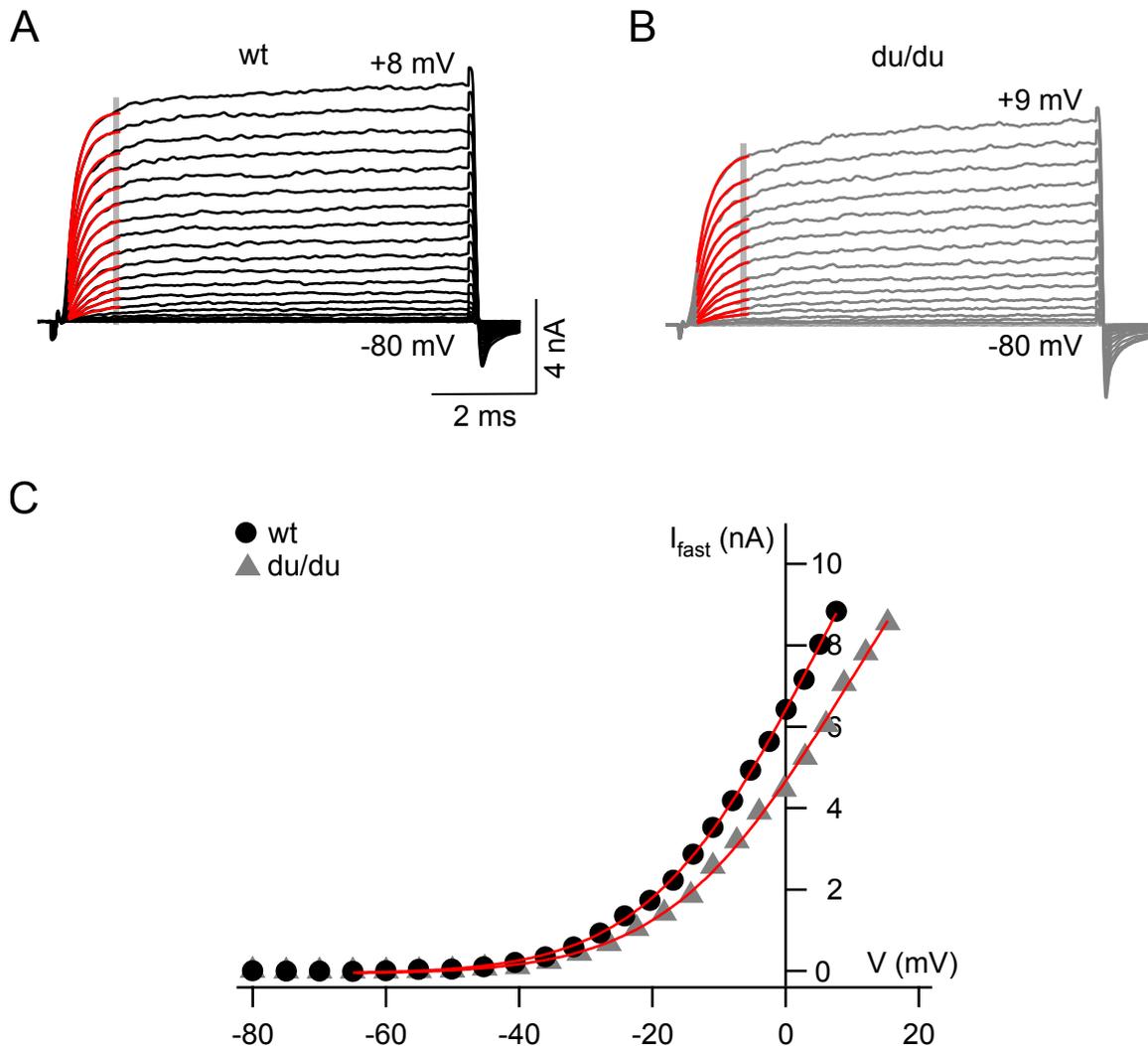
Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer Wildtyp- (A) und einer du/du-Maus (B). Dargestellt sind jeweils 3-4 Haarzellen wobei der Umriss einer Haarzelle angedeutet ist (weiß gestrichelt). Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen. Zellkerne sind mit DAPI (blau), Stereozilien mit Phalloidin (violett) markiert. Der BK-Kanal ist im roten Farbkanal dargestellt. Maßstab: 10  $\mu$ m

Die Ribbon-Synapsen als Gegenfärbung befinden sich am basalen Zellpol. Der BK-Kanal ist in einem Bereich unterhalb der Stereozilien und oberhalb des Zellkerns auszumachen. Anders als bei der Färbung des Calciumkanals war hier keine punktförmige Färbung zu sehen. Stattdessen sind größere Bereiche mit Ausdehnung auf bis zu 2  $\mu$ m gefärbt. Zwischen den Wildtyp- und den du/du-Mäusen gab es keinen Unterschied in der BK-Kanal Färbung (n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 3-6 IHZ).

### 6.5.2 Eigenschaften von BK-Strömen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

Auch die biophysikalischen Eigenschaften der schnellen BK-Ströme wurden ermittelt. Die BK-Ströme der du/du-Zellen ähnelten den Strömen der Wildtyp-Zellen (Abbildung 6.22). Depolarisations-induzierte Auswärtsströme sind in Abbildung 6.22 für eine Wildtyp- und eine du/du-Zelle dargestellt. Die Mittelung der I-V-Kurven erfolgte 1.2 - 1.3 ms nach Beginn der Depolarisation, zu einem Zeitpunkt, an dem nur der schnelle BK-Kanal geöffnet sein sollte (Brandt et al., 2007). Auch die I-V-Kurven der BK-Ströme der beiden Genotypen verliefen ähnlich (Abbildung 6.22C). An die I-V-Kurven wurde zur Ermittlung weiterer biophysikalischer

Parameter der BK-Ströme eine Funktion angelegt, die das Produkt einer Boltzmann-Funktion (zur Beschreibung der Aktivierung der Kanäle) mit der treibenden Spannung dargestellt.



**Abbildung 6.22: Exemplarische Kaliumströme in IHZ der *du/du*-Maus**

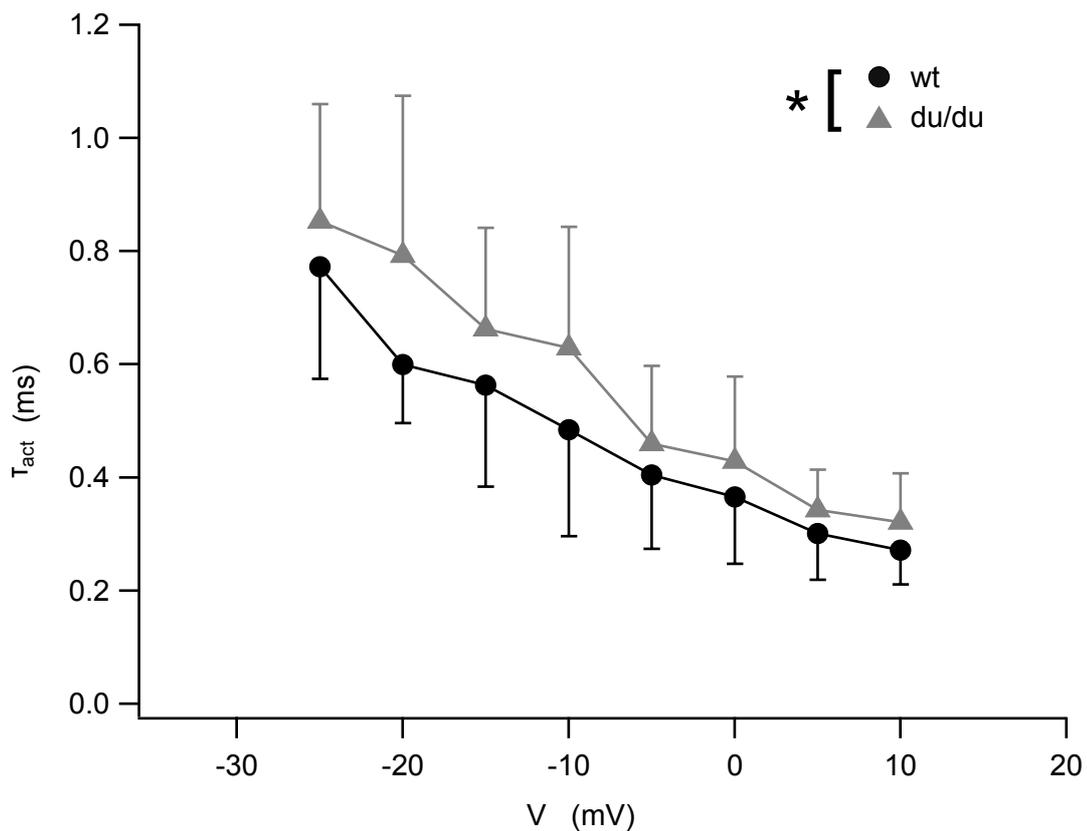
Repräsentative Kaliumströme einer Wildtyp- (wt, P21) (A) und einer *du/du*-Zelle (P20) (B). Die Stromspuren zeigen Antworten auf 8 ms andauernde Depolarisationen auf die angegebenen Spannungswerte. Graue Balken zeigen die Bereiche 1.2 bis 1.3 ms nach Start der Depolarisation, in dem der BK-Kanal schon öffnet, andere Kaliumströme aber noch nicht aktiviert sind. In diesem Zeitfenster wurden die Stromwerte zur Bestimmung der *I-V*-Kurven gemittelt. Die roten Linien zeigen angelegte Fits zur Berechnung der Aktivierungszeitkonstanten der BK-Ströme (s. Kapitel 4.8.5, Gleichung 2). (C) Strom-Spannungskurven zu den in (A) und (B) gezeigten Zellen. Die roten Linien zeigen den angelegten Fit.

Die sich aus den  $I$ - $V$ -Kurven und den zugehörigen Fits ergebenden Parameter der BK-Ströme sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Die BK-Ströme zeigten bei den  $du/du$ -Mäusen keine Veränderung hinsichtlich Stromgröße bei 0 mV, Kapazität der Zellen, Stromdichte bei 0 mV, Steepness und halbmaximaler Aktivierungsspannung ( $V_{half}$ ).

**Tabelle 6.1: Eigenschaften der BK-Ströme in  $du/du$ -Mäusen und Zellkapazität**

	<b><math>du/du</math> (n = 8)</b>	<b>Wildtyp (n = 10)</b>
Strom bei 0 mV	3.8 nA $\pm$ 0.8 nA	4.1 nA $\pm$ 1.4 nA
Kapazität	8.3 pF $\pm$ 1.3 pF	9.0 pF $\pm$ 1.0 pF
Stromdichte bei 0 mV	0.47 pA/pF $\pm$ 0.13 pA/pF	0.46 pA/pF $\pm$ 0.13 pA/pF
Steepness	13.6 mV $\pm$ 1.2 mV	14.3 mV $\pm$ 1.4 mV
$V_{half}$	3.4 mV $\pm$ 5.8 mV	4.1 mV $\pm$ 5.8 mV

Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{act}$ ) wurden durch Anlegen von Fits ab 0.3 bis 0.5 ms nach Depolarisationsstart ermittelt. Die gemittelten Aktivierungszeitkonstanten in Abhängigkeit von der Spannung zeigt Abbildung 6.23. Der BK-Kanal aktivierte in beiden Genotypen bei zunehmender Spannung schneller ( $\tau_{act}$  = etwa 0.8 ms bei -25 mV, etwa 0.3 ms bei +10 mV), jedoch war die Aktivierung bei den  $du/du$ -Mäusen über dem gemessenen Spannungsbereich insgesamt langsamer ( $p < 0.01$ ).



**Abbildung 6.23: Aktivierungszeitkonstanten der BK-Ströme in IHZ von du/du-Mäusen**

Aktivierungszeitkonstanten ( $T_{act}$ ), ermittelt durch monoexponentielle Fits an die Stromspuren von 0.3 bis 0.5 ms nach Depolarisationsstart, in Abhängigkeit von der Spannung. Wildtyp:  $n = 10$ ; du/du:  $n = 8$ ,  $*p < 0.01$ , two-way ANOVA

Die Lokalisation der BK-Kanäle in IHZ war durch die Mutation der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit des Calciumkanals bei du/du-Mäusen nicht verändert. Eine Betrachtung der biophysikalischen Eigenschaften der BK-Ströme zeigte, dass die BK-Kanäle der du/du-Mäuse etwas langsamer aktivieren als die Kanäle der Wildtyp-Mäuse.

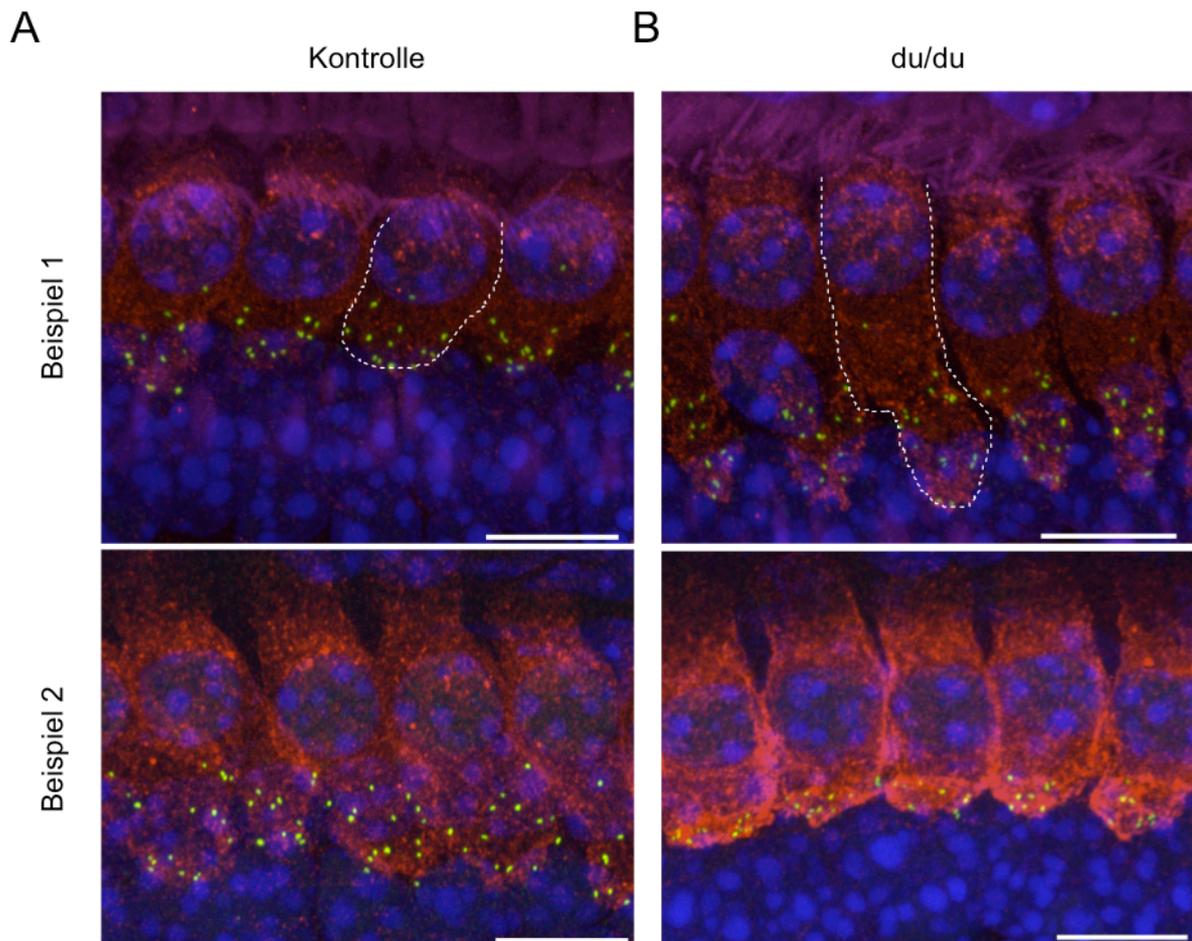
## 6.6 Weitere Phänotypisierung der Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

Um weitere Hinweise zur Auswirkung der du/du-Mutation zu bekommen wurden IHZ mit einem Antikörper gegen Otoferlin immunhistochemisch gefärbt. Otoferlin spielt beim Exo-Endozytose-Kreislauf synaptischer Vesikel in IHZ eine wichtige Rolle (Brandt et al., 2007; Duncker et al., 2013; Roux et al., 2006). In immunhistochemischen Versuchen färbte der

Otoferlin-Antikörper das gesamte Volumen der Zelle, wodurch sich ebenfalls Zellform und -größe beurteilen lassen. Des Weiteren wurden die Zellkapazitäten aus allen elektrophysiologischen Messungen gemittelt, um Aussagen über die Größe der IHZ von du/du-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen machen zu können. Eine weitere Phänotypisierung bestand in der Betrachtung der Stereozilien der ÄHZ.

### 6.6.1 Otoferlin in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

Abbildung 6.24 zeigt das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen am Beispiel zweier unabhängiger Färbungen. Der Otoferlin-Antikörper färbte das Volumen der IHZ beider Genotypen, was darauf schließen lässt, dass sich Otoferlin überall in der IHZ befand. Genaue Aussagen über Größe und Form der Zellen zu treffen ist bei fixierten *whole mount*-Präparaten generell dadurch erschwert, dass die Färbung stark von der Lage der Zellen im Präparat abhängt. Bei der Otoferlin-Färbung wurde dies besonders deutlich. Im ersten Beispiel (Abbildung 6.24 oben) standen in dem Wildtyp-Präparat die HZ senkrecht nach unten, was daran zu erkennen ist, dass Phalloidin- und Ribbon-Synapsen-Färbung dicht beieinander liegen. Im Gegensatz dazu lagen die du/du-Zellen sehr flach im Präparat und zeigten zusätzlich einen „Knick“ am basalen Pol. Die Otoferlin-Färbung war in beiden Genotypen unter den Kutikularplatten etwas stärker als im Rest der Zelle. Im zweiten Beispiel (Abbildung 6.24 unten) zeigte sich am apikalem Zellpol unterhalb der Kutikularplatte weniger Otoferlin. Hier war eine stärkere Färbung am basalen Pol der Zelle zu finden. Die Färbung erschien in den du/du-Zellen stärker, wobei jedoch auch hier wieder die Lage der IHZ beachtet werden muss. Während diese in dem Wildtyp-Präparat eher gerade lagen, waren sie in dem du/du-Präparat am basalen Pol angewinkelt.

