

Ca²⁺-Kanäle in cochleären Haarsinneszellen

von Maus und Ratte:

Entwicklungsgang der Ca²⁺-Ströme
und molekulare Zusammensetzung

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Martina Knirsch
aus Stuttgart

vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 2007

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Knipper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. -U. Schnitzler

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Jutta Engel für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die exzellente Betreuung und die motivierende Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Des Weiteren danke ich Stefan Münkner für seine Hilfe bei der Auswertung der Daten und das angenehme „Raumklima“, Stephanie Kuhn und Niels Brandt für die gute Zusammenarbeit und die seelische & moralische Unterstützung. Sylvia Kasperek gilt mein großer Dank für ihre zuverlässige technische Hilfe.

Marlies Knipper, Bernhard Hirt, Harald Winter und Lukas Rüttiger danke ich für ihre ergänzenden Arbeiten in Form von Immunfärbungen und Hörmessungen. Ich danke Claudia Braig für ihre Hilfe bei der Molekularbiologie und Veit Flockerzi und Marc Freichel für die Bereitstellung der „*knock out*“-Mäuse.

Auch allen weiteren Kollegen aus dem Hörforschungszentrum gilt mein Dank. Insbesondere Manuela Nowotny und Karsten Löffler für ihren Zuspruch und ihre Freundschaft.

Ich danke der Christiane Nüsslein-Volhard-Stiftung für die finanzielle und moralische Förderung. Dem Gleichstellungsbüro der Universität Tübingen danke ich für die Hilfe bei der Antragsstellung sowie Organisation der finanziellen Unterstützung durch das Hochschul- und Wissenschaftsprogramm des Bundes und der Länder.

Außerdem gilt mein großer Dank Harald Krug für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes während meiner Zeit als Gastwissenschaftlerin am Forschungszentrum Karlsruhe.

Ich danke meinen Freunden für ihre Ermutigungen.

Meiner großen Patch-Work-Familie für ihren Rückhalt.

Meinem Mann für sein Leben mit mir.

Meinen Kindern Jonathan, Paul und Lisa für alles, was mein Leben ausmacht.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 9 |
| 1.1. | Das Hören | 9 |
| 1.2. | Hören unterschiedlicher Frequenzen und cochleäre Verstärkung | 10 |
| 1.3. | Transduktionsstrom und Rezeptorpotential in Haarsinneszellen | 11 |
| 1.3.1. | Funktion der inneren Haarsinneszellen | 12 |
| 1.3.2. | Funktion der äußeren Haarsinneszellen | 13 |
| 1.4. | Spannungsgesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle | 15 |
| 1.4.1. | Der Aufbau spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanäle | 16 |
| 1.4.2. | Besonderheiten der Ca ²⁺ -Kanäle in Haarsinneszellen | 17 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 2.1. | Präparation | 20 |
| 2.2. | Elektrophysiologische Messungen von Ca ²⁺ -Kanal-Strömen in Haarsinneszellen | 20 |
| 2.3. | Gewebsspezifische RT-PCR | 25 |
| 2.4. | Zellspezifische RT-PCR | 26 |
| 2.5. | Genotypisierung der Ca _v β4-Mäuse | 29 |
| 3 | ERGEBNISSE | 31 |
| 3.1. | Ca _v 1.3-Ca ²⁺ -Kanäle in neonatalen (P1-P8) äußeren Haarsinneszellen der Maus | 31 |
| 3.1.1. | Biophysikalische Eigenschaften des Ca ²⁺ -Kanals in neonatalen ÄHZ | 31 |
| 3.1.2. | Pharmakologische Eigenschaften des Ca ²⁺ -Kanals in äußeren Haarsinneszellen | 35 |
| 3.1.3. | Molekulare Identität der Ca ²⁺ -Kanäle in äußeren Haarsinneszellen | 37 |
| 3.2. | Ca _v 1.3-Ca ²⁺ -Kanäle in reifen äußeren Haarsinneszellen von Maus und Ratte | 39 |
| 3.2.1. | Optimierung der Versuchsbedingungen für elektrophysiologische Messungen an reifen äußeren Haarsinneszellen | 39 |
| 3.2.2. | Biophysikalische Eigenschaften des Ca ²⁺ -Kanals in reifen äußeren Haarsinneszellen der Maus | 42 |
| 3.2.3. | Ca ²⁺ -Kanal-Ströme in neonatalen HZ der Ratte | 44 |
| 3.2.4. | Ca ²⁺ -Kanal-Ströme in reifen HZ der Ratte | 46 |
| 3.2.5. | Die Amplitude des Barium-Stroms zeigte sowohl in ÄHZ als auch in IHZ von Maus und Ratte ein entwicklungsabhängiges Maximum | 48 |
| 3.2.6. | Nachweis von Ca _v 1.3 mRNA in ausgereiften Haarsinneszellen von Maus und Ratte | 51 |
| 3.3. | Die Ca _v β-Untereinheiten in äußeren und inneren Haarsinneszellen der Maus | 52 |
| 3.3.1. | Nachweis Ca _v β-spezifischer Transkripte in äußeren und inneren Haarsinneszellen | 52 |
| 3.3.2. | Biophysikalische Eigenschaften der Ca ²⁺ -Kanal-Ströme in Haarsinneszellen von Ca _v β3 ^{-/-} - und Ca _v β4 ^{-/-} -Mäusen | 55 |

Inhalt

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4 | DISKUSSION | 68 |
| 4.1. | Calcium-Kanal-Ströme in neonatalen äußeren Haarsinneszellen von Maus und Ratte | 69 |
| 4.2. | Calcium-Kanal-Ströme in reifen äußeren Haarsinneszellen von Maus und Ratte.... | 71 |
| 4.3. | Die β-Untereinheiten des $Ca_v1.3$ in cochleären Haarsinneszellen der Maus..... | 74 |
| 5 | LITERATUR | 83 |
| | EIGENE PUBLIKATIONEN..... | 95 |
| | LEBENS LAUF | 98 |

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) des neonatalen (postnataler Tag 1 (P1) - P8) und ausgereiften (P9 - P28) Cortischen Organs von Mäusen und Ratten charakterisiert und denen der inneren Haarsinneszellen (IHZ) gegenübergestellt. In ÄHZ wurden vor und nach Hörbeginn (P12) Ca^{2+} -Kanal-Ströme gemessen, die aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem L-Typ-Kanal-Agonisten Bay K 8644 und dem L-Typ-Kanal-Antagonisten Nifedipin als L-Typ-Kanäle identifiziert werden konnten. Der Ca^{2+} -Kanal-Strom war in ÄHZ von $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen auf 3 % des Kontrollwerts reduziert und der verbleibende Reststrom konnte durch Bay K 8644 nicht vergrößert werden.