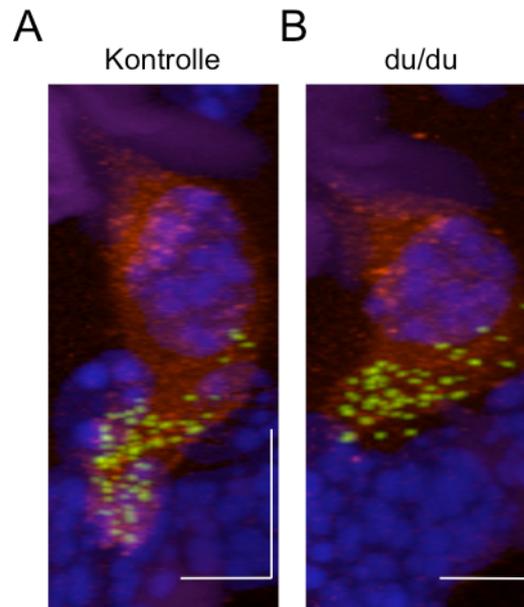


**Abbildung 6.24: Otoferlin-Lokalisation in IHZ von du/du-Mäusen**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate von zwei Kontroll- (**A**) und zwei du/du-Mäusen (**B**). Das Kontroll-Tier war in Beispiel 1 heterozygot, in Beispiel 2 ein Wildtyp-Tier. Dargestellt sind jeweils 4-5 Haarzellen wobei der Umriss einer Haarzelle angedeutet ist (weiß gestrichelt). Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau), Stereozilien mit Phalloidin (violett, nur Beispiel 1) markiert. Otoferlin ist im roten Kanal dargestellt. Die Färbung zeigt das Volumen der Haarzelle. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$

Um über die Volumenfärbung bessere Aussagen zu Zellgröße und -form treffen zu können, sind die in Abbildung 6.24 gezeigten IHZ (Beispiel 2) in der y-z-Ebene dargestellt (Abbildung 6.25). Das Volumen der IHZ ist wieder deutlich zu sehen. Auch hier zeigte sich die etwas länger gezogene und stärker abknickende Zelle bei der Kontroll-Maus. Bei der du/du-Maus ist die IHZ eher rundlich und eine Knick ist nicht auszumachen. Wie schon in Abbildung 6.24 gezeigt, ist dies kein Hinweis auf eine Veränderung in der du/du-Maus, da es sich bei dem anderen Beispiel umgekehrt verhielt. Die Otoferlin-Färbung unterschied sich hinsichtlich ihrer Verteilung nicht zwischen Kontroll- und du/du-Zellen, es zeigte sich in diesen Färbungen

weder ein unterschiedliches Zellvolumen noch eine veränderte Zellform ( $n = 3$  Tiere pro Genotyp mit je 3-6 IHZ).



**Abbildung 6.25: Otoferlin-Färbung in der y-z-Ebene in IHZ der du/du-Maus**

Maximumintensitätsprojektionen von Immunfluoreszenz-Färbungen apikaler *whole mount*-Präparate einer heterozygoten Kontroll- (**A**) und einer du/du-Maus (**B**). Die IHZ sind in der y-z-Ebene dargestellt. Die CtBP2/RIBEYE-Färbung (grün) zeigt die Ribbon-Synapsen. Zellkerne sind mit DAPI markiert (blau). Otoferlin zeigt das Volumen der Haarzelle (rot). Maßstab: x-Achse: 6  $\mu\text{m}$ , y-Achse: 10  $\mu\text{m}$ .

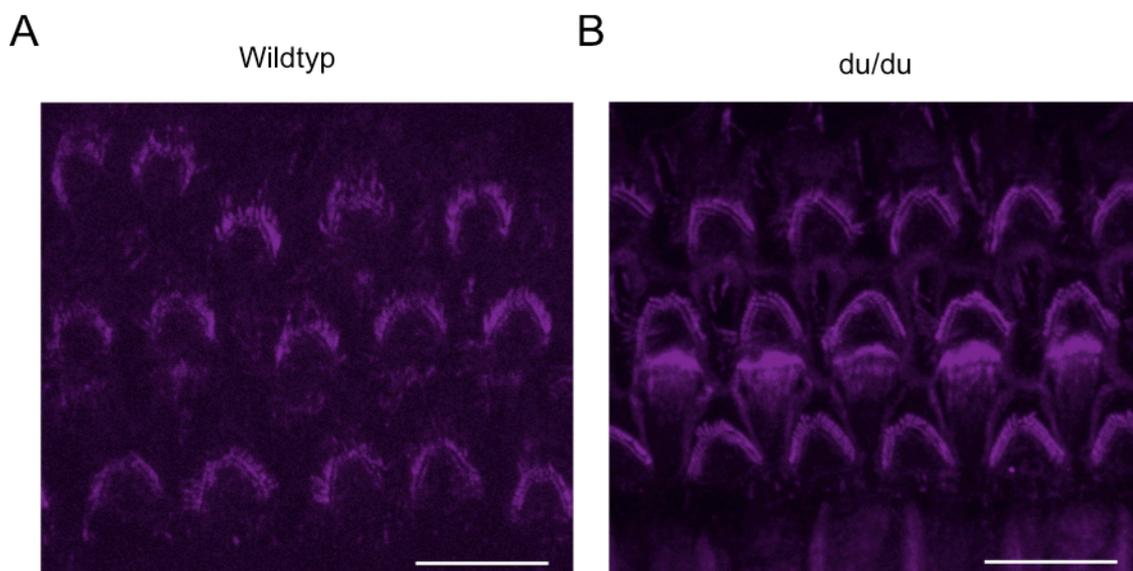
### 6.6.2 Zellkapazität der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

Um die Zellgröße besser bestimmen zu können, wurden die Kapazitäten aller Messungen von Barium-, Calcium- und Kaliumströmen gemittelt. Die gemittelte Kapazität der du/du-Zellen war mit  $9.1 \text{ pF} \pm 1.1 \text{ pF}$  ( $n = 31$ ) nicht signifikant unterschiedlich zu den Zellen der Wildtyp-Mäuse ( $9.7 \text{ pF} \pm 1.3 \text{ pF}$ ;  $n = 42$ ).

### 6.6.3 Morphologie apikaler äußerer Haarsinneszellen von ducky-Mäusen

Bei Mäusen mit einer Deletion des  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals degenerieren die ÄHZ der apikalen und medialen Cochlearegion in der zweiten postnatalen Woche (Glueckert et al., 2003; Michna et

al., 2003). Um zu überprüfen, ob die Mutation der *du/du*-Maus Einfluss auf die Anzahl äußerer Haarsinneszellen (ÄHZ) und die Morphologie ihrer Stereozilienbündel hat, wurden diese mit Hilfe des Aktinmarkers Phalloidin markiert (Abbildung 6.26). Die Stereozilienbündel der ÄHZ von *du/du*-Mäusen sahen intakt aus. Die Stereozilien waren normal, d. h. v-förmig angeordnet. Die Anordnung der ÄHZ war ebenfalls ähnlich: bei beiden Genotypen waren drei Reihen ohne auffällige Unregelmäßigkeiten vorhanden. In den *du/du*-Mäusen zeigte sich die Kutikularplatte etwas stärker, wodurch neben den Stereozilienbündeln eine Phalloidin-Markierung zu sehen war. Auch die Ribbon-Synapsen-Verteilung war in ÄHZ durch die  $\alpha_2\delta$ -Mutation nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die ÄHZ durch ein Fehlen der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zumindest in ihrer Morphologie nicht beeinträchtigt waren.



**Abbildung 6.26: Morphologie der ÄHZ-Stereozilien von *du/du*-Mäusen**

Immunfluoreszenz-Färbung apikaler *whole mount*-Präparate einer Wildtyp- (A) und einer *du/du*-Maus (B). Dargestellt sind die drei Reihen äußerer Haarsinneszellen. Die Stereozilien sind mit Phalloidin (violett) markiert. Maßstab: 10 µm

Zusammengefasst ergab die weitere Phänotypisierung der apikalen *du/du*-Haarsinneszellen keinen Unterschied in der Otoferlin-Expression und Zellgröße der IHZ. Die Morphologie der Stereozilienbündel der ÄHZ von *du/du*-Mäusen war unauffällig.

## 7 Diskussion I: Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf die BK-Kanäle

Die Existenz der NO-cGMP-PKG-Signalkaskade (nNOS, sGC, PDE, PKG, s. Kapitel 3.9 Die NO-cGMP-PKG-Signalkaskade) konnte in inneren Haarsinneszellen (IHZ) nachgewiesen werden (Gosepath et al., 1997; Heinrich et al., 2000; Jaumann et al., 2012), jedoch sind die Zielproteine bislang unbekannt. An anderen Geweben wurde gezeigt, dass der BK-Kanal Angriffspunkt dieser Kaskade sein kann (Carrier et al., 1997; Lim et al., 2005; Lu et al., 1998). Messungen der BK-Ströme mit und ohne 3  $\mu\text{M}$  8-Bromo-cGMP, einem nicht hydrolysierbaren Analogon des cGMPs, sollten zeigen, ob der Kanal auch in IHZ ein mögliches Zielprotein darstellt.

Die BK-Ströme in IHZ können bei Depolarisation auf +20 mV Werte von mehr als 10 nA erreichen, was für Zellen dieser Größe (9-10 pF) sehr beachtlich ist. Messungen dieser Ströme sind mit dem verwendeten Axopatch-Messverstärker problematisch, da dieser aufgrund der hohen Stromwerte übersteuern kann. Weiterhin sind die Aussagen über die Kaliumströme dahingehend begrenzt, dass es bei zu großem Serienwiderstand der verwendeten Patch-Pipette zu hohen Spannungsfehlern kommt. Dies wiederum wirkt sich bei der offline-Analyse negativ auf die Daten aus. Deswegen wurden hier nur Zellen in die Auswertung aufgenommen, die bestimmten Kriterien entsprachen, um so den Spannungsfehler gering zu halten (s. Kapitel 4.8.5 Auswertung der Patch-Clamp-Daten). Zudem variieren die BK-Ströme von Zelle zu Zelle stark, was eine einheitliche Analyse ebenfalls erschwert.

Die ersten Messungen erfolgten mit einer intrazellulären freien Calciumkonzentration von etwa 2 nM. Es wurden verschiedene 8-Bromo-cGMP-Konzentrationen getestet (1, 3, 100  $\mu\text{M}$ ), wobei die Assoziationskonstante der cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKGI) für 8-Bromo-cGMP je nach Isoform bei 0.01  $\mu\text{M}$  (PKGI $\alpha$ ) und 1  $\mu\text{M}$  (PKGI $\beta$ ) liegt (Pöhler et al., 1995). In der Cochlea wurden beide Isoformen der PKGI mittels Western Blot nachgewiesen (Jaumann et al., 2012). Reine Haarsinneszellen ergeben nicht genug Ausgangsmaterial für die Durchführung eines Western Blots, weshalb die Aussagen nur auf die Cochlea bezogen getroffen werden konnten. In Vorversuchen zu den hier vorgestellten Experimenten ergaben sich deutliche Effekte auf die BK-Ströme der IHZ bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  8-Bromo-cGMP, weshalb diese Konzentration für die weiteren Experimente genutzt wurde. Zudem

wurde die Calciumkonzentration variiert, da diese Einfluss auf die Phosphorylierungen haben könnte (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Peter Ruth, Institut für Pharmazie, Eberhard Karls Universität Tübingen). Die tatsächliche, freie Calciumkonzentration der IHZ ist nicht bekannt. Sie ist wahrscheinlich niedriger als in anderen Sinneszellen oder Neuronen, da Haarsinneszellen extrem hohe Konzentrationen von Calcium-Puffern besitzen (z.B. Calbindin, Calretinin, Hackney et al., 2005).

Die BK-Ströme der Kontrollzellen ohne 8-Bromo-cGMP zeigten ein erwartetes Verhalten (s. Kapitel 5.1 Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf BK-Kanäle maturer innerer Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen). Die Strom-Spannungskurven unterschieden sich kaum. Die Aktivierungszeitkonstanten waren in den Messungen mit hoher Calciumkonzentration kleiner (Marcotti et al., 2004). Eine deutliche Calciumabhängigkeit des BK-Kanals wurde von Oliver et al. (2003) bestimmt. Sie veränderten die Calciumkonzentration ausgehend von 0  $\mu\text{M}$  über 1, 3 und 10  $\mu\text{M}$ , was Änderungen in den Aktivierungseigenschaften des Kanals zur Folge hatte. Dabei ist zu beachten, dass sie ihre Messungen in der *inside-out* Patch-Konfiguration durchführten und die Calciumkonzentration somit von der extrazellulären Seite her ändern konnten. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 2 und 20 nM liegen deutlich unter 1  $\mu\text{M}$ , weshalb diese Bedingungen wahrscheinlich eher der 0  $\mu\text{M}$  Konzentration der Studie von Oliver et al. (2003) entsprechen. Jedoch hatten die hier durchgeführten Untersuchungen eine andere Absicht: Nicht die Abhängigkeit der BK-Ströme von der intrazellulären Calciumkonzentration sollte gemessen werden, sondern eine Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand, auf den die Calciumkonzentration einen Einfluss haben könnte.

Das intrazellulär verwendete 8-Bromo-cGMP ist ein nicht hydrolysierbares Analogon des cGMPs und sorgt dadurch für eine ständige Aktivierung der PKG. Ein Effekt von 8-Bromo-cGMP war schon bei der sehr niedrigen Calciumkonzentration von 2 nM zu sehen. Die mittlere Stromamplitude war bei Depolarisation auf -15 mV, -10 mV, -5 mV und 0 mV signifikant erhöht, was an der *I-V*-Kurve zu sehen ist (s. Abbildung 5.2 Calciumabhängige Änderung der BK-Ströme in IHZ durch 8-Bromo-cGMP). Auch in den Balkendiagrammen ist eine Tendenz zu erhöhten Stromamplituden zu sehen, jedoch war diese nicht signifikant (s. Abbildung 5.3 Parameter der BK-Ströme bei Zugabe von 8-Bromo-cGMP in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration). Unterschiedliche statistische Tests könnten diese Diskrepanz erklären (*I-V*-Kurven: 2-way ANOVA; Balkendiagrammen: Mann-Whitney-U Test). Die Stromerhöhung durch Zugabe des 8-Bromo-cGMP war ein erwarteter Effekt. Auf diese Weise

würde ein Auslösen der NO-cGMP-PKG-Signalkaskade zu größeren BK-Strömen und somit zur schnelleren Repolarisation der Zelle beitragen, im Mittel die IHZ bei niedrigen Potentialen halten und die Reizweiterleitung abschwächen. Hingegen zeigte eine Stromreduktion bei der höheren Calciumkonzentration (20 nM) zusammen mit einer Verlangsamung der Aktivierungszeitkonstanten durch 8-Bromo-cGMP-Zugabe einen gegenteiligen Effekt. Da nach einem Schalltrauma höhere Calciumkonzentrationen als 20 nM zu erwarten sind, ist es diesen Ergebnissen nach zu urteilen zweifelhaft, dass der BK-Kanal zur Stabilisierung oder Hilfe nach Schalltrauma beiträgt. Zwar sind Effekte vorhanden, die den Schluss nahe legen, dass es zu einer Phosphorylierung kommt, jedoch scheint der Mechanismus viel komplexer zu sein als bisher angenommen. Beispielsweise gibt es nicht nur potentielle PKG-Phosphorylierungsstellen innerhalb des Kanalproteins (Fukao et al., 1999), sondern auch die Protein-kinase C (PKC) kann den Kanal phosphorylieren. Dadurch wiederum wird die Sensitivität des Proteins für eine Phosphorylierung durch PKG oder PKA reguliert (Zhou et al., 2010). Es sind deswegen Untersuchungen anzustreben, bei denen die Calciumkonzentration noch weiter erhöht und die 8-Bromo-cGMP-Konzentration ebenfalls variiert wird.

Ein weiteres, mögliches Zielprotein dieser Signalkaskade wäre der  $Ca_v1.3$ -Kanal. Lv et al. (2010) zeigten, dass  $Ca_v1.3$ -Ströme in Sakkulus-Zellen des Ochsenfrosches durch NO und cGMP reversibel reduziert werden. Gleichzeitig werden die BK-Ströme vergrößert. Jedoch fehlt bei Säugetieren eine funktionelle und räumliche Kopplung zwischen  $Ca_v1.3$ - und BK-Kanälen und es besteht eine völlig andere Calciumabhängigkeit des BK-Kanals. Deshalb sind diese Ergebnisse nicht auf Säugerzellen übertragbar. In den Haarzellen von Fröschen ist eine Trennung zwischen Calcium- und Kaliumströmen nicht vollständig möglich und die Aktivierung der BK-Kanäle ist abhängig vom Calciumeinstrom durch  $Ca_v1.3$ -Kanäle. Auch in murinen Chromaffin-Zellen konnte eine Wirkung von 8-Bromo-cGMP auf den  $Ca_v1.3$ -Kanal nachgewiesen werden (Mahapatra et al., 2012). Würde der Calciumkanal auch in IHZ Zielprotein der Kaskade sein, könnte durch eine Inhibition der Calciumkanäle einer Anhäufung des toxischen Calciums entgegen gewirkt werden. Diese Befunde schließen jedoch nicht aus, dass die NO-cGMP-PKG-Signalkaskade an beiden Kanälen angreift.

## 8 Diskussion II: $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen

### 8.1 $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle sind aus einer porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und den akzessorischen Untereinheiten  $\text{Ca}_v\beta$  ( $\beta$ ) und  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta$ ; Abbildung 3.4) aufgebaut. Sie sind in Haarsinneszellen wichtig für die Transmitterausschüttung und die damit verbundene Reizweiterleitung an die Spiralganglien-Neurone. Häufig liegen in Geweben verschiedene Calciumkanäle ( $\alpha_1$ -Untereinheiten) vor. So exprimieren beispielsweise Neurone die Kanäle  $\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$ ,  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ , sowie häufig auch Kanäle aus der Gruppe  $\text{Ca}_v3$  (Übersicht in Catterall et al., 2005). In Haarsinneszellen jedoch fließen mehr als 90 % des Calciumstroms durch den  $\text{Ca}_v1.3$ - ( $\alpha_1$ ) -Kanal, wodurch diese Zellen ein optimales System zur Untersuchung des Kanalaufbaus darstellen (Dou et al., 2004; Knirsch et al., 2007; Michna et al., 2003; Platzer et al., 2000). Die  $\beta_2$ -Untereinheit scheint die vorherrschende Rolle unter den  $\beta$ -Untereinheiten des Calciumkanals in inneren Haarsinneszellen (IHZ) zu übernehmen (Neef et al., 2009). Welche der vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten einen weiteren Teil des Kanals bildet, ist jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde anhand eines Mausmodells untersucht, ob die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit für IHZ wichtig sein könnte. Die sogenannten du/du-Mäuse haben eine Spontanmutation im *Cacna2d2*-Gen, das für die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit kodiert (Barclay et al., 2001).

Die Untereinheiten  $\alpha_2\delta_1$  und  $\alpha_2\delta_2$  sind Bindungspartner der Antikonvulsiva Gabapentin und Pregabalin (Gee et al., 1996; Gong et al., 2001; Marais et al., 2001). Gabapentin und der Nachfolgewirkstoff Pregabalin kommen bei vielen Krankheiten zum Einsatz, wobei die Behandlung von Epilepsie und neuropathischen Schmerzen im Vordergrund stehen (Harden, 1999; Moore et al., 2011; Taylor et al., 2007). Neuropathische Schmerzen entstehen durch Schädigung oder auch Dysfunktion des Nervensystems. Von Trauma über Virusinfektion bis hin zu Krebs kommen verschiedene Ursachen dafür in Betracht. In Spinalganglien-Neuronen kommt es in Tiermodellen mit neuropathischen Schmerzen zu einer erhöhten Expression der  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit auf mRNA- und Protein-Ebene (Bauer et al., 2009; Luo et al., 2001, 2002; Newton et al., 2001). Ursprünglich wurde Gabapentin als Analogon des inhibierenden Neuro-

transmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) zur Verhinderung der synaptischen Übertragung entwickelt. In mehreren Studien wurde jedoch die Wirksamkeit von Gabapentin an GABA-Rezeptoren widerlegt (Jensen et al., 2002; Lanneau et al., 2001; Übersicht in Taylor et al., 2007). Es gibt Hinweise, dass Gabapentin nur bei chronischer, nicht jedoch akuter Gabe wirkt. Als mögliche Wirkungsweise wird die Blockierung des Transports der  $\alpha_2\delta_1$ - und  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheiten zur Plasmamembran und der damit verbundenen Reduktion des Calciumstroms diskutiert (Heblich et al., 2008; Hendrich et al., 2008). Dies wurde auch an Spinalganglien-Neuronen gezeigt, bei denen die Expression  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit bei neuropathischen Schmerzen erhöht wird (Bauer et al., 2009). Des Weiteren verhindert Gabapentin das Recycling der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit aus Endosomen zur Plasmamembran (Tran-Van-Minh and Dolphin, 2010). Der vollständige Wirkmechanismus dieser Medikamente ist bisher jedoch unbekannt. Eine Studie bezüglich der Gabapentin-Wirkung auf Tinnitus über einen Behandlungszeitraum von 5 Wochen ergab keinen Einfluss auf das Hörvermögen der Probanden (Witsell et al., 2007). In einer Fallstudie wurde Gabapentin als Auslöser eines reversiblen Hörverlustes bei einer Patientin mit akuter renaler Funktionsstörung identifiziert (Pierce et al., 2008) und laut klinischen Studien erleiden durch Gabapentin-Gabe 0.1-1 % aller Patienten einen reversiblen Hörverlust (Information gemäß Pfizer Pharmaceuticals, 2013: <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=630A>). Auch aufgrund dieser Ergebnisse war es interessant, eine Mausmutante mit Mutation der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit hinsichtlich des Hörvermögens zu untersuchen.

## 8.2 Vorherrschende $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Haarsinneszellen

Bisher gibt es keine Studien zum Expressionsmuster der verschiedenen  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in der Cochlea. In der muren Maus-Cochlea wurde lediglich mRNA einer  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit gefunden, die sich hinsichtlich der Größe von der in Skelettmuskel, Herz, Lunge und Gehirn vorkommenden, damals bekannten  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit  $\alpha_2\delta_1$  unterscheidet (Green et al., 1996). Vorläufige Experimente mit mRNA aus Corti-Organen junger Mäuse zeigten das Vorhandensein der Untereinheiten  $\alpha_2\delta_1$ ,  $\alpha_2\delta_2$  und  $\alpha_2\delta_3$  (Prof. Dr. Gerald Obermair, Dr. Niels Brandt, Prof. Dr. Jutta Engel, unveröffentlicht). In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten neonataler und murer Haarsinneszellen mit der quantitativen Real-Time-PCR untersucht (s. Kapitel 6.1  $\alpha_2\delta$ -Transkripte in inneren und äußeren Haarsinneszellen der Maus (Prof. Dr. Gerald Obermair)). Im Zuge der Reifung des Corti-Organs ändert sich die

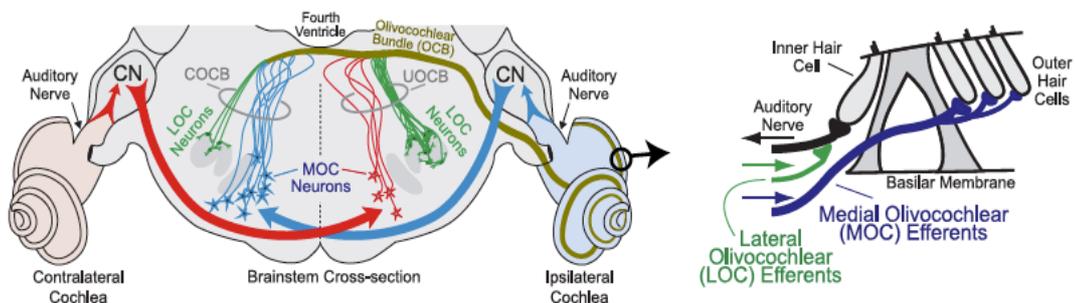
Calciumstrom-Amplitude, die maximale Aktivierungsspannung und Stärke der Inaktivierung des Stroms. Auch die Eigenschaften der  $Ca_v1.3$ -Ströme der äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) weisen Unterschiede zu den Calciumströmen der IHZ auf (Knirsch et al., 2007; Michna et al., 2003; Platzer et al., 2000). Daher wäre es möglich, dass verschiedene akzessorische Untereinheiten die Calciumkanäle in den unterschiedlichen Reifestadien und Haarsinneszelltypen aufbauen. Aus diesem Grund wurden sowohl neonatale als auch mature IHZ und ÄHZ auf die Transkription der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten hin untersucht. In maturaen IHZ und ÄHZ wird laut dieser Analysen die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit vorherrschend transkribiert. Auch in neonatalen IHZ und ÄHZ wurde mRNA der  $\alpha_2\delta_2$  nachgewiesen. Zu den Molekülzahlen kann keine Aussage getroffen werden, da die ermittelten Detektions- und Quantifizierungsschwellen (LOD und LOQ) in den meisten Fällen nicht erreicht wurden. Dies könnte darin begründet sein, dass die mRNA in Haarsinneszellen beim Absaugen der Zellen degradiert und so zu viele Moleküle vor dem Umschreiben in cDNA verloren gehen. Es wurde versucht, der RNA-Degradation mit RNase-Inhibitoren in der zum Absaugen genutzten Pipettenspitze entgegenzuwirken. Dies war jedoch vergeblich, da Proben mit RNase-Inhibitoren keine abweichenden Molekülzahlen zeigten. Wahrscheinlich liegen die Molekülzahlen nahe an der Nachweisgrenze, was eine quantitative Bestimmung schwer bis unmöglich macht. Auch ein Zusammenfügen mehrerer Proben zur Erhöhung des Ausgangsmaterials brachte nicht den gewünschten Erfolg. Da bei einem Teil der Proben jeweils eine endogene Kontrolle ohne cDNA mitgeführt wurde, lassen die Ergebnisse zumindest den Schluss zu, dass die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit die am stärksten vorhandene Untereinheit in Haarsinneszellen ist. Zur Zeit ist nicht bekannt, wie hoch der Turnover von  $\alpha_2\delta$ -mRNA oder  $\alpha_2\delta$ -Protein ist. Die Anzahl der Calciumkanäle apikaler, maturaer IHZ wurde mittels Ganzzell-Strommessungen und anschließender Rauschanalyse auf 1700 Kanäle pro IHZ geschätzt (Brandt et al., 2005). Da die Kanäle an den aktiven Zonen, den Ribbon-Synapsen, sehr stark konzentriert sind, ist davon auszugehen, dass sie durch Interaktion mit dem Zytoskelett und anderen Proteinen relativ immobil sind. Es kann vermutet werden, dass die Calciumkanal-Komplexe an den Ribbon-Synapsen daher einen langsamen Turnover zeigen. Möglicherweise ist dann auch eine geringe Zahl von  $\alpha_2\delta_2$ -mRNA-Molekülen ausreichend, um die Zahl der  $\alpha_2\delta_2$ -Proteine konstant zu halten.

### 8.3 Hörvermögen von ducky-Mäusen

Ausführlichere Untersuchungen hinsichtlich des Hörvermögens, des Calciumstroms in Haarsinneszellen und der Hörbahn gibt es bisher nur für Mäuse mit Mutation der  $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit (Pirone et al., in Revision). Da die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit laut den Transkriptanalysen in Haarsinneszellen die vorherrschende  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist, war es naheliegend, Mäuse mit einer Mutation dieser Untereinheit zu untersuchen (s. Kapitel 6.2 Hörmessungen an ducky-Mäusen (Prof. Dr. Bernhard Schick, Dr. Julia Dlugaiczyk, Dipl.-Ing. Dietmar Hecker)). Um das Hörvermögen zu überprüfen, wurden ABR-Schwellen und DPOAE-Amplituden dieser sogenannten du/du-Mäuse gemessen. Dabei ergaben sich bei den du/du-Mäusen um 18 dB SPL erhöhte Hörschwellen bei Klick-Stimuli. Auch die frequenzspezifischen ABR-Schwellen waren bei den Frequenzen 11.3, 16 und 22.6, d. h. im Bereich des besten Hörens, signifikant um 15-18 dB SPL erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die Reizweiterleitung der du/du-Mäuse bei bestimmten Frequenzen aufgrund der defekten  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit nicht korrekt funktioniert. An welcher Stelle der aus mehreren hintereinander geschalteten Neuronen bestehenden Hörbahn der Defekt vorliegt, würde eine Analyse der ABR-Wellenform ergeben. Diese zeigen für bestimmte Abschnitte der Hörbahn ein jeweils charakteristisches Wellenmuster, das Aufschluss über den Ort des Defektes gibt. Im Vergleich zu den du/du-Tieren haben Mäuse mit Mutation der  $Ca_v1.3$  oder der  $\beta_2$ -Untereinheit einen eindeutigeren Hörphänotyp:  $Ca_v1.3$ -defiziente Mäuse sind taub, während die  $\beta_2$ -defizienten Mäuse (extrakardiale Deletion) mit einer Klick-Hörschwelle von 90 dB SPL einen hochgradigen Hörverlust erleiden (Dou et al., 2004; Neef et al., 2009; Platzer et al., 2000). Die nicht so stark beeinträchtigte Hörfunktion der du/du-Mäuse zeigt also, dass die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit eine wichtige Rolle in der Hörbahn spielt, jedoch nicht essentiell für den Hörvorgang ist.

Eine Bestimmung der DPOAE-Amplituden zur Untersuchung der Funktion des cochleären Verstärkers zeigte bei du/du-Mäusen eine um etwa 7 dB SPL signifikant erhöhte Amplitude. Bei einer defekten Verstärkerfunktion der Cochlea hätte man reduzierte oder gar keine DPOAE-Amplituden erwartet. Die cochleäre Verstärkung der du/du-Mäuse scheint folglich von einer Mutation der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit nicht negativ betroffen zu sein. Die erhöhten DPOAE-Amplituden weisen auf eine verstärkte Aktivität der ÄHZ hin. Es ist fraglich, was bei den du/du-Mäusen zu diesem Phänotyp führt. Eine Möglichkeit wäre die veränderte Anatomie des Gehörgangs der du/du-Mäuse, da diese kleiner und leichter sind als ihre Geschwistertiere. Allerdings müssten dieser Theorie zufolge beispielsweise bei Kindern

erhöhte DPOAE-Amplituden im Vergleich zu Erwachsenen gemessen werden, was aber nicht der Fall ist (Dietmar Hecker, mündliche Mitteilung). Weiterhin könnte es sein, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit eine Rolle in den ÄHZ selbst oder den die ÄHZ modulierenden Efferenzen des medialen olivocochleären Bündels spielt (MOC-Efferenzen, Abbildung 8.1). Diese Efferenzen sorgen in der reifen Cochlea für eine variable Inhibition der ÄHZ zum Herausfiltern von Geräuschen aus der Umgebung und sind weiterhin für den Schutz vor Lärmtraumata zuständig (Guinan, 2006). MOC-Efferenzen hemmen die ÄHZ durch Ausschüttung des Transmitters Acetylcholin, der einen Kationeneinstrom (Natrium und v.a. Calciumionen) durch  $\alpha_9/\alpha_{10}$ -Acetylcholinrezeptoren in die ÄHZ verursacht. Die Kationen wiederum aktivieren Kaliumkanäle, die zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Oliver et al., 2000). Die MOC-Efferenzen selbst besitzen Calciumkanäle des Typs  $Ca_v1.2$  (Waka et al., 2003). Weiterhin ist davon auszugehen, dass sie als myelinisierte Neurone, die einen sehr schnellen Reflex vermitteln, an den Präsynapsen  $Ca_v2.1$ -Kanäle und möglicherweise auch weitere  $Ca_v$ -Kanäle exprimieren (Iwasaki et al., 2000). Würde die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit hier zum Aufbau der Calciumkanäle beitragen, könnte ein durch die Mutation ausgelöster verringerter Calciumeinstrom zur Reduktion der Transmitter-Ausschüttung führen. Dies wiederum könnte zu einer abgeschwächten Inhibition der ÄHZ und damit verbundenen erhöhten DPOAE-Amplituden führen.

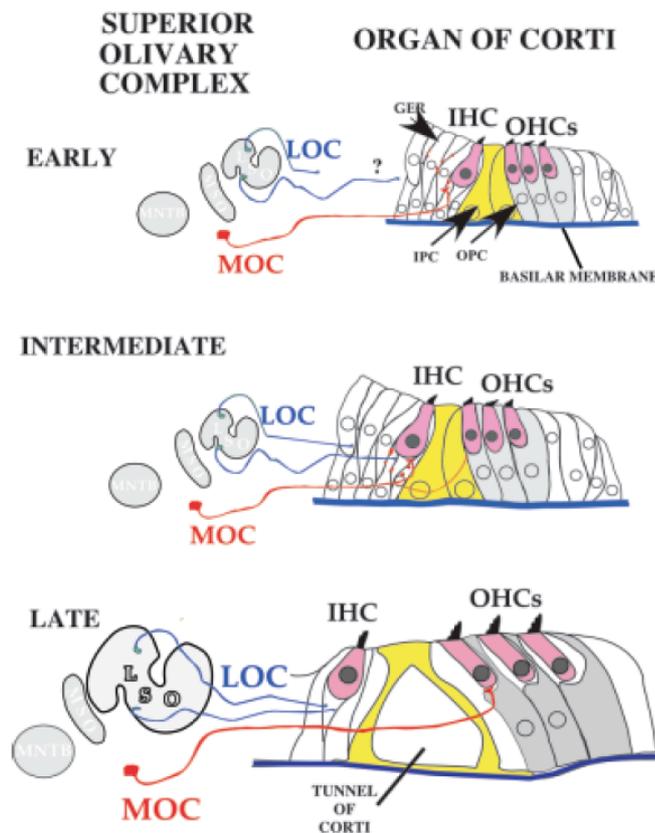


**Abbildung 8.1: Schematischer Überblick über den olivocochleären Reflex der rechten Cochlea**  
 LOC- (laterale olivocochleäre) und MOC- (mediale olivocochleäre) Efferenzen entspringen dem oberen Olivenkernkomplex (Nucleus olivaris superior) im Hirnstamm. Bei dem ipsilateralen Reflex (blau, gold) führt Schall, der die rechte Cochlea erreicht, zur Erregung von Interneuronen im ipsilateralen cochleären Nucleus (CN). Diese Interneurone kreuzen den Hirnstamm und innervieren MOC-Neuronen der kontralateralen (linken) Seite. Diese kontralateralen MOC-Neurone projizieren in das gekreuzte olivocochleäre Bündel (COCC), welches aus Axonen der LOC und MOC-Neurone besteht, zur rechten Cochlea. LOC-Efferenzen innervieren die Afferenzen (Spiralganglien-Neurone Typ I) maturaer IHZ (Abbildung rechte Seite), MOC-Efferenzen innervieren mature ÄHZ direkt.