Da die reifen ÄHZ der Mäuse in den üblicherweise verwendeten Extrazellulärlösungen äußerst instabil waren und anschwellen, wurden neue Lösungskombinationen mit dem Zusatz von Tamoxifen oder der Substitution von Cl^- durch Laktobionat entwickelt. Zudem wurden elektrophysiologische Messungen an den robusteren und größeren ÄHZ der Ratte durchgeführt.

Sowohl in IHZ als auch in ÄHZ der Ratte wurde eine entwicklungsabhängige Regulation des Ca^{2+} -Kanal-Stroms beobachtet. Ein Maximum der Barium-Strom (I_{Ba})-Amplitude in ÄHZ wurde um P1-P4, in IHZ um P9-P11 erreicht. In ausgereiften Altersstadien verblieb der I_{Ba} auf niedrigem (ÄHZ) und mittlerem (IHZ) Niveau.

Sowohl in inneren als auch in äußeren HZ fließt der Großteil des Ca^{2+} -Stroms durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle. Dennoch weichen die elektrophysiologischen Eigenschaften der IHZ leicht von denen äußerer HZ ab. Beispielsweise zeigen Ca^{2+} -Kanal-Ströme in IHZ während lang anhaltender (300 ms) Depolarisationen eine etwas stärkere spannungsabhängige Inaktivierung (*voltage dependent inactivation*, VDI) als in ÄHZ. Auch die Strom-Spannungs-Kurven weisen mit abweichenden $V_{1/2}$ und V_{max} auf gewisse Unterschiede der Kanäle in beiden Haarzelltypen hin.

Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle bestehen aus vier verschiedenen Untereinheiten: einer transmembranären α_1 -Untereinheit, die die Pore bildet und den Spannungssensor trägt, einer intrazellulären β -Untereinheit ($\text{Ca}_v\beta$) und den membranständigen Untereinheiten γ und $\alpha_2\delta$.

Um zu überprüfen, ob die geringfügigen Abweichungen der elektrophysiologischen Kanaleigenschaften in IHZ und ÄHZ auf unterschiedliche Kombinationen des Kanals aus α_1 - und β -Untereinheit zurückzuführen ist, wurde mittels RT-PCR β -spezifische mRNA im Cortischen Organ und auch in IHZ- und ÄHZ detektiert. Im Widerspruch zu Green et al. (Green *et al.*, 1996) ließen sich im Cortischen Organ alle 4 bekannten β -Untereinheiten des spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals nachweisen. Auch in ÄHZ gelang die Amplifikation aller 4 β -spezifischen Fragmente. In IHZ dagegen ließen sich molekularbiologisch $\text{Ca}_v\beta 1$, $\text{Ca}_v\beta 2$ und $\text{Ca}_v\beta 3$ nachweisen, jedoch nicht $\text{Ca}_v\beta 4$.

Die direkten Auswirkungen des Fehlens einer einzelnen β -Untereinheit wurden durch elektrophysiologische Messungen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in IHZ und ÄHZ von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp (WT)- Strömen analysiert.

Hierbei wurden Parameter wie Maximalamplitude des Ca^{2+} -Kanal-Stroms (I_{\max}), halbmaximale Aktivierung ($V_{1/2}$), der Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion (k) sowie die Zeitkonstante der Aktivierung und der Grad der Inaktivierung bestimmt: In ÄHZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäuse führte das Fehlen dieser β -Untereinheit zu einer signifikanten Abnahme der Stromamplitude, zu einer Verschiebung von k und zu einer Zunahme der spannungsgesteuerten Inaktivierung des Kanals. In IHZ dagegen führten der Verlust von $\text{Ca}_v\beta 3$ sowie das Fehlen von $\text{Ca}_v\beta 4$ zu einer signifikant schnelleren Aktivierungskinetik. In neonatalen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse waren zudem $V_{1/2}$, k und die Membrankapazität im Vergleich zu den WT-Zellen verändert:

ÄHZ zeigten nach Verlust von $\text{Ca}_v\beta 4$ eine Verschiebung des Boltzmann-Parameters k und eine verlangsamte Kinetik der Kanalaktivierung. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von $\text{Ca}_v\beta 3$ und $\text{Ca}_v\beta 4$ am Aufbau der

Zusammenfassung

Ca_v1.3-Kanäle sowohl in IHZ als auch in ÄHZ. Sie sind jedoch für die Kanal- und Hörfunktion nicht essentiell.

1 Einleitung

1.1. Das Hören

Bei sämtlichen höheren Tierarten stellt das Hörorgan ein wichtiges Sinnesorgan dar. In den akustischen Sinnesorganen der Vertebraten übernehmen mechanosensitive Haarsinneszellen (HZ) die Rolle, Schallwellen in elektrische Erregung umzuwandeln und über den Hörnerv zum Gehirn weiterzuleiten. Hierbei müssen je nach Tierart Signale unterschiedlicher Frequenzbereiche aufgelöst werden. Reptilien beispielsweise sind auf niederfrequente Bereiche bis 4000 Hz, in Ausnahmen sogar bis 7000 Hz, spezialisiert. Vögel hören im allgemeinen zwischen 150 Hz und 4000 Hz (Fettiplace & Fuchs, 1999), im hohen Frequenzbereich sogar bis 12000 Hz (Manley & Koppl, 1998). Ein normal hörender Mensch ist in der Lage, Frequenzen zwischen 16 und 20000 Hz wahrzunehmen, wohingegen zahlreiche andere Säugetierarten wie Hunde, Katzen und kleine Nagetiere auch Frequenzen im Ultraschallbereich hören können (Manley & Koppl, 1998).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Hörorgan von Mäusen und Ratten untersucht. Nagetiere dienen in der Hörforschung häufig als Modell-Säuger, da sie einerseits über ein gutes Hörvermögen verfügen und andererseits unkompliziert und preisgünstig zu züchten sind. Für zahlreiche relevante Gene existieren inzwischen transgene Mäuse, die für die Erforschung und für das Verständnis vieler hörphysiologischer Prozesse eine große Bedeutung haben.