Kontralaterale auditorische Nervenfasern (rot) innervieren Interneurone im kontralateralen cochleären Nucleus. Diese kreuzen den Hirnstamm und innervieren MOC-Neurone der ipsilateralen Seite. Diese MOC-Neurone projizieren durch das ungekreuzte olivocochleäre Bündel zur ipsilateralen Cochlea (aus Guinan, 2006).

Eine weitere, denkbare Erklärung der erhöhten DPOAE-Amplituden wäre eine Art Rückkopplungsmechanismus, der abläuft, wenn Defekte in der Hörbahn vorliegen. Es ist bekannt, dass es bei lauten Pegeln zu einer Inhibition der ÄHZ über die MOC-Efferenzen kommt (s. oben). Ein umgekehrter Mechanismus wäre vielleicht auch denkbar: Über eine Rückkopplung erfahren die ÄHZ eine stärkere Aktivierung, um das Hördefizit wieder auszugleichen. Bislang sind jedoch keine Beispiele bekannt, in denen erhöhte DPOAE-Amplituden zusammen mit erhöhten ABR-Schwellen gefunden wurden, die diese Theorie kräftigen würden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der erhöhten DPOAE-Amplituden berücksichtigt, dass in ÄHZ  $\alpha_2\delta_2$  ebenfalls als einzig nachweisbare  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit gefunden wurde. Die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit könnte bei dem Reifungsprozess der ÄHZ eine Rolle spielen und ihr Funktionsverlust ein anderes Antwortverhalten der maturen ÄHZ hervorrufen. Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist die Innervation der Haarsinneszellen vor Hörbeginn (<P12). Die MOC-Efferenzen bilden bis zu einem Alter von etwa 5 Tagen an den IHZ inhibitorische Synapsen, wandern dann zu den ÄHZ und innervieren diese (Abbildung 8.2).



**Abbildung 8.2: Cochleäre Innervation in Abhängigkeit der Entwicklung**

Laterale olivocochleäre (LOC) Efferenzen innervieren die Afferenzen der IHC nach Hörbeginn (>P12, spät). Die MOC-Efferenzen innervieren vor Hörbeginn (<P12, früh) die IHC. Nach Hörbeginn erhalten die ÄHZ eine efferente Innervation durch die MOC-Efferenzen. IPC: innere Pillarzelle, OPC: äußere Pillarzelle, LSO: lateraler, superiorer Olivenkomplex (aus Simmons, 2002)

Neonatale IHC sind spontanaktiv, was wahrscheinlich der Reifung der Hörbahn dient. Hat die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in neonatalen IHC schon eine Wirkung auf den Calciumstrom, könnte dies Auswirkung auf die Spontanaktivität oder spätere Entwicklungsschritte haben. Vor Hörbeginn bilden die IHC Aktionspotentiale aus, die von dem Calciumeinstrom in die Zelle abhängig sind. Spielt die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zu diesem Zeitpunkt schon eine Rolle, könnte ein Verlust dieser Untereinheit „Folgefehler“ generieren (Johnson et al., 2013). Auch adult erhalten die MOC-Neurone ihren „Input“ von den IHC, wodurch ein Defekt des Calciumstroms in den IHC durch die Mutation der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit einen indirekten Effekt auf die MOC-Efferenzen und damit die ÄHZ auslösen könnte.

Genauere Analysen der cochleären Verstärkerfunktion wären durch Bestimmung der DPOAE-Wachstumsfunktionen möglich. Diese dienen einer besseren Charakterisierung durch Beurteilung des Antwortverhaltens auf unterschiedliche Pegelhöhen.

Die Stereozilien der ÄHZ zeigen bei den du/du-Mäusen keine auffällige Morphologie, die auf einen Defekt der ÄHZ hindeuten könnte. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der DPOAE-Messungen. Bei  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen hingegen konnten im unteren Frequenzbereich des Hörvermögens der Maus (5-15 kHz) keine DPOAE-Amplituden gemessen werden und ein Verlust der ÄHZ in der apikalen Windung der Cochlea begründete diesen Fund (Dou et al., 2004). Warum  $Ca_v1.3$ -Kanäle für das Überleben der apikalen ÄHZ essentiell sind, ist unbekannt. Auch bei  $\beta_2$ -defizienten-Mäusen, bei denen die Calciumströme um 70 % reduziert waren, wurden nur an 2 von 10 Ohren DPOAE-Signale, und diese mit reduzierter Amplitude gemessen. Im Gegensatz zu den  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen waren die ÄHZ vorhanden und ihre Stereozilien zeigten keine Auffälligkeiten (Neef et al., 2009).

Die Hörfunktion der du/du-Mäuse ist durch die Mutation der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit beeinträchtigt. Die erhöhten ABR-Schwellen deuten auf einen Hörphänotyp hin, der zusammen mit den erhöhten DPOAE-Amplituden Fragen aufwirft. Um der Auswirkung der Mutation weiter auf den Grund zu gehen, wurden die IHZ, die für eine Umwandlung des mechanischen in einen elektrischen Stimulus sorgen, weiter untersucht.

#### **8.4 Spezifität eines $Ca_v1.3$ -Antikörpers zur Lokalisation von Calciumkanälen in inneren Haarsinneszellen von du/du-Mäusen**

Da die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit am Aufbau des spannungsgesteuerten Calciumkanals beteiligt ist, wurde mit Hilfe immunhistochemischer Versuche die Expression des in IHZ dominant vorkommenden  $Ca_v1.3$ -Kanals in du/du-Mäusen untersucht. Dazu wurde vorab die Spezifität eines  $Ca_v1.3$ -Antikörpers der Firma Alomone an IHZ  $Ca_v1.3$ -defizienter Mäuse getestet. Diese Versuche zeigten, dass der Antikörper mit hohem Hintergrund färbt, bei zusätzlicher Färbung mit einem Antikörper gegen die Ribbon-Synapsen (CtBP2/RIBEYE) jedoch ein spezifisches Signal auszumachen ist (s. Kapitel 6.3.1 Lokalisation von Ribbon-Synapsen und Calciumkanälen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen). Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung war jedoch eine Quantifizierung der  $Ca_v1.3$ -Färbungen nicht möglich.

### 8.5 Ribbon-Synapsen-Anzahl und Calciumkanal-Expression sind in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse nicht verändert

Immunhistochemische Experimente an IHZ von du/du-Mäusen zeigten eine unveränderte Expression der Calciumkanäle in dichter Lokalisation mit den Ribbon-Synapsen (s. Kapitel 6.3.1 Lokalisation von Ribbon-Synapsen und Calciumkanälen in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen; Zampini et al., 2010). Es ergab sich auch keine Änderung der Anzahl und Verteilung der Ribbon-Synapsen von du/du-Mäusen (du/du:  $15.3 \pm 3.4$  Ribbon-Synapsen pro Zelle, n = 6/7 Tiere/Präparate mit je 3-6 IHZ, Wildtyp:  $16.3 \pm 3.1$  Ribbon-Synapsen pro Zelle, n = 6/7 Tiere/Präparate, Alter:  $21 \pm 1.5$  Tage). Jedoch ist anzumerken, dass sowohl bei  $Ca_v1.3$ -Wildtyp- als auch  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen in einem Alter von 25 bis 30 postnatalen Tagen etwa 11-12 Ribbon-Synapsen pro Zelle gezählt wurden (Nemzou N et al., 2006). Da neonatale Haarsinneszellen mehr Ribbon-Synapsen besitzen als mature (19-20 pro Zelle, Nemzou N et al., 2006), könnte vermutet werden, dass sich die Zellen mit 21 Tagen noch in der „Reifungsphase“ befinden und erst mit ungefähr vier Wochen vollständig ausge-reift sind. Woher diese Diskrepanz sonst kommen könnte, ist nicht klar zu sagen, da beide Mauslinien den gleichen Hintergrund haben (C57BL/6N).

In neonatalen Haarsinneszellen  $Ca_v1.3$ -defizienter Mäusen führt der fehlende Calciumstrom in Mäusen ab einem Alter von 55 Tagen zu einer Abnahme der Ribbon-Synapsen-Anzahl und einer Degeneration der Haarsinneszellen (Nemzou N et al., 2006; Platzter et al., 2000). Die du/du-Mäuse erreichten ein Alter von maximal 30 Tagen. Da die Ergebnisse der Genotypisierungen aufgrund der Beurteilung einer Bandenstärke nicht immer eindeutig waren, wurden die Mäuse zusätzlich anhand des Phänotyps ausgewählt. Ataktischer Gang und die Prädisposition zu epileptischen Anfällen konnte erst ab einem Alter von zwei Wochen beobachtet werden. Die Zeitspanne für Experimente mit du/du-Mäusen war folglich sehr gering und eine Analyse der verschiedenen Parameter über die Zeit nicht möglich. Ob sich bei Mäusen mit Mutation der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit mit zunehmenden Alter ein anderer Phänotyp ergibt, müsste zukünftig mit Mäusen untersucht werden, in denen die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit Haarzell-spezifisch deletiert wäre.

## 8.6 Beeinflussung der Barium- und Calciumströme in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse

Calcium- und Bariumströme wurden an IHZ der du/du-Mäuse gemessen. In beiden Fällen war die Stromdichte um 30 % reduziert. Diese Ergebnisse bestätigen die für alle vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten gefundene Funktion, die Stromdichte spannungsgesteuerter Calciumkanäle zu erhöhen (Andrade et al., 2009; Barclay et al., 2001; Cantí et al., 2003; Felix et al., 1997; Fuller-Bicer et al., 2009; Gurnett et al., 1996; Hobom et al., 2000; Jones et al., 1998; Klugbauer et al., 1999; Qin et al., 2002; Shistik et al., 1995). Auch in Purkinje-Zellen des Cerebellums von du/du-Mäusen wurde eine Reduktion der Barium-Stromdichte um etwa 30 % gemessen (Barclay et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in IHZ eine Funktion ausübt und einen Einfluss auf den durch  $Ca_v1.3$ -Kanäle getragenen Calciummeinstrom hat. Die Auswirkungen der  $\alpha_2\delta$ -Mutation auf die Calciumströme sind jedoch nicht so gravierend wie die der Deletion der  $Ca_v1.3$ -Untereinheit oder der extrakardialen Deletion der  $\beta_2$ -Untereinheit. Ein unabhängiger Verlust dieser Untereinheiten resultiert in einer Stromreduktion um 90 % bzw. 70 % in den IHZ (Dou et al., 2004; Neef et al., 2009; Platzer et al., 2000).

Zusätzlich zu der Reduktion des Calcium- und Bariumstroms in den IHZ der du/du-Mäuse wurde ein Versatz der *I-V*-Kurve in Richtung depolarisierender Potentiale beobachtet, was durch  $V_{max}$  und  $V_{half}$  deutlich wird. Bei Bariumströmen wurde die Kurve um 7-8 mV ( $V_{half}$  um 7 mV,  $V_{max}$  um 8 mV), bei Calciumströmen um 5 mV verschoben. Diese Eigenschaft wurde für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten schon mehrfach beschrieben (Felix et al., 1997; Fuller-Bicer et al., 2009; Hobom et al., 2000; Platano et al., 2000; Singer et al., 1991). Ein Versatz der *I-V*-Kurve wurde bei den Purkinje-Zellen der du/du-Mäuse nicht gefunden (Barclay et al., 2001), jedoch exprimieren diese Zellen verschiedene spannungsgesteuerte Calciumkanäle und auch die  $\beta$ -Untereinheiten variieren, weshalb dies nicht verwunderlich ist. Für die IHZ bedeutet dieser *I-V*-Versatz zusammen mit der Stromreduktion, dass der Calciumstrom bei den physiologisch wichtigen Potentialen von etwa -60 bis -25 mV (entspricht -40 bis -5 mV bei den hier durchgeführten Messungen mit 10 mM divalenten Kationen) um deutlich mehr als 30 % reduziert ist. Höhere Schalldruckpegel sind folglich nötig, um die gleiche Menge an Calciumeinstrom hervorzurufen. Allein aufgrund der Calciumstrom-Reduktion um 30 % wäre ein auffälligerer Hörphänotyp bei den du/du-Mäusen zu erwarten gewesen. Es ist jedoch zu bedenken, dass die IHZ, deren Calciumströme untersucht wurden, in der apikalen Windung

des Corti-Organ lag. Damit sind die gemessenen IZH für die Weiterleitung von Schallsignalen mit den Frequenzen von 2 bis 6.8 kHz zuständig (Engel et al., 2006; Müller et al., 2005). Die Aufnahme der frequenzspezifischen ABR-Schwelle zeigte bei diesen Frequenzen (2, 2.8, 4 und 5.6 kHz) zwar eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung. Es wäre daher interessant, Calciumströme der midbasalen Windung des Corti-Organ zu messen, da die Hörschwellen der du/du-Mäuse bei den Frequenzen 11.3, 16 und 22.3 kHz um 15-18 dB SPL signifikant erhöht waren. Diese IZH liegen in Richtung des basalen Endes der Cochlea jedoch sehr dicht am Knochen (Lamina spiralis), wodurch es beim Präparieren häufig zum Abreißen der Zellen kommt. Gelingt die Präparation, sind die Zellen danach in einem schlechten Zustand, was die Erfolgsrate der Messungen stark senkt. Aufgrund dieser Schwierigkeiten gibt es für die Maus keine Daten zu Calciumstrom-Messungen entlang der tonotopen Achse der Cochlea. Es kann deswegen keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Calciumkanal entlang der tonotopen Achse aus verschiedenen  $\alpha_2\delta$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut ist. Messungen an robusteren und leichter zu präparierenden Corti-Organen von Wüstenrennmäusen zeigten einen Gradienten hinsichtlich der Aktivierungszeitkonstanten und Inaktivierung des Calciumstroms der IZH (Johnson and Marcotti, 2008). Diese Unterschiede könnten jedoch auch eine Folge von Spleißvarianten des  $Ca_v1.3$ -Kanals oder von interagierenden Proteinen unabhängig von der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit sein. Mit Hilfe spezifischer Antikörper könnten Färbungen cochleärer Kryoschnitte Aufschluss über die tonotope Expression der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit geben. Alternativ wären Methoden nützlich, die es erlauben, die Bereiche mit Knochen der *whole mount*-Präparate am Objektträger zu fixieren. Der bisher genutzte Gewebeklebstoff Cell-Tak haftet nicht am Knochen, was es sehr erschwert, die dicht am Knochen liegenden medialen und basalen Haarsinneszellen auf dem Objektträger zu befestigen. Ohne Befestigung sind die winzigen Gewebestücke zu fragil und die Haarzellen überstehen den Prozess der immunhistochemischen Färbung nicht.

Die  $\alpha_2\delta$ -Mutation der du/du-Mäuse führt zur Bildung eines verkürzten  $\alpha_2\delta$ -Transkripts, welches auch auf Proteinebene mittels Western Blot in Purkinje-Zellen des Cerebellums nachweisbar ist. Bei heterologer Expression des verkürzten Proteins zusammen mit  $Ca_v2.1$  und  $\beta_4$  sind die Calciumströme im Vergleich zur Expression mit intaktem  $\alpha_2\delta$ -Protein reduziert und haben außerdem eine um etwa 5 mV in Richtung positive Potentiale versetzte *I-V*-Kurve (Brodbeck et al., 2002). Die meisten Untersuchungen zeigen bislang einen Versatz der *I-V*-Kurve Richtung hyperpolarisierender Potentiale durch intakte  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten (Felix et al., 1997; Fuller-Bicer et al., 2009; Hobom et al., 2000; Platano et al., 2000; Singer et al., 1991). Dies wirft die Frage auf, ob das verkürzte Protein in Haarsinneszellen exprimiert wird

und eventuell noch einen Einfluss auf den Calciumstrom ausübt. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, die das (stark verkürzte, aber noch antigene) Protein auch bei den du/du-Mäusen an den Ribbon-Synapsen zeigen (s. Kapitel 8.11 Wird das mutierte  $\alpha_2\delta_2$  Protein in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen exprimiert und gelangt es an die Zellmembran?).

Messungen der Einzelkanal-Leitfähigkeiten der  $\text{Ca}_v2.1$ -Kanäle von Purkinje-Zellen des Kleinhirns zeigten in den du/du-Mäusen keine Veränderung, sodass dieser Grund als Ursache der Stromreduktion unwahrscheinlich ist (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002). Die Stromreduktion in den IHZ der du/du-Mäuse könnte auf einen verminderten Transport der  $\alpha_1$ -Untereinheit zur Membran zurückzuführen sein, was für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten schon mehrfach gezeigt wurde (Brodbeck et al., 2002; Cantí et al., 2005; Dickman et al., 2008; Hendrich et al., 2008; Ly et al., 2008; Saheki and Bargmann, 2009). Um diese Theorie zu überprüfen, könnten nicht-stationäre Fluktuationsanalysen durchgeführt werden, die Rückschlüsse über die Anzahl der Calciumkanäle zulassen (Brandt et al., 2005). Hingegen ist es wahrscheinlich, dass der Versatz der *I-V*-Kurve durch den Einfluss der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit auf die schon membranständigen  $\text{Ca}_v1.3$  Kanäle ausgelöst wird. Es besteht nun die Frage, ob der Phänotyp in IHZ der du/du-Maus durch die alleinige Abwesenheit eines funktionellen  $\alpha_2\delta_2$ -Proteins oder die zusätzliche Anwesenheit eines mutierten  $\alpha_2\delta_2$ -Proteins hervorgerufen wird. Daher wäre es interessant, Mäuse mit vollständiger Deletion der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit im Vergleich zu den du/du-Mäusen zu analysieren.

Sowohl die Barium- als auch Calciumströme der IHZ von du/du-Mäusen zeigten zudem eine Erhöhung der Steilheit der Aktivierung (Steepness) um 0.7 (Barium) und 0.9 mV (Calcium). Auch bei  $\alpha_2\delta_1$ -defizienten Kardiomyozyten ist die Steilheit der Aktivierung erhöht (Fuller-Bicer et al., 2009). Je größer dieser Faktor ist, desto schlechter reagieren die Kanäle mit einer Änderung ihres Öffnungsverhaltens bei Änderung der Membranspannung. Da diese Werte in den beiden genannten Mausmodellen erhöht sind, ist es wahrscheinlich, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten Einfluss auf das Öffnungsverhalten nehmen.