Das Innenohr der Säugetiere besteht aus dem für den Gleichgewichtssinn verantwortlichen Vestibularorgan und dem spiralförmig gewundenen Hörorgan, der Cochlea. Das Sinnesepithel, das Cortische Organ, befindet sich auf der Basilmembran (Abb. 1). Die Haarsinneszellen sind in unterschiedliche Typen von Stützzellen eingebettet und werden in innere (IHZ) und äußere Haarsinneszellen (ÄHZ) unterschieden. Die für das Hören primär wichtigen IHZ bilden eine entlang des Cortischen Organs verlaufende Zellreihe. In IHZ erfolgt die Transduktion der Schallreize in elektrische Erregung und deren Weiterleitung an den Hörnerv.

ÄHZ sind dagegen in drei parallelen Reihen angeordnet und fungieren aufgrund ihrer besonderen Membraneigenschaften als cochleäre Signalverstärker (siehe 1.2.).

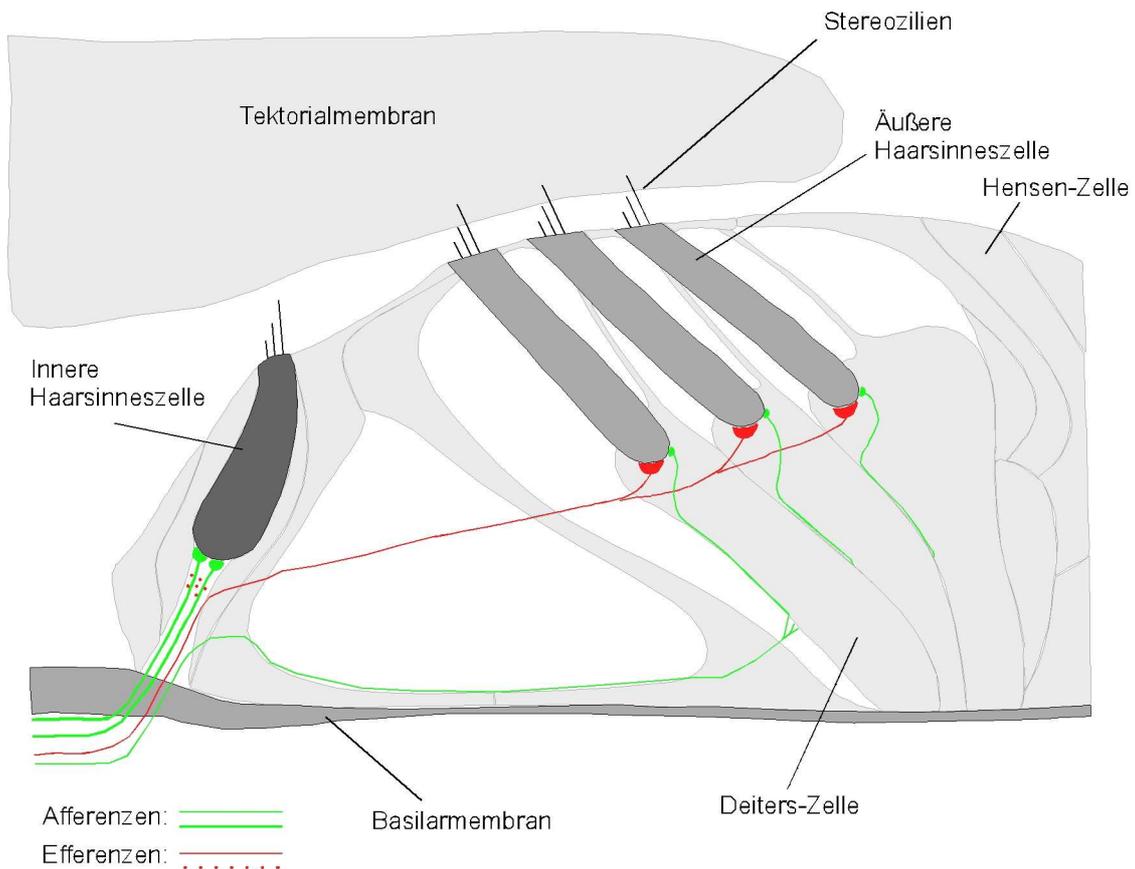


Abbildung 1: Schema der zellulären Struktur des Cortischen Organs.

Ein Transversalschnitt durch die mittlere Cochlea-Windung zeigt die Anordnung der Stützzellen, sowie die darin eingebetteten äußeren und inneren Haarsinneszellen auf der Basilarmembran. Die Breite des Cortischen Organs beträgt $\sim 150 \mu\text{m}$. Modifiziert nach Jutta Engel nach (Liberman *et al.*, 1990)

1.2. Hören unterschiedlicher Frequenzen und cochleäre Verstärkung

Der Mechanismus der Frequenzanalyse bei Säugern ist vor allem den mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran zuzuschreiben. Ein eintreffendes Schallereignis breitet sich entlang der Cochlea von basal nach apikal hin wellenförmig aus (Wanderwelle). Aufgrund der zum apikalen Ende der

Cochlea, dem Helikotrema, abnehmenden Steifigkeit der Basilarmembran existiert für jede Frequenz auf dem Cortischen Organ eine charakteristische Stelle, an der die Wanderwelle ihre maximale Amplitude erreicht. Dabei bewirken höhere Frequenzen ein Amplitudenmaximum an basalen Abschnitten der Cochlea, je niedriger die Frequenz des Schalls, desto näher liegt der Ort des Maximums am Apex der Cochlea. Somit werden jeweils nur Haarsinneszellen in definierten Bereichen des Cortischen Organs erregt.

Da die Schwingungen des Cortischen Organs durch die sich darin befindenden Flüssigkeiten und die Trägheit aller Strukturen gedämpft werden, ist eine lokale Verstärkung durch die ÄHZ nötig, um scharf begrenzte Amplitudenmaxima zu erzeugen. ÄHZ sind in der Lage, auf eine Depolarisation mit Längenänderungen zu reagieren (Brownell *et al.*, 1985). Dies wird durch das in der lateralen Membran lokalisierte spannungssensitive Motorprotein Prestin ermöglicht (Zheng *et al.*, 2000). Durch diese Kontraktionen wird die Schwingung der Basilarmembran am Ort des Amplitudenmaximums vergrößert und damit die Reizung der IHZ verstärkt (Nilsen & Russell, 2000).

1.3. Transduktionsstrom und Rezeptorpotential in Haarsinneszellen

Eintreffende Schallwellen bewirken eine Verschiebung der Tektorialmembran gegen die Basilarmembran. Da die am apikalen Pol der Haarsinneszellen lokalisierten Stereozilien mit der Tektorialmembran in Verbindung stehen, werden sie so zum längsten Stereozilium hin abgeschert, was der adäquate Reiz für die Haarsinneszellen ist. Die dadurch ausgelöste Öffnung der Transduktionskanäle führt zu einem Einstrom von K^+ und Ca^{2+} und damit zu einer Depolarisation der Zelle. Dieser Transduktionsstrom aktiviert spannungsabhängige Ionenkanäle am basolateralen Pol der HZ.

Spannungsabhängige K^+ -Kanäle hyperpolarisieren die Zelle zurück auf ihr Ruhepotential. Eine Abscherung der Stereozilien in die Gegenrichtung führt dagegen zum Schließen der Transduktionskanäle. Der Ca^{2+} -Einstrom durch

spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle führt zur Freisetzung von Neurotransmitter (Glutamat), der afferente Fasern aktiviert.

In der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der Exocytose-auslösenden spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanäle der HZ im Vordergrund.

1.3.1. Funktion der inneren Haarsinneszellen

Die inneren Haarsinneszellen (IHZ) bilden die für das Hören wichtigsten sensorischen Rezeptorzellen der Säugercochlea. Indem sie Neurotransmitter freisetzen übernehmen sie die Rolle, Schallreize in Signale für das zentrale Nervensystem umzuwandeln.

Die afferente synaptische Verschaltung der IHZ verläuft über die peripheren Dendriten der Typ-I-Spiralganglienneuronen. 90-95 % der Spiralganglienneurone sind Typ-I-Zellen. Ein Typ-I-Spiralganglionneuron besitzt jeweils nur einen peripheren Dendriten, der mit einer einzigen IHZ verbunden ist. Jede IHZ wiederum steht mit mehreren (10-30) Typ-I-Afferenzen in Kontakt (Spendlin, 1969).

Bei Mäusen und Ratten setzt zwischen P10 und P14 die Hörfunktion ein. IHZ von Mäusen und Ratten sind vom Zeitpunkt kurz vor der Geburt (E17) bis zum Erreichen des hörenden Phänotyps um P12 in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren. Bereits vor diesem Zeitraum werden an der Basis der IHZ die ersten synaptischen Kontakte gebildet (Pujol *et al.*, 1997) und die Expression einer Vielzahl von Ionenkanälen heraufreguliert, wie beispielsweise des einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanal-Stroms I_{K1} (Marcotti *et al.*, 1999; Marcotti *et al.*, 2003a) (Marcotti *et al.*, 2003a), des spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.3$ (Platzer *et al.*, 2000; Dou *et al.*, 2004) sowie des TTX-sensitiven Na^+ -Kanals (Ehret, 1977; Marcotti *et al.*, 2003b). Die Anwesenheit dieser Ionenkanäle ermöglicht die Generierung spontaner Aktionspotentiale, die bereits in der Lage sind, Exozytose und die Freisetzung von Transmittern auszulösen (Glowatzki & Fuchs, 2002). Dies begünstigt vermutlich die korrekte synaptische Verschaltung.

Die zum Zeitpunkt der Geburt stark ausgeprägte Verästelung der Typ-I-Afferenzen (Innervation mehrerer IHZ durch eine Afferenz, transiente Kollaterale zu ÄHZ und multiple Kontakte einer Afferenz mit derselben IHZ) wird mit Ende der Spontanaktivität zurückgebildet, so dass mit Erreichen des muren Phänotyps der IHZ eine 1:1 Verschaltung mit afferenten Fasern besteht (Sobkowicz *et al.*, 1982;Echteler, 1992) (Echteler, 1992;Pujol *et al.*, 1997).

1.3.2. Funktion der äußeren Haarsinneszellen

Äußere Haarsinneszellen (ÄHZ) sind in der Lage, auf Schallreize aufgrund ihrer Elektromotilität mit Längenänderungen zu reagieren und fungieren damit als cochleäre Signalverstärker. Dies bildet die Grundlage für die außergewöhnliche Sensitivität und Frequenzselektivität des Säugerohrs (Davis, 1983;Dallos & Corey, 1991).

ÄHZ werden hauptsächlich durch efferente Endigungen innerviert. Der Ursprung dieser Fasern liegt im Medialen Olivocochleären Komplex (MOC; 75 % contralateral, 25 % ipsilateral) (Maison *et al.*, 2003). Der Grad der Verstärkung der ÄHZ kann dadurch von zentral reguliert werden.

Die wenigen Afferenzen (nur ~ 5-10 % aller Spiralganglienneurone) werden durch Typ-II-Spiralganglienzellen gebildet. Typ-II-Afferenzen sind dünner, unmyelinisiert und weniger zahlreich als die Typ-I-Afferenzen der IHZ. Eine ÄHZ der Maus wird von ~3 Afferenzen innerviert (Berglund & Ryugo, 1987). Bei Meerschweinchen und beim Mensch wird jede ÄHZ von 4-8 afferenten Fasern kontaktiert (Takasaka & Shinkawa, 1987;Felix, 2002) (Nadol, Jr., 1988). Typ-II-Afferenzen verzweigen sich und innervieren 6-18 ÄHZ (Berglund & Ryugo, 1987;Jagger & Housley, 2003), die dann an ein Typ-II-Spiralganglienneuron weitergeleitet werden.

In vivo -Ableitungen von Typ-II-Fasern konnten keine Aktionspotentiale nachweisen (Robertson, 1984), was vermutlich technischen Problemen geschuldet war. Dies, sowie die relativ geringe afferente Innervierung und die wenigen präsynaptischen Spezialisierungen an der Basis der ÄHZ führten dazu,

dass eine afferente Funktion lange Zeit angezweifelt wurde. Durch Patch-Clamp-Messungen an jungen (P7) Typ-II-Neuronen konnten hier jedoch Aktionspotentiale gezeigt werden (Jagger & Housley, 2003; Reid *et al.*, 2004), die einen Hinweis auf funktionierende Typ-II-Afferenzen geben.

Das Ableiten von Aktionspotentialen an einzelnen Typ-II-Fasern ist technisch sehr schwierig und auch Exozytosemessungen in ÄHZ blieben bislang erfolglos. Hinweise auf funktionierende Afferenzen in ausgereiften ÄHZ gab jedoch der elektronenmikroskopische Nachweis von Ribbons und synaptischen Vesikeln an der Basis äußerer HZ (Sobkowicz *et al.*, 1986; Nadol, Jr., 1988; Felix, 2002) sowie Immunfärbungen des Ribbonsynapsen-Proteins RIBEYE/CtBP2 (Schug *et al.*, 2006; Engel *et al.*, 2006). Auch der Nachweis von Glutamat-Rezeptoren an postsynaptischen Endigungen und Fasern (Kuriyama *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 2006) und von Glutamat-Transportern in Deiterszellen (Furness *et al.*, 2002) sprechen für einen afferenten Signalweg in ÄHZ.