Die oftmals gefundene Funktion der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten, die Aktivierungszeitkonstanten zu beschleunigen, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht überprüft werden, da die Transienten der Ströme zu groß waren. Wegen kleiner Ströme wurde auf eine Serienwiderstandskorrektur verzichtet (s. Kapitel 4.8.5 Auswertung der Patch-Clamp-Daten). Eine hohe Klemm-

zeitkonstante verhinderte daher ein schnelles Umladen der Zellmembran, sodass Aussagen zur Aktivierung nicht getroffen werden können.

Die Inaktivierungskinetiken der Barium- und Calciumströme zeigten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und du/du-Mäusen, obwohl diese Eigenschaft für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit schon mehrfach nachgewiesen wurde (Felix et al., 1997; Fuller-Bicer et al., 2009; Hobom et al., 2000; Klugbauer et al., 1999; Qin et al., 1998; Sipos et al., 2000). Die Inaktivierung des Stroms in IHZ ist generell sehr gering, wofür wahrscheinlich Spleißvarianten des  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals oder auch interagierende Proteine (Calcium bindende Proteine CaBP1-5, RIM-Proteine, Rab-Proteine; Cui et al., 2007; Gebhart et al., 2010; Grant and Fuchs, 2008; Yang et al., 2006) verantwortlich sind. Es wurde lange Zeit vermutet, dass die  $\beta_2$ -Untereinheit zur schwachen Inaktivierung des Calciumstroms beiträgt. Jedoch ist das Inaktivierungsverhalten in extrakardialen  $\beta_2$ -defizienten Mäusen nicht verändert (Neef et al., 2009). Aufgrund der ohnehin schon geringen Inaktivierung ist es deshalb nicht sehr verwunderlich, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit keinen weiteren Einfluss darauf ausübt.

### **8.7 $\text{Ca}_v\beta_2$ ist auch in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse weiterhin am Kanalaufbau beteiligt**

Für die Funktion der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit spielt die  $\beta$ -Untereinheit ebenfalls eine Rolle (Qin et al., 1998; Singer et al., 1991). In Mäusen mit Mutation der  $\beta_3$ - oder  $\beta_4$ -Untereinheit kommt es im Gehirn zum Ersatz der deletierten Untereinheit durch andere Isoformen (*Subunit-Reshuffling*; Burgess et al., 1999; Murakami et al., 2007). Dies ist jedoch nicht in allen Geweben gleichermaßen möglich, da die Anforderungen an die Untereinheiten so spezifisch sind, dass ein Ersatz durch andere  $\beta$ -Isoformen nicht gelingt. Ob die Umstrukturierung auch für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten existiert oder gar andere Untereinheiten beeinflusst, ist fraglich. Es wäre jedoch denkbar gewesen, dass die mutierte  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zu einem geänderten Expressionsverhalten der Zelle hinsichtlich der  $\beta$ -Untereinheiten führt. Immunhistochemische Experimente zeigten jedoch, dass sich die Mutation der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, wie sie bei den du/du-Mäusen vorhanden ist, nicht auf die Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit auswirkt. Diese konnte wie die  $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit auch weiterhin in enger Lokalisation mit und an jeder Ribbon-Synapsen detektiert werden (s. Kapitel 6.3.4  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen).

### **8.8 Veränderte postsynaptische Struktur der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Ein großer Teil des  $\alpha_2\delta$ -Proteins befindet sich extrazellulär (Brickley et al., 1995). Alle  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten enthalten in diesem Teil eine VWA-Domäne, die für Protein-Protein-Wechselwirkungen zuständig ist (Cantí et al., 2005; Whittaker and Hynes, 2002). Zudem ist bekannt, dass  $\alpha_2\delta$ -Proteine unabhängig von ihrem Einfluss auf den Calciumkanal an der Synapsenbildung beteiligt sein können (Dickman et al., 2008; Pirone et al., in Revision). Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit könnte deswegen mit verantwortlich sein für eine Kopplung der Struktur von Prä- und Postsynapse (s. auch Kapitel 8.11 Wird das mutierte  $\alpha_2\delta_2$  Protein in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen exprimiert und gelangt es an die Zellmembran?). Sowohl die Ausdehnung des postsynaptischen Proteins PSD-95 als auch die Kolo-kalisation dieses Proteins mit dem  $Ca_v1.3$ -Kanal war bei den du/du-Mäusen verändert (s. Abbildungen 6.19 und 6.20, Postsynapsen-Struktur bei du/du-Mäusen). So schien die Ausdehnung der PSD-95-positiven Postsynapsen in den du/du-Mäusen größer. Zudem wurden bei den du/du-Mäusen weniger Kolo-kalisationen von Postsynapsen (PSD-95) mit  $Ca_v1.3$ -Kanal-Clustern gefunden. Da die Ergebnisse dieser Färbungen jedoch heterogen waren, wäre es wichtig, diese Versuche zu wiederholen und die Immunfärbungen mit höherer Auflösung (SIM-Mikroskopie) zu analysieren. Auch färbte der  $Ca_v1.3$ -Antikörper nicht immer zuverlässig und teilweise mit hohem Hintergrund, weshalb die Durchführung des Versuchs mit dem  $\beta_2$ -Antikörper bessere Aussagen zulassen könnte. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Mutation der  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit einen Einfluss auf die postsynaptische Struktur der IHZ und auch auf die nachfolgenden Neurone ausübt. Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit könnte für die korrekte Gegenüberstellung des Calciumkanals mit Strukturen der Postsynapse verantwortlich sein. Dies würde erklären, warum der größte Proteinanteil der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit extrazellulär vorhanden ist und außerdem spezifische Motive für Protein-Protein-Wechselwirkungen besitzt (z. B. VWA-Domäne).

### **8.9 Otoferlin-Expression und Zellkapazität der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen**

Otoferlin ist ein in IHZ vorkommendes Protein, dessen Beteiligung an der Exozytose diskutiert wird (Brandt et al., 2007; Roux et al., 2006). Aufgrund des reduzierten Calciumeinstroms

in die IHZ der du/du-Mäuse wäre auch hier eine reduzierte Exozytose zu erwarten (Brandt et al., 2003). Dies ist beispielsweise in den IHZ der  $\beta 2$ -defizienten Mäuse der Fall: der um 70 % reduzierte Calciumeinstrom führt zu einer 70%igen Reduktion der Exozytose (Neef et al., 2009). Immunhistochemische Färbungen der IHZ von du/du-Mäusen zeigten keinen Unterschied in der Otoferlin-Verteilung (s. Kapitel 8.9 Otoferlin-Expression und Zellkapazität der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen). Da das Protein überall in der Zelle vorkommt, geben diese Färbungen zusätzlich Auskunft über Zellvolumen und -form. Die gewählten Beispiele machen aber auch deutlich, dass die Lage der Zellen im Präparat die Morphologie der Zellen im zweidimensionalen Projektionsbild mitbestimmt. Einmal beobachtet man kurze, runde Zellen, ein anderes Mal sind sie lang gezogen mit einem „Knick“ am basalen Pol. Dies ist bei allen immunhistochemischen Färbungen zu beachten, da dies vorschnell zu falschen Aussagen führen kann. Deswegen lässt sich hier lediglich die Aussage treffen, dass Otoferlin auch in den IHZ der du/du-Mäuse vorhanden ist.

Die Zellkapazität der IHZ der du/du-Mäuse, die bei den elektrophysiologischen Messungen aufgenommen wurden, ergab, dass diese bei den du/du-Mäusen bei Messung von Calciumströmen um etwa 1 pF reduziert ist. Diese verringerte Zellgröße könnte einen Hinweis auf eine verminderte Exozytose in den IHZ der du/du-Mäuse geben. Diese findet im Ganzzell-Modus statt, während Endozytose unter diesen Messbedingungen stark reduziert ist. (Wildtyp:  $10.2 \text{ pF} \pm 1.4 \text{ pF}$ ; du/du:  $9.2 \text{ pF} \pm 1.1 \text{ pF}$ ). Bei den Bariumstrom-Messungen waren die Kapazitäten der Zellen zwischen den Genotypen nicht verschieden.

### **8.10 Die BK-Ströme sind in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse verändert**

Sowohl bei  $\text{Ca}_v1.3$ - als auch  $\beta 2$ -defizienten Mäusen ist die Expression und Funktion des BK-Kanals betroffen. Der Kaliumkanal wird bei Deletion von  $\text{Ca}_v1.3$  gar nicht exprimiert; bei  $\beta 2$ -defizienten Mäusen wird er nicht mehr am normalen Expressionsort, der Halsregion der Haarsinneszellen, sondern am synaptischen Pol exprimiert (Brandt et al., 2003; Neef et al., 2009). Die immunhistochemischen Färbungen des BK-Kanals der IHZ zeigten keine Auffälligkeit bei den du/du-Mäusen. Jedoch aktivierte der BK-Kanal bei du/du-Mäusen etwas langsamer, wenn auch alle anderen getesteten Parameter des Stroms (Strom bei 0 mV, Kapazität, Stromdichte bei 0 mV,  $V_{\text{half}}$  und Steepness) unverändert waren (s. Kapitel 6.5 Eigenschaften der BK-Kanäle in maturen inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen). Ein

geringer Teilstrom des BK-Kanals ist abhängig von extrazellulärem Calcium (Marcotti et al., 2004). Der Calciumstrom in den IHZ der du/du-Mäuse ist um 30 % reduziert. Der Calciumstrom erfährt in den  $Ca_v1.3$ - und  $\beta 2$ -defizienten Mäusen mit 70 % und 90 % eine drastischere Reduktion. Es ist also anzunehmen, dass der verbleibende Strom in den IHZ der du/du-Mäuse für die normale Expression des BK-Kanals am Hals der IHZ mit einer normalen Stromamplitude noch hinreichend ist. Jedoch könnte der BK-Kanal aus anderen Spleißvarianten der  $\alpha$ - und/oder anderen  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sein. Dies könnte durch einen vermuteten verringerten Calciumeinstrom schon während der Reifung der Haarzellen ausgelöst werden. Daher wäre es sehr interessant, den Calciumstrom in neonatalen IHZ von du/du-Mäusen zu untersuchen.

### **8.11 Wird das mutierte $\alpha_2\delta 2$ Protein in inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen exprimiert und gelangt es an die Zellmembran?**

Mehrfach wurde in der vorliegenden Arbeit (in Kooperation mit Prof. Dr. Gerald Obermair und PD Dr. Martin Jung) gezeigt, dass der  $\alpha_2\delta 2$ -Antikörper der Firma Santa Cruz (H-210) spezifisch sein könnte: (1) Die Dot-Blot-Analyse ergab drei Aminosäuresequenz-Abschnitte innerhalb des N-Terminus, an die der Antikörper bindet. (2) In Zellkultur-Experimenten hippocampaler Neurone mit Überexpression einer mit einem HA-Tag markierten  $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit wurde eine Plasmamembran-Färbung beobachtet. Umso erstaunlicher war der Befund, dass bei den du/du-Mäusen mit stark verkürzter mutierter  $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit in IHZ weiterhin eine Kolo-kalisation der  $\alpha_2\delta 2$ -Färbung mit den Ribbon-Synapsen beobachtet wurde. Der mutierten  $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit der du/du-Mäuse liegt eine Spontanmutation zugrunde, die nach aktuellem Kenntnisstand eine größere Umstrukturierung der Genregion mit sich zieht (Barclay et al., 2001). Diese Mutation führt zur Bildung zweier mRNA-Transkripte, von denen eines, zumindest im Cerebellum, auch nachweislich translatiert wird (Brodbeck et al., 2002). Diese verkürzte mRNA-Variante enthält die Exons 1-3, die lediglich ein sehr kleines Stück des N-Terminus der  $\alpha_2\delta 2$ -Untereinheit umfassen. Experimente an heterologen Expressionssystemen weisen darauf hin, dass dieses verkürzte Protein zwar gebildet wird, jedoch nicht zu seinem eigentlichen Zielort, der Plasmamembran gelangt. Der Membran verankernde  $\delta$ -Anteil des Proteins fehlt komplett und auch ein großer  $\alpha_2$ -Proteinteil wird nicht translatiert (Brodbeck et al., 2002). Der Antikörper erkennt in der Dot-Blot-Analyse Sequenzen, die in dem verkürzten  $\alpha_2\delta 2$ -Protein noch vorhanden sind (erste Erkennungsstelle innerhalb Exon 2,

zweite Erkennungsstelle am Übergang Exon 3 zu 4). Es ist deshalb möglich, dass der Antikörper in den IHZ der du/du-Mäuse das verkürzte Protein erkennt, welches zu seinem Zielort gelangt, seine Funktion jedoch nicht mehr vollständig erfüllen kann (s. Kapitel 8.6 Beeinflussung der Barium- und Calciumströme in inneren Haarsinneszellen der ducky-Mäuse). Bei heterologer Expression in COS-7 Zellen wurde der verkürzte  $\alpha_2\delta$ -Proteinteil nicht in der Membran detektiert (Brodbeck et al., 2002). Vielleicht fehlen diesen Zellen essentielle Proteine, die in den Haarsinneszellen für einen Transport des verkürzten  $\alpha_2\delta$ -Proteins zur Zellmembran sorgen.

Zusätzlich zu den oben genannten Experimenten wurde der  $\alpha_2\delta$ -Antikörper an IHZ  $Ca_v1.3$ -defizienter Mäusen getestet. Würde die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit nur in Verbindung mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit vorkommen, sollte keine Färbung zu sehen sein. Allerdings wurde in den IHZ des  $Ca_v1.3$ -defizienten Tieres eine ähnliche Färbung wie in den IHZ des Wildtyp-Tieres beobachtet. Der Versuch wurde jedoch aufgrund von Zuchtproblemen nur einmal durchgeführt. Dieses vorläufige Ergebnis legt nahe, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit auch ohne  $\alpha_1$ -Untereinheit an die Plasmamembran transportiert wird. Für die  $\alpha_2\delta 1$ -Untereinheit konnte dies bereits in neuronalem Gewebe und Muskelfasern gezeigt werden (García et al., 2008; Gee et al., 1996). Es bleibt jedoch die Frage offen, warum die Färbung an der Stelle so stabil ist, wo sie aufgrund der  $Ca_v1.3$ -Färbungen erwartet wurde. Wird die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen, eventuell auch extrazellulären Proteinen, an der Membran gehalten bzw. an ihren Bestimmungsort transportiert und kann sie dort Funktionen unabhängig von ihrer Wirkung auf den Calciumstrom ausüben (s. auch Kapitel 8.8 Veränderte postsynaptische Struktur der inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen)? In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, nach der Lokalisation der  $\beta 2$ -Untereinheit in  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen zu sehen. Die  $\beta$ -Untereinheit ist nicht wie die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in der Membran verankert, sondern befindet sich intrazellulär und ist zudem nicht-kovalent an die  $\alpha_1$ -Untereinheit gebunden (Übersicht in Buraei and Yang, 2010).

Trotz der hier gezeigten Experimente ist nicht völlig auszuschließen, dass der  $\alpha_2\delta$ -Antikörper andere  $\alpha_2\delta$ -Isoformen erkennt. Es wäre möglich, dass die IHZ der du/du-Mäuse andere  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten herauf regulieren, um den Verlust der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zu kompensieren. Laut dem Datenblatt des Antikörpers wird eine Kreuzreaktion mit den anderen  $\alpha_2\delta$ -Isoformen nicht ausgeschlossen (Information gemäß Santa Cruz, 2013: <http://datasheets.scbt.com/sc-66822.pdf>). Sequenzvergleiche der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten unter-

einander zeigen, dass an den Stellen, an denen der Antikörper bindet, die Aminosäuren teilweise identisch sind (etwa 30-40 % Sequenzhomologie). Es ist jedoch fraglich, ob das für die Bindung des Antikörpers noch ausreichend sind. Versuche an  $\alpha_2\delta_1$ ,  $\alpha_2\delta_3$  oder  $\alpha_2\delta_4$  exprimierenden Zellen wären in Hinblick auf diese Fragestellung vielversprechend.

Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten befinden sich fast vollständig extrazellulär und besitzen Domänen, die für Protein-Protein-Wechselwirkungen zuständig sind (VWA-Domäne, zwei Cache-Domänen; Anantharaman and Aravind, 2000; Jay et al., 1991; Whittaker and Hynes, 2002; Wisner et al., 1996). Proteine der extrazellulären Matrix wären ebenfalls mögliche Bindungspartner. Die extrazelluläre Matrix wird hauptsächlich aus Proteoglykanen und Polysacchariden gebildet (Übersicht in Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Sie dient der Stabilität von Zellen, sorgt für Wachstum und Differenzierung. Es wäre denkbar, dass  $\alpha_2\delta$ -Proteine die Calciumkanalkomplexe an der Plasmamembran verankern oder für eine bestmögliche Gegenüberstellung der präsynaptischen Freisetzungsorte und postsynaptischen Rezeptoren sorgen. So wurde beispielsweise im Gehirn gezeigt, dass extrazelluläre Matrixproteine als laterale Diffusionsbarrieren für Glutamat-Rezeptoren des AMPA-Typs wirken (Frischknecht et al., 2009). Hinweise, dass  $\alpha_2\delta$ -Proteine mit der extrazellulären Matrix wechselwirken, lieferten García et al. (2008). Sie zeigten, dass  $\alpha_2\delta_1$  wahrscheinlich mit Kollagen interagiert und so bei der Anhaftung und Verbreitung von Myoblasten eine Rolle spielt. Zudem wurde  $\alpha_2\delta_1$  als neuronaler Thrombospondin-Rezeptor identifiziert (Eroglu et al., 2009). Thrombospondin ist ebenfalls ein Protein der extrazellulären Matrix. Eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix stellen die perineuronalen Netze (PNN) im zentralen Nervensystem dar. Diese umgeben die Synapsen und Somata ausgewählter Neurone und sorgen für deren Stabilisierung. Vorläufige Ergebnisse zeigen eine starke Expression von Proteinen perineuronaler Netze in den zentralen Stationen der aufsteigenden Hörbahn und an IHZ-Synapsen (PD Dr. Dr. M. Morawski, persönliche Mitteilung; Maren Blosa, Dr. Mandy Sonntag, Dr. Stephanie Kuhn, Dr. Tobias Eckrich, Barbara Fell, Prof. Dr. Jutta Engel, unveröffentlicht). Erste Versuche an du/du-Mäusen zeigten, dass die Expression der perineuronalen Netzproteine Aggrecan, Proteoglykan Link Protein 1 und 4 an den IHZ nicht verändert zu sein scheint (Dr. Tobias Eckrich, Dr. Stephanie Kuhn). Da das verkürzte  $\alpha_2\delta_2$ -Protein in IHZ von du/du-Mäusen anscheinend weiterhin gebildet wird, wäre es interessant zu erfahren, ob  $\alpha_2\delta_2$  ein Wechselwirkungspartner dieser Proteine der perineuronalen Netze ist. Immunpräzipitations-Versuche könnten erste Ergebnisse in diese Richtung liefern.

## 8.12 Eignung der verwendeten ducky-Mauslinie und Ausblick

Die Mutation in der hier verwendeten du/du-Mauslinie führt zu keiner vollständigen Deletion der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, sondern zur Bildung eines verkürzten  $\alpha_2\delta$ -Proteins. Bislang wurde es als unwahrscheinlich erachtet, dass dieses Protein zur Zellmembran gelangt (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002). Diese Arbeit liefert gegenteilige Hinweise. Zudem ist bei dieser Mauslinie eine größere Genregion umstrukturiert, die nicht nur das *Cacna2d2*-Gen, sondern eventuell auch weitere Gene betreffen könnten. So liegt beispielsweise das Gen Semaphorin in dieser Region (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002). Die hier gezeigten Ergebnisse sind deswegen mit Vorbehalt zu betrachten, da nie absolute Rückschlüsse auf das reine Fehlen der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zu ziehen sind. Inwiefern das mutierte  $\alpha_2\delta$ -Protein oder auch andere betroffene Proteine noch einen Einfluss haben, ist nicht zu differenzieren. Neben der hier untersuchten du/du-Maus gibt es drei weitere Mausmodelle mit Mutation in dieser Untereinheit. Die Allele *ducky*<sup>2J</sup>, *ducky*<sup>entla</sup> und *Cacna2d2*<sup>tm1<sup>NCIF</sup></sup> haben ebenfalls eine Mutation oder Deletion der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zur Folge (Barclay et al., 2001; Brill et al., 2004; Donato et al., 2006; Ivanov et al., 2004). Die Mutationen resultieren aus weitaus weniger komplexen Umstrukturierungen des *Cacna2d2*-Gens (*ducky*<sup>2J</sup>: 2 Basenpaar-Deletion in Exon 9, *ducky*<sup>entla</sup>: Duplikation von 39 Aminosäuren in Exon 3, *Cacna2d2*<sup>tm1<sup>NCIF</sup></sup>: Deletion der Exons 33-39). Dadurch könnten systemische Einflüsse von anderen veränderten Proteinen ausgeschlossen werden. In Bezug auf das verkürzte  $\alpha_2\delta$ -Protein war dieses Mausmodell eine interessante Wahl. Es könnte nämlich möglich sein, dass dieses aus nur drei Exons bestehende Protein seinen Weg zur Zellmembran schafft. Es wäre für zukünftige Experimente interessant, die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in Haarsinneszellen spezifisch ausschalten zu können. So könnte unterschieden werden, welche Auswirkungen der Mutation in der du/du-Maus auf einen Verlust des Vollängenproteins und welche auf das Vorhandensein des verkürzten  $\alpha_2\delta$ -Proteins hindeuten. Ebenfalls spannend wären Untersuchungen von Mausmodellen mit entwicklungsabhängiger Deletion der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit. Eine Deletion unter dem Otoferlin-Promotor würde zu einem Ausschalten des Gens in IHZ im Embryonalstadium, unter dem Prestin-Promotor in IHZ und ÄHZ um Hörbeginn führen (Winter et al., 2009). Da sich die IHZ bis zum Hörbeginn stark entwickeln, was an Mäusen (Hörbeginn P12, Ehret, 1985) sehr gut untersucht werden kann, würden solche Mausmodelle eine ausführlichere Beschreibung des Einflusses der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zulassen.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass der  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanal in nativem Gewebe mit der  $\beta_2$ - und der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit einen funktionsfähigen Kanal bilden kann. Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist in den IHZ nicht vollständig ersetzbar und eine Mutation, wie sie in den du/du-Mäusen vorhanden ist, zieht einen Hörphänotyp nach sich. Es wurde gezeigt, dass der Calciumstrom in den IHZ der du/du-Mäuse geringer ist, weshalb Untersuchungen der Exozytose sehr interessant wären (Brandt et al., 2003). Nicht-stationäre Fluktuationsanalysen könnten Auskunft darüber geben, ob der reduzierte Calciumstrom der IHZ durch eine verringerte Anzahl an Kanälen in der Zellmembran begründet ist, wie dies für die  $\beta_2$ -Untereinheit gefunden wurde (Neef et al., 2009). Ob die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit auch an anderen Stellen der Hörbahn Funktionen ausübt, könnten Analysen der ABR-Wellenformen zeigen (Pirone et al., in Revision). Die wahrscheinlich spannendste Information beinhaltet jedoch der Befund, dass das verkürzte  $\alpha_2\delta$ -Protein der du/du-Maus in den IHZ anscheinend zur Zellmembran transportiert wird und darüber hinaus auch ohne die  $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit in der Membran verankert wird (s. Kapitel 6.3.4 Test eines  $\alpha_2\delta$ -Antikörpers an inneren Haarsinneszellen von ducky-Mäusen). Dies lässt vermuten, dass die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in IHZ noch andere Interaktionspartner als die  $\alpha_1$ -Untereinheiten besitzen, die sie an ihren Bestimmungsort transportieren und dort vielleicht auch verankern. Es wäre folglich auch denkbar, dass sie in den IHZ neben der Wirkung auf Calciumströme andere Aufgaben haben (Eroglu et al., 2009; Pirone et al., in Revision). Zusammen mit der Tatsache, dass die postsynaptische Struktur bei den du/du-Mäusen verändert zu sein scheint, zeigen diese Ergebnisse vermutlich das größte Potential für zukünftige Forschungsansätze auf.

## 9 Literatur

Anantharaman, V., and Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem. Sci.* 25, 535–537.

Andrade, A., Sandoval, A., González-Ramírez, R., Lipscombe, D., Campbell, K.P., and Felix, R. (2009). The alpha(2)delta subunit augments functional expression and modifies the pharmacology of Ca(V)1.3 L-type channels. *Cell Calcium* 46, 282–292.

Angelotti, T., and Hofmann, F. (1996). Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel  $\alpha 2/\delta$  subunit. *FEBS Letters* 397, 331–337.

Arikath, J., and Campbell, K.P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 298–307.

Ashmore, J.F., Géléoc, G.S., and Harbott, L. (2000). Molecular mechanisms of sound amplification in the mammalian cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11759–11764.

Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., et al. (2011). Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature Neuroscience* 14, 77–84.

Balligand, J.-L., and Cannon, P.J. (1997). Nitric Oxide Synthases and Cardiac Muscle Autocrine and Paracrine Influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1846–1858.

Bangalore, R., Mehrke, G., Gingrich, K., Hofmann, F., and Kass, R.S. (1996). Influence of L-type Ca channel alpha 2/delta-subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am. J. Physiol.* 270, H1521–1528.

Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S.L., Letts, V.A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K.M., Kusumi, K., et al. (2001). Ducky Mouse Phenotype of Epilepsy and Ataxia Is Associated with Mutations in the Cacna2d2 Gene and Decreased Calcium Channel Current in Cerebellar Purkinje Cells. *J. Neurosci.* 21, 6095–6104.

Bauer, C.S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., Kadurin, I., Ranjan, Y.S., Fernandez-Alacid, L., Millar, N.S., et al. (2009). The Increased Trafficking of the Calcium Channel Subunit  $\alpha 2\delta$ -1 to Presynaptic Terminals in Neuropathic Pain Is Inhibited by the  $\alpha 2\delta$  Ligand Pregabalin. *J. Neurosci.* 29, 4076–4088.

Bauer, C.S., Tran-Van-Minh, A., Kadurin, I., and Dolphin, A.C. (2010). A new look at calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits. *Current Opinion in Neurobiology* 20, 563–571.

Beavo, J.A., and Brunton, L.L. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 710–718.

Von Békésy, G. (1960). *Experiments in Hearing* (New York: Mc Graw Hill Inc.).

- Berglund, A.M., and Ryugo, D.K. (1987). Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J. Comp. Neurol.* *255*, 560–570.
- Bernstein, G.M., and Jones, O.T. (2007). Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: role of the alpha2/delta subunit. *Cell Calcium* *41*, 27–40.
- Beutner, D., and Moser, T. (2001). The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J. Neurosci.* *21*, 4593–4599.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., and De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* *25*, 177–190.
- Brandt, A., Striessnig, J., and Moser, T. (2003). CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J. Neurosci.* *23*, 10832–10840.
- Brandt, A., Khimich, D., and Moser, T. (2005). Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J. Neurosci.* *25*, 11577–11585.
- Brandt, N., Kuhn, S., Münkner, S., Braig, C., Winter, H., Blin, N., Vonthein, R., Knipper, M., and Engel, J. (2007). Thyroid Hormone Deficiency Affects Postnatal Spiking Activity and Expression of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> Channels in Rodent Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* *27*, 3174–3186.
- Brickley, K., Campbell, V., Berrow, N., Leach, R., Norman, R.I., Wray, D., Dolphin, A.C., and Baldwin, S.A. (1995). Use of site-directed antibodies to probe the topography of the alpha 2 subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett.* *364*, 129–133.
- Brill, J., Klocke, R., Paul, D., Boison, D., Gouder, N., Klugbauer, N., Hofmann, F., Becker, C.-M., and Becker, K. (2004). entla, a novel epileptic and ataxic Cacna2d2 mutant of the mouse. *J. Biol. Chem.* *279*, 7322–7330.
- Brodbeck, J., Davies, A., Courtney, J.-M., Meir, A., Balaguero, N., Canti, C., Moss, F.J., Page, K.M., Pratt, W.S., Hunt, S.P., et al. (2002). The Ducky Mutation in Cacna2d2 Results in Altered Purkinje Cell Morphology and Is Associated with the Expression of a Truncated  $\alpha 2\delta$ -2 Protein with Abnormal Function. *J. Biol. Chem.* *277*, 7684–7693.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., and de Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* *227*, 194–196.
- Buraei, Z., and Yang, J. (2010). The  $\beta$  Subunit of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Physiol Rev* *90*, 1461–1506.
- Burgess, D.L., Biddlecome, G.H., McDonough, S.I., Diaz, M.E., Zilinski, C.A., Bean, B.P., Campbell, K.P., and Noebels, J.L. (1999). beta subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* *13*, 293–311.
- Cantí, C., Davies, A., and Dolphin, A.C. (2003). Calcium Channel  $\alpha 2\delta$  Subunits: Structure, Functions and Target Site for Drugs.
- Cantí, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A., et al. (2005). The metal-ion-dependent adhesion site

in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha_2\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *PNAS* 102, 11230–11235.

Carrier, G.O., Fuchs, L.C., Winecoff, A.P., Giulumian, A.D., and White, R.E. (1997). Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am. J. Physiol.* 273, H76–84.

Catterall, A.W. (1995). Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. *Annual Review of Biochemistry* 64, 493–531.

Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.

Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57, 411–425.

Cole, R.L., Lechner, S.M., Williams, M.E., Prodanovich, P., Bleicher, L., Varney, M.A., and Gu, G. (2005). Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta ( $\alpha_2\delta$ ) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *The Journal of Comparative Neurology* 491, 246–269.

Cui, G., Meyer, A.C., Calin-Jageman, I., Neef, J., Haeseleer, F., Moser, T., and Lee, A. (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins tune  $\text{Ca}^{2+}$ -feedback to Cav1.3 channels in mouse auditory hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* 585, 791–803.

Cui, J., Yang, H., and Lee, U. (2009). Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 852–875.

Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Minh, A.T.V., Foucault, I., Koch, D., Pratt, W.S., Saibil, H.R., and Dolphin, A.C. (2006). The Calcium Channel  $\alpha_2\delta$ -2 Subunit Partitions with Cav2.1 into Lipid Rafts in Cerebellum: Implications for Localization and Function. *J. Neurosci.* 26, 8748–8757.

Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C.S., Pratt, W.S., and Dolphin, A.C. (2010). The  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *PNAS* 107, 1654–1659.

Dettling, J., Franz, C., Zimmermann, U., Lee, S.C., Bress, A., Brandt, N., Feil, R., Pfister, M., Engel, J., Flamant, F., et al. Autonomous functions of murine thyroid hormone receptor TR $\alpha$  and TR $\beta$  in cochlear hair cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*.

Dickman, D.K., Kurshan, P.T., and Schwarz, T.L. (2008). Mutations in a Drosophila alpha2delta voltage-gated calcium channel subunit reveal a crucial synaptic function. *J. Neurosci.* 28, 31–38.

Dolphin, A.C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology* 147, S56–S62.

Dolphin, A.C. (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 237–244.

Dolphin, A.C. (2012). Calcium channel auxiliary  $\alpha_2\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one step

beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 542–555.

Donato, R., Page, K.M., Koch, D., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Davies, A., Wilkinson, T., Rees, M., Edwards, F.A., and Dolphin, A.C. (2006). The ducky2J Mutation in *Cacna2d2* Results in Reduced Spontaneous Purkinje Cell Activity and Altered Gene Expression. *J. Neurosci.* 26, 12576–12586.

Dou, H., Vazquez, A.E., Namkung, Y., Chu, H., Cardell, E.L., Nie, L., Parson, S., Shin, H.-S., and Yamoah, E.N. (2004). Null mutation of  $\alpha 1D$   $Ca^{2+}$  channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 5, 215–226.

Duncker, S.V., Franz, C., Kuhn, S., Schulte, U., Campanelli, D., Brandt, N., Hirt, B., Fakler, B., Blin, N., Ruth, P., et al. (2013). Otoferlin couples to clathrin-mediated endocytosis in mature cochlear inner hair cells. *J. Neurosci.* 33, 9508–9519.

Edvardson, S., Oz, S., Abulhijaa, F.A., Taher, F.B., Shaag, A., Zenvirt, S., Dascal, N., and Elpeleg, O. (2013). Early infantile epileptic encephalopathy associated with a high voltage gated calcium channelopathy. *J. Med. Genet.* 50, 118–123.

Ehret, G. (1985). Behavioural studies on auditory development in mammals in relation to higher nervous system functioning. *Acta Otolaryngol Suppl* 421, 31–40.

Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., and Heinemann, S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705–715.

Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., and Boulter, J. (2001).  $\alpha 10$ : a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3501–3506.

Ellis, S.B., Williams, M.E., Ways, N.R., Brenner, R., Sharp, A.H., Leung, A.T., Campbell, K.P., McKenna, E., Koch, W.J., and Hui, A. (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241, 1661–1664.

Engel, J., Braig, C., Rüttiger, L., Kuhn, S., Zimmermann, U., Blin, N., Sausbier, M., Kalbacher, H., Münkner, S., Rohbock, K., et al. (2006). Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea. *Neuroscience* 143, 837–849.

Eroglu, C., Allen, N.J., Susman, M.W., O'Rourke, N.A., Park, C.Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S.B., Annis, D.S., Huberman, A.D., et al. (2009). Gabapentin receptor  $\alpha 2\delta 1$  is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380–392.

Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., et al. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25, 533–535.

Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M., and Campbell, K.P. (1997). Dissection of functional domains of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 2\delta$  subunit. *J. Neurosci.* 17, 6884–6891.

Field, M.J., Cox, P.J., Stott, E., Melrose, H., Offord, J., Su, T.-Z., Bramwell, S., Corradini, L., England, S., Winks, J., et al. (2006). Identification of the  $\alpha 2\delta 1$  subunit of voltage-dependent

calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *PNAS* 103, 17537–17542.

Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D., and Sibley, D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* 62, 525–563.

Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., and Gundelfinger, E.D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 12, 897–904.

Fuchs, P.A., Glowatzki, E., and Moser, T. (2003). The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 452–458.

Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B., and Keef, K.D. (1999). Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Activates Cloned BKCa Channels Expressed in Mammalian Cells by Direct Phosphorylation at Serine 1072. *J. Biol. Chem.* 274, 10927–10935.

Fuller-Bicer, G.A., Varadi, G., Koch, S.E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., Muth, J.N., Mikala, G., Petrashevskaya, N.N., Jordan, M.A., et al. (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha_2\delta$ -1-subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H117–H124.

Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M.H., Lerman, M., Lee, J.-H., Perez-Reyes, E., et al. (2000). Functional Properties of a New Voltage-dependent Calcium Channel  $\alpha_2\delta$  Auxiliary Subunit Gene (CACNA2D2). *J. Biol. Chem.* 275, 12237–12242.

García, K., Nabhani, T., and García, J. (2008). The calcium channel  $\alpha_2\delta$ 1 subunit is involved in extracellular signalling. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 727–738.

Gebhart, M., Juhasz-Vedres, G., Zuccotti, A., Brandt, N., Engel, J., Trockenbacher, A., Kaur, G., Obermair, G.J., Knipper, M., Koschak, A., et al. (2010). Modulation of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channel gating by Rab3 interacting molecule. *Molecular and Cellular Neuroscience* 44, 246–259.

Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U., Offord, J., Thurlow, R., and Woodruff, G.N. (1996). The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha_2\delta$  subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* 271, 5768–5776.