Äußere Haarsinneszellen erreichen ihren ausgereiften Phänotyp schon vor Hörbeginn. Bereits an P8 kann der wichtigste K^+ -Strom durch KCNQ4-Kanäle nachgewiesen werden ($I_{K,n}$, (Marcotti & Kros, 1999), die Zelle ist wegen der Expression des Motorproteins Prestin bereits elektromotil (He *et al.*, 1994; Marcotti & Kros, 1999) und reagiert auf den efferenten Neurotransmitter Acetylcholin (Dulon & Lenoir, 1996). Weit vor P8 sind in ÄHZ bereits weitere Membranströme, wie der spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Strom (Michna *et al.*, 2003) und ein Na^+ -Strom vorhanden (Oliver *et al.*, 1997).

Der Hauptunterschied zwischen unreifen IHZ und ÄHZ besteht darin, dass in ÄHZ experimentell keine spontanen Aktionspotentiale nachzuweisen sind, was wahrscheinlich auf einem ungünstigen Verhältnis zwischen depolarisierenden Ca^{2+} -Strömen und K^+ -Strömen beruht. Die Tatsache aber, dass sowohl IHZ als auch ÄHZ in Mäusen ohne $Ca_v1.3$ (α_{1D})-Untereinheit mit zunehmendem Alter degenerieren (Platzer *et al.*, 2000) spricht für eine wichtige Rolle der Ca^{2+} -Ströme bei der Reifung beider HZ-Typen.

1.4. Spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle

Spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle (*voltage dependent calcium channels*, VDCC) werden anhand ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften in 5 Typen eingeteilt. T-Typ-Kanäle (Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v3.3) gehören zu den *low-voltage activated* (LVA) -Kanälen, die bereits bei schwachen Depolarisationen aktivieren. Sie spielen in den Schrittmacherzellen des Herzmuskels eine wichtige Rolle.

Die *high-voltage activated* (HVA) N- (Ca_v2.2) und P/Q-Typ-Kanäle (Ca_v2.1) nehmen bei der Neurotransmission eine tragende Funktion ein, R-Typ-Kanäle (Ca_v2.3) sind in neuronalen Zellen und Dendriten zu finden. L-Typ-Kanäle (*L-type calcium channel* LTCC) sind sehr weit verbreitet und kommen in der Skelettmuskulatur (Ca_v1.1), Herzmuskelzellen (Ca_v1.2), glatter Muskulatur, endokrinen Zellen, cochleären HZ (Ca_v1.3) und retinalen Bipolarzellen (Ca_v1.4) vor. L-Typ-Kanal-Ströme sind durch ihre Sensitivität gegenüber Dihydropyridinen, Phenylalkylaminen und Benzothiazepinen charakterisiert.

1.4.1. Der Aufbau spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle

Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle bestehen aus einer transmembranären $\alpha 1$ -Untereinheit sowie einer intrazellulären β -Untereinheit, einer membranständigen $\alpha 2\delta$ - und in vielen Fällen einer γ -Untereinheit (Abb. 2). Die $\alpha 1$ -Untereinheit bildet die Pore und trägt den Spannungssensor. Für die $\alpha 1$ -Untereinheit sind 10 unterschiedliche Gene bekannt ($\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v3.3$). Für die β -Untereinheit ($\text{Ca}_v\beta 1$ - $\text{Ca}_v\beta 4$) kodieren 4 verschiedene Gene, wobei zahlreiche Splice-Varianten bekannt sind.

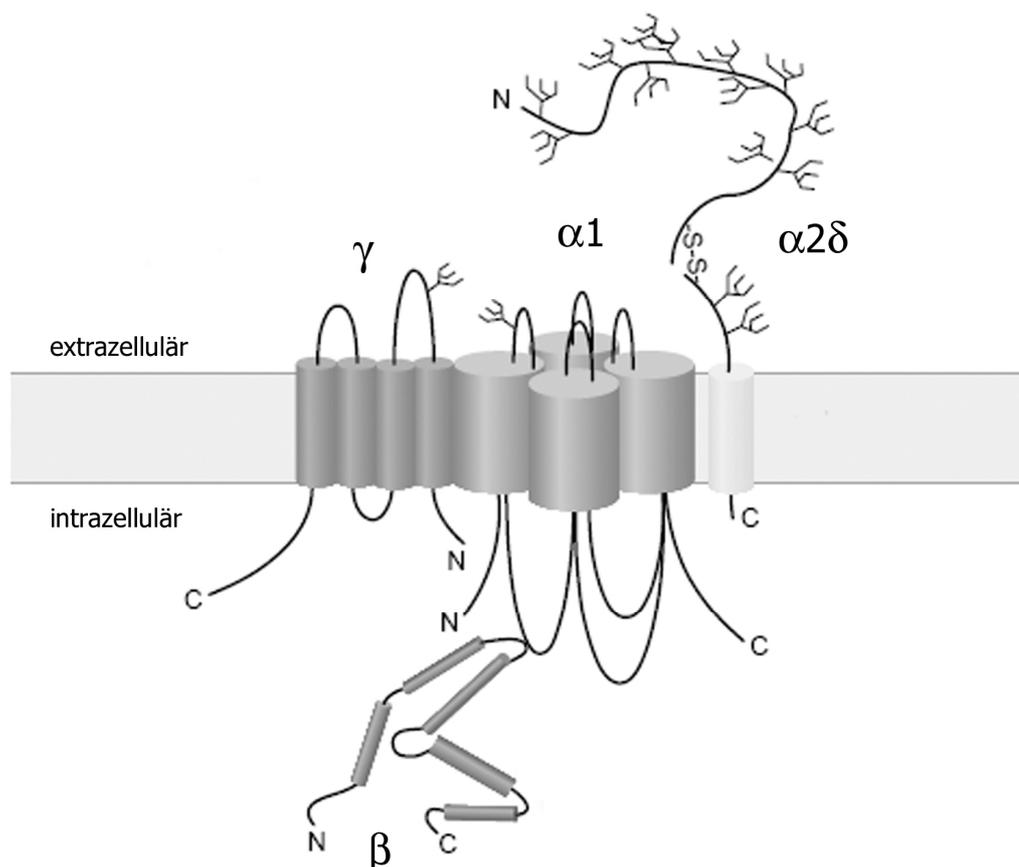


Abbildung 2: Modell eines spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals.

Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle bestehen aus der porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit und den zusätzlichen Untereinheiten $\alpha 2\delta$, β , (evtl. auch γ), die alle mit der $\alpha 1$ -Untereinheit verbunden sind. Während die $\alpha 2\delta$ - und γ -Untereinheit transmembranäre Bereiche besitzen, befindet sich die β -Untereinheit vollständig im Intrazellulärbereich. Modifiziert nach (Arikath & Campbell, 2003)

Die β -Untereinheit ist über komplementäre Interaktionsbereiche mit der $\alpha 1$ -Untereinheit verbunden (Bichet *et al.*, 2000) und übernimmt zwei Funktionen. Sie ermöglicht den Einbau des Ca^{2+} -Kanals in die Membran und moduliert darüber hinaus im funktionalen Kanal dessen elektrophysiologische Eigenschaften. So werden Kanaleigenschaften wie Öffnungsdauer, Aktivierung und Inaktivierung, aber auch die Anzahl der in die Membran integrierten funktionellen Kanäle und damit die Amplitude des Ca^{2+} -Kanal-Stroms von der β -Untereinheit beeinflusst.

Die Spezifität der Wechselwirkungen zwischen den $\alpha 1$ -Untereinheiten und $\text{Ca}_V\beta$ -Untereinheiten wurden in der Vergangenheit intensiv untersucht, wofür auch $\text{Ca}_V\beta$ - „*knock out*“ -Mausmodelle eingesetzt wurden. $\text{Ca}_V\beta 1$ - und $\text{Ca}_V\beta 2$ -Mäuse sind nicht lebensfähig, weil bei ihnen die Skelettmuskulatur ($\text{Ca}_V\beta 1^{-/-}$) bzw. das Myocard ($\text{Ca}_V\beta 2^{-/-}$) nicht funktionstüchtig ist. Die Konsequenzen der Gen-Deletion weisen auf die hohe Spezifität der Interaktion von $\text{Ca}_V 1.1$ mit $\text{Ca}_V\beta 1$ und von $\text{Ca}_V 1.2$ mit $\text{Ca}_V\beta 2_a$ hin.

Konstitutive Deletionen von $\text{Ca}_V\beta 3$ ($\text{Ca}_V\beta 3^{-/-}$) und $\text{Ca}_V\beta 4$ ($\text{Ca}_V\beta 4^{-/-}$) führen zu lebensfähigen Tieren.

Im Gehirn wird die $\beta 4$ -Untereinheit, bei dem eine bestimmte Mutation zum Phänotyp „*lethargic mouse*“ führt (Dung & Swigart, 1971;Dung & Swigart, 1972) während der postnatalen Phase stark heraufreguliert (Vance *et al.*, 1998). Das „*lethargic mouse*“ -Modell gilt als ein Modell für menschliche Absence-Epilepsie (Hosford & Wang, 1997).

$\text{Ca}_V\beta 3^{-/-}$ -Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen keinen veränderten Phänotyp, jedoch kleine Unterschiede der biophysikalischen Eigenschaften der Ca^{2+} -Ströme (Namkung *et al.*, 1998) sowie eine verminderte Expression der N-Typ-Kanäle in Zervikalganglien.

1.4.2. Besonderheiten der Ca^{2+} -Kanäle in Haarsinneszellen

Messungen an $\text{Ca}_V 1.3^{-/-}$ -Mäusen zeigten, dass es sich bei spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen in HZ um $\text{Ca}_V 1.3$ -Kanäle handelt. In IHZ von Tieren dieses

Genotyps ist die Amplitude des Ca^{2+} -Kanal-Stroms auf weniger als 8 % des Wildtyp (WT) -Stroms reduziert (Platzer *et al.*, 2000), was darauf hinweist, dass es sich in diesem Zelltyp beim Großteil der Ca^{2+} -Kanäle um $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ-Kanäle handelt.

Auch die Degeneration äußerer HZ in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen ab dem postnatalen Tag 14 (P14) spricht für eine Bedeutung dieser Ca^{2+} -Kanäle für die Reifung und Funktion von ÄHZ.

Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit gibt einen Überblick über die $\text{Ca}_v1.3$ -Ströme in neonatalen ÄHZ (Michna *et al.*, 2003), während im zweiten Teil die Ca^{2+} -Kanal-Ströme ausgereifter ÄHZ der Maus und Ratte beschrieben werden (Knirsch *et al.*, 2007).

Als generelle Besonderheit der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in HZ gilt ihre schwache spannungsabhängige (*voltage dependent inactivation*, VDI) und Ca^{2+} -abhängige (*calcium dependent inactivation*, CDI) Inaktivierung, die möglicherweise auf eine besondere Kombination der Untereinheiten zurückzuführen ist.

In heterologen Expressionssystemen konnte eine Verstärkung und Beschleunigung der VDI und CDI durch Injektion der Untereinheiten $\text{Ca}_v2.1$ oder $\text{Ca}_v1.2$ zusammen mit $\text{Ca}_v\beta1_b$, $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$ gezeigt werden. Die Co-Expression mit $\text{Ca}_v\beta2_a$ bewirkte dagegen eine Reduzierung und Verlangsamung der Inaktivierung (Cens *et al.*, 1999b). Für HZ fehlen bislang Untersuchungen zum Vorhandensein bestimmter β -Untereinheiten.

Da Ca^{2+} -Ströme in HZ praktisch vollständig durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle fließen (Platzer *et al.*, 2000; Michna *et al.*, 2003), bieten sie ein optimales System, die Bedeutung der β -Untereinheiten für die Modulation dieses Kanals zu untersuchen.

Obwohl der Ca^{2+} -Kanal beider HZ-Typen durch dieselbe $\alpha1$ -Untereinheit gebildet wird, bestehen kleine Unterschiede bezüglich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften. So weist der Ba^{2+} -Strom in IHZ eine etwas stärkere Inaktivierung (VDI) auf als in ÄHZ, der Ca^{2+} -Strom zeigt jedoch in IHZ eine schwächere CDI (Michna *et al.*, 2003). Auch für die voneinander abweichenden Werte für $V_{1/2}$ und V_{max} des Ca^{2+} -Kanal-Stroms beider Haarzelltypen fehlt bislang eine Erklärung.