Geisler, C.D. (1998). *From Sound to Synapse: Physiology of the Mammalian Ear* (Oxford University Press).

Glowatzki, E., and Fuchs, P.A. (2002). Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat. Neurosci.* 5, 147–154.

Glueckert, R., Wietzorrek, G., Kammen-Jolly, K., Scholtz, A., Stephan, K., Striessnig, J., and Schrott-Fischer, A. (2003). Role of class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels for cochlear morphology. *Hearing Research* 178, 95–105.

Gong, H.C., Hang, J., Kohler, W., Li, L., and Su, T.-Z. (2001). Tissue-specific Expression and Gabapentin-Binding Properties of Calcium Channel  $\alpha_2\delta$  Subunit Subtypes. *Journal of Membrane Biology* 184, 35–43.

- Gosepath, K., Gath, I., Maurer, J., Pollock, J.S., Amedee, R., Förstermann, U., and Mann, W. (1997). Characterization of nitric oxide synthase isoforms expressed in different structures of the guinea pig cochlea. *Brain Research* 747, 26–33.
- Grant, L., and Fuchs, P. (2008). Calcium- and calmodulin-dependent inactivation of calcium channels in inner hair cells of the rat cochlea. *J. Neurophysiol.* 99, 2183–2193.
- Green, G.E., Khan, K.M., Beisel, K.W., Drescher, M.J., Hatfield, J.S., and Drescher, D.G. (1996). Calcium Channel Subunits in the Mouse Cochlea. *Journal of Neurochemistry* 67, 37–45.
- Guinan, J.J., Jr (2006). Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear* 27, 589–607.
- Gurnett, C.A., De Waard, M., and Campbell, K.P. (1996). Dual Function of the Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel  $\alpha_2\delta$  Subunit in Current Stimulation and Subunit Interaction. *Neuron* 16, 431–440.
- Gurnett, C.A., Felix, R., and Campbell, K.P. (1997). Extracellular Interaction of the Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> Channel  $\alpha_2\delta$  and  $\alpha_1$  Subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 18508–18512.
- Hackney, C.M., Mahendrasingam, S., Penn, A., and Fettiplace, R. (2005). The Concentrations of Calcium Buffering Proteins in Mammalian Cochlear Hair Cells. *J. Neurosci.* 25, 7867–7875.
- Harden, R.N. (1999). Gabapentin: a new tool in the treatment of neuropathic pain. *Acta Neurol. Scand., Suppl.c* 173, 43–47; discussion 48–52.
- Heblich, F., Tran Van Minh, A., Hendrich, J., Watschinger, K., and Dolphin, A.C. (2008). Time course and specificity of the pharmacological disruption of the trafficking of voltage-gated calcium channels by gabapentin. *Channels (Austin)* 2, 4–9.
- Hecker, D.J., Lohscheller, J., Bader, C., Delb, W., Schick, B., and Dlugaiczyk, J. (2011). A New Method to Analyze Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAEs) in the High-Frequency Range Up to 18 kHz Using Windowed Periodograms. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 58, 2369–2377.
- Heinrich, U.-R., Maurer, J., Koesling, D., Mann, W., and Förstermann, U. (2000). Immunoelectron microscopic localization of the  $\alpha_1$  and  $\beta_1$ -subunits of soluble guanylyl cyclase in the guinea pig organ of Corti. *Brain Research* 885, 6–13.
- Hendrich, J., Minh, A.T.V., Heblich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A., and Dolphin, A.C. (2008). Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the  $\alpha_2\delta$  ligand gabapentin. *PNAS* 105, 3628–3633.
- Hidalgo, P., and Neely, A. (2007). Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel  $\beta$ -subunit. *Cell Calcium* 42, 389–396.
- Hille, B. (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Sinauer Associates, Incorporated).
- Hobom, M., Dai, S., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2000). Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel  $\alpha_2\delta$ -2 subunit. *European Journal of Neuroscience* 12, 1217–1226.

- Hoppa, M.B., Lana, B., Margas, W., Dolphin, A.C., and Ryan, T.A. (2012).  $\alpha 2\delta$  expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. *Nature* 486, 122–125.
- Housley, G.D., Marcotti, W., Navaratnam, D., and Yamoah, E.N. (2006). Hair Cells – Beyond the Transducer. *Journal of Membrane Biology* 209, 89–118.
- Hudspeth, A.J. (1989). How the ear's works work. *Nature* 341, 397–404.
- Ivanov, S.V., Ward, J.M., Tessarollo, L., McAreavey, D., Sachdev, V., Fananapazir, L., Banks, M.K., Morris, N., Djurickovic, D., Devor-Henneman, D.E., et al. (2004). Cerebellar Ataxia, Seizures, Premature Death, and Cardiac Abnormalities in Mice with Targeted Disruption of the *Cacna2d2* Gene. *The American Journal of Pathology* 165, 1007–1018.
- Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O.D., and Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J. Neurosci.* 20, 59–65.
- Jaumann, M., Dettling, J., Gubelt, M., Zimmermann, U., Gerling, A., Paquet-Durand, F., Feil, S., Wolpert, S., Franz, C., Varakina, K., et al. (2012). cGMP-Prkg1 signaling and Pde5 inhibition shelter cochlear hair cells and hearing function. *Nature Medicine* 18, 252–259.
- Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S.D., Vedvick, T.S., Harpold, M.M., and Campbell, K.P. (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J. Biol. Chem.* 266, 3287–3293.
- Jensen, A.A., Mosbacher, J., Elg, S., Lingenhoehl, K., Lohmann, T., Johansen, T.N., Abrahamsen, B., Mattsson, J.P., Lehmann, A., Bettler, B., et al. (2002). The anticonvulsant gabapentin (neurontin) does not act through gamma-aminobutyric acid-B receptors. *Mol. Pharmacol.* 61, 1377–1384.
- Johnson, S.L., and Marcotti, W. (2008). Biophysical properties of CaV1.3 calcium channels in gerbil inner hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 1029–1042.
- Johnson, S.L., Marcotti, W., and Kros, C.J. (2005). Increase in efficiency and reduction in Ca<sup>2+</sup> dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* 563, 177–191.
- Johnson, S.L., Kuhn, S., Franz, C., Ingham, N., Furness, D.N., Knipper, M., Steel, K.P., Adelman, J.P., Holley, M.C., and Marcotti, W. (2013). Presynaptic maturation in auditory hair cells requires a critical period of sensory-independent spiking activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8720–8725.
- Jones, L.P., Wei, S.K., and Yue, D.T. (1998). Mechanism of auxiliary subunit modulation of neuronal alpha1E calcium channels. *J. Gen. Physiol.* 112, 125–143.
- De Jongh, K.S., Warner, C., and Catterall, W.A. (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* 265, 14738–14741.
- Kang, M.-G., and Campbell, K.P. (2003). Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* 278, 21315–21318.
- Kemp, D.T. (2002). Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *Br Med Bull* 63, 223–241.

- Klugbauer, N., Lacinová, L., Marais, E., Hobom, M., and Hofmann, F. (1999). Molecular Diversity of the Calcium Channel  $\alpha 2\delta$  Subunit. *J. Neurosci.* *19*, 684–691.
- Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Münkner, S., Knipper, M., and Engel, J. (2007). Persistence of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> Channels in Mature Outer Hair Cells Supports Outer Hair Cell Afferent Signaling. *J. Neurosci.* *27*, 6442–6451.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., and Striessnig, J. (2001).  $\alpha 1D$  (Cav1.3) subunits can form I-type Ca<sup>2+</sup> channels activating at negative voltages. *J. Biol. Chem.* *276*, 22100–22106.
- Kros, C.J., and Crawford, A.C. (1990). Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J. Physiol. (Lond.)* *421*, 263–291.
- Kros, C.J., Ruppersberg, J.P., and Rüscher, A. (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* *394*, 281–284.
- Kuhn, S., Knirsch, M., Rüttiger, L., Kasperek, S., Winter, H., Freichel, M., Flockerzi, V., Knipper, M., and Engel, J. (2009). Ba<sup>2+</sup> currents in inner and outer hair cells of mice lacking the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel subunits  $\beta 3$  or  $\beta 4$ . *Channels* *3*, 366–376.
- Kurt, S., Sausbier, M., Rüttiger, L., Brandt, N., Moeller, C.K., Kindler, J., Sausbier, U., Zimmermann, U., van Straaten, H., Neuhuber, W., et al. (2012). Critical role for cochlear hair cell BK channels for coding the temporal structure and dynamic range of auditory information for central auditory processing. *FASEB J* *26*, 3834–3843.
- Langer, P., Gründer, S., and Rüscher, A. (2003). Expression of Ca<sup>2+</sup>-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea. *The Journal of Comparative Neurology* *455*, 198–209.
- Lanneau, C., Green, A., Hirst, W.D., Wise, A., Brown, J.T., Donnier, E., Charles, K.J., Wood, M., Davies, C.H., and Pangalos, M.N. (2001). Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology* *41*, 965–975.
- Lieberman, M.C., Gao, J., He, D.Z.Z., Wu, X., Jia, S., and Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* *419*, 300–304.
- Lim, I., Yun, J., Kim, S., Lee, C., Seo, S., Kim, T., and Bang, H. (2005). Nitric Oxide Stimulates a Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel in Human Skin Fibroblasts through Protein Kinase G Pathway. *Skin Pharmacology and Physiology* *18*, 279–287.
- Lipscombe, D., Helton, T.D., and Xu, W. (2004). L-Type Calcium Channels: The Low Down. *J Neurophysiol* *92*, 2633–2641.
- Lu, G., Mazet, B., Sarr, M.G., and Szurszewski, J.H. (1998). Effect of nitric oxide on calcium-activated potassium channels in colonic smooth muscle of rabbits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *274*, G848–G856.
- Luo, Z.D., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Sorkin, L.S., Stauderman, K.A., Williams, M.E., and Yaksh, T.L. (2001). Upregulation of Dorsal Root Ganglion  $\alpha 2\delta$  Calcium Channel Subunit and Its Correlation with Allodynia in Spinal Nerve-Injured Rats. *J. Neurosci.* *21*, 1868–1875.
- Luo, Z.D., Calcutt, N.A., Higuera, E.S., Valder, C.R., Song, Y.-H., Svensson, C.I., and Myers, R.R. (2002). Injury type-specific calcium channel  $\alpha 2\delta 1$  subunit up-regulation in rat

neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 1199–1205.

Lv, P., Rodriguez-Contreras, A., Kim, H.J., Zhu, J., Wei, D., Choong-Ryoul, S., Eastwood, E., Mu, K., Levic, S., Song, H., et al. (2010). Release and Elementary Mechanisms of Nitric Oxide in Hair Cells. *J Neurophysiol* **103**, 2494–2505.

Ly, C.V., Yao, C.-K., Verstreken, P., Ohyama, T., and Bellen, H.J. (2008). straightjacket is required for the synaptic stabilization of cacophony, a voltage-gated calcium channel alpha1 subunit. *J. Cell Biol.* **181**, 157–170.

Mahapatra, S., Marcantoni, A., Zuccotti, A., Carabelli, V., and Carbone, E. (2012). Equal sensitivity of Cav1.2 and Cav1.3 channels to the opposing modulations of PKA and PKG in mouse chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* **590**, 5053–5073.

Marais, E., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2001). Calcium Channel  $\alpha 2\delta$  Subunits—Structure and Gabapentin Binding. *Mol Pharmacol* **59**, 1243–1248.

Marcotti, W., Johnson, S.L., Holley, M.C., and Kros, C.J. (2003a). Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J Physiol* **548**, 383–400.

Marcotti, W., Johnson, S.L., Rusch, A., and Kros, C.J. (2003b). Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* **552**, 743–761.

Marcotti, W., Johnson, S.L., and Kros, C.J. (2004). Effects of intracellular stores and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  currents in mature mouse inner hair cells. *J Physiol* **557**, 613–633.

Meera, P., Wallner, M., and Toro, L. (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5562–5567.

Meier, H. (1968). The neuropathology of ducky, a neurological mutation of the mouse. A pathological and preliminary histochemical study. *Acta Neuropathol.* **11**, 15–28.

Michna, M., Knirsch, M., Hoda, J.-C., Muenkner, S., Langer, P., Platzer, J., Striessnig, J., and Engel, J. (2003). Cav 1.3 ( $\alpha 1D$ )  $\text{Ca}^{2+}$  currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol* **553**, 747–758.

Moore, R.A., Wiffen, P.J., Derry, S., and McQuay, H.J. (2011). Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD007938.

Müller, M., von Hünenbein, K., Hoidis, S., and Smolders, J.W.T. (2005). A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear. Res.* **202**, 63–73.

Murakami, M., Nakagawasai, O., Yanai, K., Nunoki, K., Tan-No, K., Tadano, T., and Iijima, T. (2007). Modified behavioral characteristics following ablation of the voltage-dependent calcium channel beta3 subunit. *Brain Res.* **1160**, 102–112.

Neef, J., Gehrt, A., Bulankina, A.V., Meyer, A.C., Riedel, D., Gregg, R.G., Strenzke, N., and Moser, T. (2009). The  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Subunit  $\beta 2$  Regulates  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Abundance and Function in Inner Hair Cells and Is Required for Hearing. *J. Neurosci.* **29**, 10730–10740.

- Neher, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Meth. Enzymol.* *207*, 123–131.
- Nemzou N, R.M., Bulankina, A.V., Khimich, D., Giese, A., and Moser, T. (2006). Synaptic organization in cochlear inner hair cells deficient for the CaV1.3 (alpha1D) subunit of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroscience* *141*, 1849–1860.
- Newton, R.A., Bingham, S., Case, P.C., Sanger, G.J., and Lawson, S.N. (2001). Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *95*, 1–8.
- Nouvian, R., Beutner, D., Parsons, T.D., and Moser, T. (2006). Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J. Membr. Biol.* *209*, 153–165.
- Oliver, D., Klöcker, N., Schuck, J., Baukowitz, T., Ruppertsberg, J.P., and Fakler, B. (2000). Gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* *26*, 595–601.
- Oliver, D., Knipper, M., Derst, C., and Fakler, B. (2003). Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J. Neurosci.* *23*, 2141–2149.
- Petit, C., Levilliers, J., and Hardelin, J.-P. (2001). Molecular Genetics of Hearing Loss. *Annual Review of Genetics* *35*, 589–645.
- Pickles, J.O., and Corey, D.P. (1992). Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* *15*, 254–259.
- Pickles, J.O., Comis, S.D., and 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.
- Pierce, D.A., Holt, S.R., and Reeves-Daniel, A. (2008). A probable case of gabapentin-related reversible hearing loss in a patient with acute renal failure. *Clin Ther* *30*, 1681–1684.
- Pirone, A., Kurt, S., Zuccotti, A., Rüttiger, L., Pilz, P., Brown, D., Franz, C., Schweizer, M., Rust, M.B., Rübtsamen, R., Friauf, E., Knipper, M., and Engel, J.  $\alpha 2\delta 3$  is essential for normal structure and function of auditory nerve synapses and is a novel candidate for auditory processing disorders. In Revision.
- Platano, D., Qin, N., Noceti, F., Birnbaumer, L., Stefani, E., and Olcese, R. (2000). Expression of the alpha(2)delta subunit interferes with prepulse facilitation in cardiac L-type calcium channels. *Biophys. J.* *78*, 2959–2972.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell* *102*, 89–97.
- Pöhler, D., Butt, E., Meissner, J., Müller, S., Lohse, M., Walter, U., Lohmann, S.M., and Jarchau, T. (1995). Expression, purification, and characterization of the cGMP-dependent protein kinases I beta and II using the baculovirus system. *FEBS Lett.* *374*, 419–425.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P., and Campbell, K.P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the

alpha 1-subunit. *Nature* 368, 67–70.

Puel, J.L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog. Neurobiol.* 47, 449–476.

Qin, N., Olcese, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1998). Modulation of human neuronal alpha 1E-type calcium channel by alpha 2 delta-subunit. *Am. J. Physiol.* 274, C1324–1331.

Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.-L., Codd, E.E., and D'Andrea, M.R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol. Pharmacol.* 62, 485–496.

Risher, W.C., and Eroglu, C. (2012). Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biol.* 31, 170–177.

Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., et al. (2006). Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell* 127, 277–289.

Ruel, J., Chen, C., Pujol, R., Bobbin, R.P., and Puel, J.L. (1999). AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)* 518 ( Pt 3), 667–680.

Rusznák, Z., and Szucs, G. (2009). Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. *Pflugers Arch.* 457, 1303–1325.

Saheki, Y., and Bargmann, C.I. (2009). Presynaptic CaV2 calcium channel traffic requires CALF-1 and the alpha(2)delta subunit UNC-36. *Nat. Neurosci.* 12, 1257–1265.

Schimmang, T., Tan, J., Müller, M., Zimmermann, U., Rohbock, K., Köpschall, I., Limberger, A., Minichiello, L., and Knipper, M. (2003). Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss. *Development* 130, 4741–4750.

Schlick, B., Flucher, B.E., and Obermair, G.J. (2010). Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167, 786–798.

Schmidt, R.F., Lang, F., and Heckmann, M. (2005). *Physiologie Des Menschen: Mit Pathophysiologie* (Springer DE).

Schug, N., Braig, C., Zimmermann, U., Engel, J., Winter, H., Ruth, P., Blin, N., Pfister, M., Kalbacher, H., and Knipper, M. (2006). Differential expression of otoferlin in brain, vestibular system, immature and mature cochlea of the rat. *European Journal of Neuroscience* 24, 3372–3380.

De Sevilla Müller, L.P., Liu, J., Solomon, A., Rodriguez, A., and Brecha, N.C. (2013). Expression of voltage-gated calcium channel  $\alpha 2\delta 4$  subunits in the mouse and rat retina. *Journal of Comparative Neurology* 521, 2486–2501.

Shen, J., Harada, N., and Yamashita, T. (2003). Nitric oxide inhibits adenosine 5'-triphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> response in inner hair cells of the guinea pig cochlea. *Neurosci. Lett.* 337, 135–138.