Im Gehirn (Meerschweinchen, Kaninchen) wurden neuronale L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$) in Anordnung mit allen 4 bekannten β -Untereinheiten identifiziert, wobei die jeweils bevorzugte Kombination von der jeweiligen Gehirnregion abhängig ist (Pichler *et al.*, 1997). Im Laufe der prä- und postnatalen Entwicklung des Ratten-Gehirns verändert sich die Zusammensetzung des Ca^{2+} -Kanals. Die Kombination der $\alpha1$ -Untereinheiten mit der entsprechenden β -Untereinheit und damit die Expression funktioneller Kanäle variiert entwicklungsabhängig (Tanaka *et al.*, 1995; Vance *et al.*, 1998; McEnery *et al.*, 1998).

Denkbar sind daher unterschiedliche Kombinationen der $\alpha1$ - und β -Untereinheit auch in den beiden HZ-Typen des Cortischen Organs. Möglicherweise besteht hier ebenfalls eine entwicklungsabhängige Regulation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Ca^{2+} -Kanal-Ströme in HZ der $\text{Ca}_v\beta4^{-/-}$ - („*lethargic*“) und $\text{Ca}_v\beta3^{-/-}$ -Mäuse analysiert und die Auswirkung dieser Mutationen auf funktionelle Ca^{2+} -Kanäle untersucht. Obwohl beide Maus-Modelle keine eingeschränkte Hörfunktion zeigten, waren zahlreiche elektrophysiologische Parameter der Ca^{2+} -Kanäle in HZ signifikant verändert.

2 Material und Methoden

2.1. Präparation

Für die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen, zur Gewinnung von Haarsinneszellen und Herz- und Hirngewebe für die RT-PCR und zur Anfertigung von Cryoschnitten für die Immunhistochemie wurden Mäuse (NMRI und SvJ129) und Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld, Germany) zwischen dem postnatalen Tag 1 (P1) und postnatalen Tag 32 (P32) in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Tierschutzgesetzes zunächst dekapitiert. Tiere >P8 wurden vor dem Dekapitieren mit CO₂ anästhesiert. Im Anschluss daran wurden die Cochleae, bzw. Hirngewebe entnommen.

2.2. Elektrophysiologische Messungen von Ca²⁺-Kanal-Strömen in Haarsinneszellen

Das Freilegen des Cortischen Organs erfolgte in steriler HEPES-Hanks-Lösung unter dem Stereomikroskop. Anschließend wurde es mit Hilfe feiner Pinzetten in ein apikales, ein mediales und ein basales Stück geteilt und die entsprechenden Abschnitte mit Hilfe von Cell Tak (Beckton Dickinson, Bedford, USA) auf Deckgläschen in einer mit Extrazellulärlösung gefüllten Messkammer geklebt. Die Messkammer wurde unter optischer Kontrolle mittels eines aufrechten ZEISS Axioskop Mikroskops differentiellem Interferenz-Kontrast, das mit einem 40-fachen Wasserimmersions-Objektiv (num. Ap. 0.4) ausgestattet war, permanent mit frischer Extrazellulärlösung durchspült.

Für Messungen der Ca²⁺-Kanal-Ströme wurden Extrazellulärlösungen mit Bariumionen (Ba²⁺) anstelle von Calciumionen (Ca²⁺) als Ladungsträger verwendet, da diese spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle leichter passieren als Calcium und somit größere Stromamplituden erzeugen. Zudem blockieren sie einige K⁺-Kanäle, die mit Cs⁺ in der Pipettenlösung oder extrazellulären

organischen K⁺-Kanal-Blockern nicht gehemmt werden. Auch werden durch den Einstrom von Ba²⁺-Ionen keine intrazellulären Signalkaskaden ausgelöst.

Die Messungen der Ca²⁺-Kanal-Ströme in unterschiedlichen Altersstadien der beiden Typen von Haarsinneszellen erfolgten unter Verwendung unterschiedlicher Extrazellulärlösungen. So wurden Ca²⁺-Kanal-Ströme in neonatalen ÄHZ (P0-P8) und IHZ (P-1-P12) stets in einer TrisCl-Lösung folgender Zusammensetzung durchgeführt (TrisCl-Lösung):

160 mM tris-(hydroxymethylamino)-methan-HCl, 10 mM BaCl₂, 5.6 mM Glucose, 1 mM MgCl₂, pH 7.4, 320 mosmol*kg⁻¹. Tris-Ionen wurden hier anstelle von Na⁺- und K⁺-Ionen verwendet, um sämtliche Ströme durch spannungssensitive Na⁺- und K⁺-Kanäle (Oliver *et al.*, 1997) zu blockieren. Teilweise erfolgte die Aufzeichnung der Ca²⁺-Kanal-Ströme in physiologischer Lösung (B01) folgender Zusammensetzung: 10 mM Hepes-Hanks-Lösung, 140 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.9 mM MgCl₂, 1.3 mM CaCl₂, 0.7 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 320 mosmol*kg⁻¹ mit kontinuierlicher Perfusion von TrisCl-Lösung.

Messungen an ÄHZ von Mäusen >P12 erwiesen sich als äußerst schwierig, da die Haarsinneszellen in Extrazellulärlösungen mit hoher Cl⁻-Konzentration, wie der TrisCl-Lösung (155 mM Cl_e⁻), anschwellen, was die Etablierung von *seals* im GΩ-Bereich erschwerte und die Dauer der Ableitungen stark verkürzte. Das Anschwellen wurde vermutlich durch Aktivierung bestimmter Cl⁻-Kanäle verursacht (Siegel & Zeddies, 2001) und konnte dadurch abgemildert oder verhindert werden, indem der TrisCl-Lösung entweder 10 µM in DMSO gelöstes Tamoxifen zugefügt oder alternativ bis auf 15 mM sämtliches Cl⁻ der TrisCl-Lösung durch 160 mM Laktobionat ersetzt (Tris-Laktobionat-Lösung).

Für die Messungen des Barium-Stroms (I_{Ba}) in Ratten-HZ >P12 und IHZ der Maus (P19-P22) wurde eine Badlösung mit mittlerem extrazellulären Cl⁻-Gehalt (95 oder 100 mM) folgender Zusammensetzung verwendet (TEA-Laktobionat-Lösung): 70 mM Na-Lactobionat, 43 mM NaCl, 35 mM Tetraethylammoniumchlorid (TEA), 15 mM 4-Aminopyridin (4-AP), 10 mM BaCl₂, 5.6 mM Glukose, 1 mM MgCl₂, pH 7.4, 320 mosmol*kg⁻¹.