Shen, J., Harada, N., Nakazawa, H., and Yamashita, T. (2005). Involvement of the nitric

oxide–cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signalling in cochlear inner hair cells. *European Journal of Neuroscience* 21, 2912–2922.

Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., and Dascal, N. (1995). Ca<sup>2+</sup> current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J. Physiol. (Lond.)* 489 (Pt 1), 55–62.

Simmons, D.D. (2002). Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *Journal of Neurobiology* 53, 228–250.

Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253, 1553–1557.

Sipos, I., Pika-Hartlaub, U., Hofmann, F., Flucher, B.E., and Melzer, W. (2000). Effects of the dihydropyridine receptor subunits gamma and alpha2delta on the kinetics of heterologously expressed L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Pflugers Arch.* 439, 691–699.

Snell, G.D. (1955). Ducky, a new second chromosome mutation in the mouse. *Journal of Heredity* 46, 27–29.

Sobkowicz, H.M., Rose, J.E., Scott, G.E., and Slapnick, S.M. (1982). Ribbon synapses in the developing intact and cultured organ of Corti in the mouse. *J. Neurosci.* 2, 942–957.

Sokolov, S., Weiss, R.G., Timin, E.N., and Hering, S. (2000). Modulation of slow inactivation in class A Ca<sup>2+</sup> channels by beta-subunits. *J. Physiol. (Lond.)* 527 Pt 3, 445–454.

Spoendlin, H. (1969). Innervation patterns in the organ of Corti of the cat. *Acta Otolaryngol.* 67, 239–254.

Stefanini, M., De Martino, C., and Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173–174.

Striessnig, J., and Koschak, A. (2008). Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels with gene knockout models. *Channels (Austin)* 2, 233–251.

Striessnig, J., Koschak, A., Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Nguyen, N.K., Busquet, P., Pelster, G., and Singewald, N. (2006). Role of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms for brain function. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 903–909.

Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F., and Catterall, W.A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5478–5482.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313–318.

Tarabova, B., Lacinova, L., and Engel, J. (2007). Effects of phenylalkylamines and benzothiazepines on Ca(v)1.3-mediated Ca<sup>2+</sup> currents in neonatal mouse inner hair cells. *Eur. J. Pharmacol.* 573, 39–48.

Taylor, C.P., Angelotti, T., and Fauman, E. (2007). Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for

- antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res.* 73, 137–150.
- Tran-Van-Minh, A., and Dolphin, A.C. (2010). The  $\alpha 2\delta$  Ligand Gabapentin Inhibits the Rab11-Dependent Recycling of the Calcium Channel Subunit  $\alpha 2\delta$ -2. *J. Neurosci.* 30, 12856–12867.
- De Waard, M., Pragnell, M., and Campbell, K.P. (1994).  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 13, 495–503.
- Whittaker, C.A., and Hynes, R.O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* 13, 3369–3387.
- Winter, H., Rüttiger, L., Müller, M., Kuhn, S., Brandt, N., Zimmermann, U., Hirt, B., Bress, A., Sausbier, M., Conscience, A., et al. (2009). Deafness in TR $\beta$  Mutants Is Caused by Malformation of the Tectorial Membrane. *J. Neurosci.* 29, 2581–2587.
- Wiser, O., Trus, M., Tobi, D., Halevi, S., Giladi, E., and Atlas, D. (1996). The alpha 2/delta subunit of voltage sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels is a single transmembrane extracellular protein which is involved in regulated secretion. *FEBS Lett.* 379, 15–20.
- Witsell, D.L., Hannley, M.T., Stinnet, S., and Tucci, D.L. (2007). Treatment of tinnitus with gabapentin: a pilot study. *Otol. Neurotol.* 28, 11–15.
- Wycisk, K.A. (2006). Identification of a Gene Defect Associated with Abnormal Signal Transmission in Retinal Ribbon-Type Synapses. PhD thesis. Universität Zürich.
- Wycisk, K.A., Budde, B., Feil, S., Skosyrski, S., Buzzi, F., Neidhardt, J., Glaus, E., Nürnberg, P., Ruether, K., and Berger, W. (2006a). Structural and Functional Abnormalities of Retinal Ribbon Synapses due to *Cacna2d4* Mutation. *IOVS* 47, 3523–3530.
- Wycisk, K.A., Zeitz, C., Feil, S., Wittmer, M., Forster, U., Neidhardt, J., Wissinger, B., Zrenner, E., Wilke, R., Kohl, S., et al. (2006b). Mutation in the Auxiliary Calcium-Channel Subunit *CACNA2D4* Causes Autosomal Recessive Cone Dystrophy. *The American Journal of Human Genetics* 79, 973–977.
- Yang, P.S., Alseikhan, B.A., Hiel, H., Grant, L., Mori, M.X., Yang, W., Fuchs, P.A., and Yue, D.T. (2006). Switching of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of  $\text{Ca}(\text{v})1.3$  channels by calcium binding proteins of auditory hair cells. *J. Neurosci.* 26, 10677–10689.
- Yasuda, T., Chen, L., Barr, W., McRory, J.E., Lewis, R.J., Adams, D.J., and Zamponi, G.W. (2004). Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1–13.
- Zampini, V., Johnson, S.L., Franz, C., Lawrence, N.D., Münkner, S., Engel, J., Knipper, M., Magistretti, J., Masetto, S., and Marcotti, W. (2010). Elementary properties of  $\text{CaV}1.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels expressed in mouse cochlear inner hair cells. *J Physiol* 588, 187–199.
- Zheng, J., Shen, W., He, D.Z., Long, K.B., Madison, L.D., and Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405, 149–155.
- Zhou, X.-B., Wulfsen, I., Utku, E., Sausbier, U., Sausbier, M., Wieland, T., Ruth, P., and Korth, M. (2010). Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8005–8010.

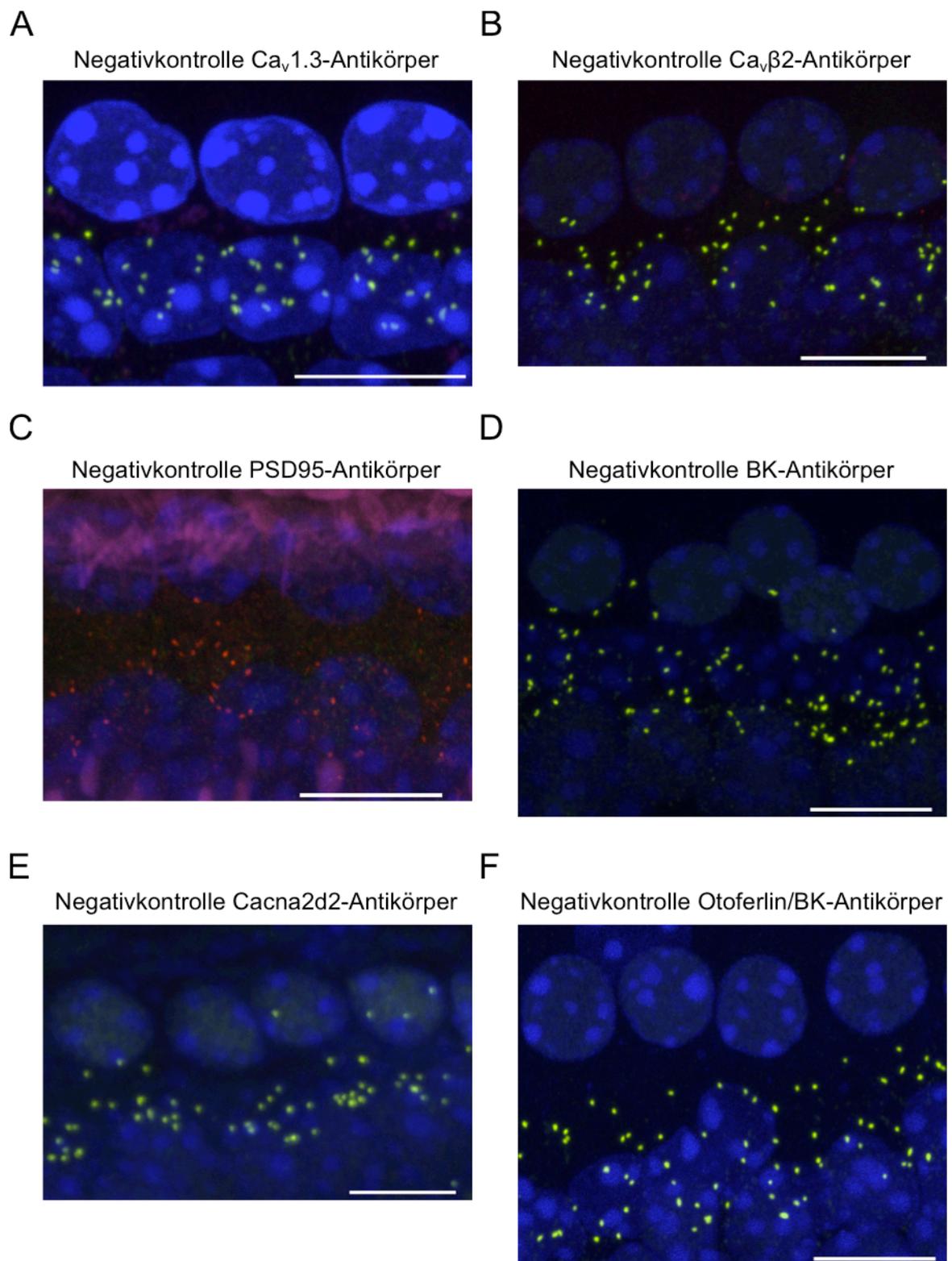
Zimmermann, D.R., and Dours-Zimmermann, M.T. (2008). Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.* 130, 635–653.

Zuccotti, A., Kuhn, S., Johnson, S.L., Franz, C., Singer, W., Hecker, D., Geisler, H.-S., Köpschall, I., Rohbock, K., Gutsche, K., et al. (2012). Lack of brain-derived neurotrophic factor hampers inner hair cell synapse physiology, but protects against noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.* 32, 8545–8553.

## **10 Anhang I**

### **10.1 Immunhistochemische Versuche: Negativkontrollen**

Die folgende Abbildung (10.1) zeigt die Negativkontrollen zu den immunhistochemischen Versuchen.



**Abbildung 10.1: Negativkontrollen der immunhistochemischen Versuche**

Maximumintensitätsprojektionen der Negativkontrollen. Die bei den Versuchen mitgeführten Negativkontrollen wurden nicht mit dem jeweils aufgeführten primären Antikörper inkubiert, um unspezifische

Färbung des sekundären Antikörpers ausschließen zu können. Bei gleicher Anregung ist keine Fluoreszenz für den betreffenden Antikörper zu erkennen. Die Gegenfärbungen (CtBP2/RIBEYE, grün und Ca<sub>v</sub>1.3, rot), Zellkern-Färbung (DAPI, blau) und in einem Fall die Stereozilien-Färbung (violett) wurden zur Orientierung im Präparat mitgeführt. **A:** Negativkontrolle für den Ca<sub>v</sub>1.3-Antikörper, Gegenfärbung mit CtBP2/RIBEYE; **B:** Negativkontrolle für den Ca<sub>v</sub>β2-Antikörper; Gegenfärbung mit CtBP2/RIBEYE-Antikörper; **C:** Negativkontrolle für den PSD-95-Antikörper; Gegenfärbung mit Ca<sub>v</sub>1.3-Antikörper; **D:** Negativkontrolle für den BK-Antikörper, Gegenfärbung mit CtBP2/RIBEYE-Antikörper; **E:** Negativkontrolle für den Cacna2d2-Antikörper, Gegenfärbung mit CtBP2/RIBEYE-Antikörper; **F:** Negativkontrolle für den Otoferlin- und BK-Antikörper, Gegenfärbung mit CtBP2/RIBEYE-Antikörper; Maßstab: 10 µm

## 11 Anhang II

### 11.1 Dank

Ich möchte mich bei allen denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Sehr herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Jutta Engel für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, Ihre herausragende Betreuung und Ihre engagierte Unterstützung bei allen Fragen und Problemen. Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick, Frau Dr. Julia Dlugaiczyk und Herrn Dietmar Hecker (Abteilung Experimentelle Audiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Schick, HNO Klinik, Universitätsklinikum des Saarland) für Durchführung und Auswertung der Hörmessungen. Bei Herrn Prof. Dr. Gerald Obermair, Herrn Roman Egger und Frau Stefanie Geisler (Sektion für Physiologie, Medizinische Universität Innsbruck) bedanke ich mich für Durchführung und Auswertungen der quantitativen Real-Time-PCR. Ebenfalls danken möchte ich Herrn PD Dr. Martin Jung und Frau Elisabeth Ludes (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Richard Zimmermann, Universität des Saarlandes) für Durchführung und Analyse der Dot-Blot-Experimente. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Veit Flockerzi (Fachrichtung Allgemeine und klinische Pharmakologie, Universität des Saarlandes) danke ich für die Bereitstellung des  $Ca_v\beta 2$ -Antikörpers. Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Schmitz (Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät, Universität des Saarlandes), die mir den PSD-95-Antikörper zur Verfügung stellte. Herrn Prof. Dr. Peter Ruth (Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) danke ich für seine Hilfestellungen und Anregungen zur den Untersuchungen des BK-Kanals. Herr Dr. Stefan Münkner hat mir meine Forschungsarbeit durch Messplatz-Aufbau und Datenanalyse-Makros enorm erleichtert. Zudem war er bei Fragen technischer wie physikalischer Natur stets verlässlicher Ansprechpartner und Ratgeber. Dafür möchte ich ihm danken. Ein riesiges Dankeschön gilt meinen Kolleginnen und Kollegen für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch während der gesamten Promotion: Angela, Anne Lore, Isa, Jenny, Jutta, Kerstin, Niels, Rike, Stefan, Steffi, Tobias und Veronika. Freunden und Familie möchte ich für den immerwährenden Rückhalt meinen tiefen Dank aussprechen.

## 11.2 Publikationen und Konferenzbeiträge

Die Daten des  $\alpha_2\delta$ -Projekts sind zum jetzigen Zeitpunkt vollständig ausreichend für Publikation in einer internationalen Fachzeitschrift. Das Manuskript befindet sich in Vorbereitung.

**Fell, B.**, Obermair, G.J., Hecker, D., Dlugaiczyk, J., Eckrich, S., Jung, M., Münkner, S., Schick, B., Engel, J. *The Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_2\delta_2$  regulates Ca<sup>2+</sup> channel abundance and function in mouse inner hair cells and is required for normal hearing*

Engel J., **Fell, B.**, Pirone, A., Kurt, S., Zuccotti, A., Rüttiger, L., Brown, D., Schweizer, M., Obermair, G.J., Dlugaiczyk, J., Hecker, D., Rübsamen, R., Schick, B., Friauf, E., Knipper M. Prag (2013) *The role of calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunits for hearing function in the cochlea and auditory brainstem*. Featured Regional Meeting of the Federation of European Neuroscience societies 2013, Prague, Czech Republic

Engel, J., **Fell, B.**, Pirone, A., Kurt, S., Zuccotti, A., Rüttiger, L., Pilz, P., Brown, D., Franz, C., Schweizer, M., Rust, M., Brandt, n., Obermair, G., Dlugaiczyk, J., Hecker, D., Rübsamen, R., Schick, B., Friauf, E., Knipper, M., Münkner, S. Birmingham (2013). *Ca<sup>2+</sup> channel subunits  $\alpha_2\delta_2$  and  $\alpha_2\delta_3$  are essential for normal hearing in mice*. 37th Congress of the International Union of physiological sciences 2013, Birmingham, United Kingdom

**Fell, B.**, Brandt, N., Obermair, G., Dlugaiczyk, J., Hecker, D., Schick, B. & Engel, J. Göttingen (2013). *Ducky mice with a mutant  $\alpha_2\delta_2$  Ca<sup>2+</sup> channel subunit: a new model for sensorineural hearing impairment*. 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen

Engel, J., **Fell, B.**, Brandt, N., Münkner, S. (2012). *Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent big conductance potassium (BK) channels in sensory hair cells – essential for proper hearing but still a mystery*. First Joint Meeting of the IRTG1830, Jasper, Canada

**Fell, B.**, Brandt, N., Obermair, G. J., Dlugaiczyk, J., Hecker, D., Schick, B. & Engel, J. (2012). *ducky mice with a mutant  $\alpha 2\delta$  Ca<sup>2+</sup> channel subunit: a new model for hearing impairment*. SFB894 Meeting 2012, Homburg

**Disteldorf, B.**, Brandt, N., Münkner, S. & Engel, J. (2012). *Effects of elevated cGMP levels on BK currents in mature mouse inner hair cells*. Poster presented at the 35th Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, San Diego, CA. [Travel Award der Association for Research in Otolaryngology (500 \$)]

**Disteldorf, B.**, Scheuer, V., Brandt, N., Obermair, G. J., Pirone, A., Schweizer, M., Dlugaiczyk, J., Hecker, D., Schick, B., Rüttiger, L., Knipper, M. & Engel, J. (2012). *Expression of  $\alpha 2\delta$  Ca<sup>2+</sup> channel subunits in the peripheral auditory system and their role in hearing of mice*. 1st European Calcium Channel Conference, Alpbach, Austria

**Disteldorf, B.**, Brandt, N. & Engel, J. (2011). *Effects of elevated cGMP levels on the biophysical properties of BK currents in mature mouse inner hair cells*. 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen

**Disteldorf, B.**, Brandt, N., Pirone, A., Obermair, G. & Engel, J. (2011). Auxiliary  $\alpha 2\delta$  Ca<sup>2+</sup> channel subunits of mouse inner hair cells. SFB894/GK1326/MCBO Joint Meeting 2011, Homburg

Al-Ansary, D., Bogeski, I., **Disteldorf B. M.**, Becherer, U. & Niemeyer B. A. (2010). ATP modulates Ca<sup>2+</sup> uptake by TRPV6 and is counteracted by isoform-specific phosphorylation. *FASEB Journal*, 24, 425-35. doi:10.1096/fj.09-141481