Mit Hilfe so genannter Säuberungs-Pipetten aus Borosilikat-Glas (Öffnungsdurchmesser ca. 1-10 μm), wurden sowohl störende Hensen- und Deiterszellen als auch die Tektorialmembran entfernt und dadurch die HZ freigelegt. Alle *patch clamp* -Experimente wurden bei Raumtemperatur (20-22 °C) im Ganzzell-Modus (*whole cell*) unter Verwendung eines AXOPATCH 200B (Axon Instruments, Union City, USA) Patch-Clamp-Verstärkers durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der Software *Pulse ++1.7* (Ulrich Rexhausen, Physiologisches Institut II, Universität Tübingen, und Klaus Bauer, Max Planck Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg) und eines ITC 16 Interface (Instrutech, Greatneck, USA) aufgezeichnet und auf einem Apple Macintosh Computer gespeichert. Die Stromspuren wurden mit einer Frequenz von 50 kHz (langsame Protokolle: 5 kHz) abgetastet und mit 10 kHz (langsame Protokolle: 1.3 kHz) gefiltert. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der Software *igor software package* (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) auf einem Apple Macintosh Computer und einem IBM-kompatiblen PC ausgeführt.

Patch clamp -Pipetten wurden mit Hilfe eines Laser Pullers (Sutter Instruments, Novato, USA) aus Quartz- oder Borosilikatglas zu Öffnungsdurchmessern von ca. 1 μm und Pipettenwiderständen von 4 - 6 $\text{M}\Omega$ ausgezogen. Borosilikat-Pipetten wurden zur Verminderung des Rauschens anschließend knapp hinter der Öffnung mit Sylgard 184 (Dow Corning Corporation, MI, USA) überzogen.

Die bei sämtlichen elektrophysiologischen Messungen verwendete Pipettenlösung setzte sich wie folgt zusammen: 120 mM Cs^+ -Glukonat, 20 mM CsCl, 10 mM Na^+ Phosphokreatin, 5 mM Hepes, 5 mM EGTA, 4 mM MgCl_2 , 4 mM Na_2ATP , 0.1 mM CaCl_2 , 0.3 mM GTP, pH 7.35, 305 mosmol* kg^{-1} . Sofern es die Ableitung zuließ, wurden die Serienwiderstände (R_s) während der Messung bis zu 80 % korrigiert. An den Originalströmen wurde anschließend eine Leckstromkorrektur, an den Spannungspotentialen eine *Liquid Junction Potential* (LJP)-Korrektur (Neher, 1992) um -20 mV (TrisCl Lösung), -14 mV (Tris-Laktobionat Lösung), bzw. +2.3 mV (TEA-Laktobionat Lösung) vorgenommen. Im Falle der lokalen Perfusion mit TrisCl-Lösung in physiologischen Lösung (B01) betrug das LJP -8 mV.

Ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV bzw. -70 mV wurde die Zelle nach einem hyperpolarisierenden Testpuls auf unterschiedliche Spannungswerte geklemmt, die je nach Protokoll zwischen 8 ms und 400 ms andauerten und die Zelle in 5 mV oder 10 mV-Schritten bis zu einem Membranpotential von +30 mV , bzw. +40 mV depolarisierten.

Aufgrund des in ÄHZ beobachteten *run-up*, einer starken Zunahme der I_{Ba} -Amplitude im Verlauf der Ableitung, wurden ausschließlich die Messungen in die Auswertung des Maximalstroms (I_{max}) einbezogen, die nach Vollendung der 6. Minute nach dem Übergang in den *whole cell*-Modus aufgezeichnet wurden.

Für das Erstellen von Strom-Spannungs-Kurven wurde der I_{Ba} der letzten Millisekunde des jeweiligen 8 ms dauernden Depolarisierungsschrittes ausgewertet. Strom-Spannungs-Kurven wurden nach folgenden Gleichungen gefittet:

$$(1) \quad I = G_{max} (V - V_{rev}) / (1 + \exp \{ (V_{1/2} - V) / k \})$$

(Neonatale ÄHZ der Maus (Michna *et al.*, 2003))

Hierbei ist I der I_{Ba} zum Zeitpunkt der Bestimmung der Strom-Spannungs-Kurve, V das Membranpotential, V_{rev} das extrapolierte Umkehrpotential, G_{max} die maximale Leitfähigkeit der Zelle, $V_{1/2}$ die Spannung, bei der die Hälfte der Kanäle aktiviert ist und k der Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde eine alternative Beschreibung herangezogen:

$$(2) \quad I = P_{max} z F v ([Ba]_0 / \exp(v) - 1) - [Ba]_i / \exp(-v) - 1) (1 / (1 + \exp((V - V_{1/2}) / k)))^2$$

Hierbei ist I der I_{Ba} zum Zeitpunkt der Strom-Spannungs-Kurve und P_{max} die maximale Permeabilität. Für $v = zFV / (RT)$ gilt: $z=2$; F ist die Faraday-Konstante, R die Gaskonstante und T die Temperatur. V bezeichnet das Membranpotential,

$[Ba]_i$ und $[Ba]_o$ geben jeweils die intra- und extrazelluläre Ba^{2+} -Konzentration an, $V_{1/2}$ entspricht dem Membranpotential der halbmaximalen Aktivierung und k gibt den Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion an. Diesem Ausdruck (2) liegt die „Goldman-Hodgkin-Katz“-Gleichung zugrunde, die spannungsabhängige Änderungen der Membranpermeabilität für beliebige, also auch sehr stark unterschiedliche Ionen-Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran beschreibt (Hille, 1991). Bei Verwendung des Exponenten 2 für die Boltzmann-Funktion hatte der Fit an den Daten die beste Güte, was einem Hodgkin-Huxley-Modell mit zwei „gating-particles“ (Zidanic & Fuchs, 1995) entspricht.

Die Kinetik der Aktivierung von I_{Ba} wurde mit folgender Gleichung angepasst:

$$(3) \quad I(t) = I_{ss} m(t)^2$$

wobei

$$(4) \quad m(t) = m_{\infty} + (m_0 - m_{\infty}) \exp(-t/\tau)$$

Hierbei ist τ die Zeitkonstante der Aktivierung und m_0 und m_{∞} bezeichnen die Wahrscheinlichkeit, dass ein „gating-particle“ des Hodgkin-Huxley-Modells sich zum Zeitpunkt $t = 0$ bzw. zum Zeitpunkt $t = \infty$ im Zustand „offen“ befindet.

Der prozentuale Grad der Inaktivierung des maximalen Einstroms nach einem 300 ms andauernden Depolarisierungspulses wurde folgendermaßen errechnet:

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

wobei I_{peak} das Strommaximum der Maximalstromspur zum Zeitpunkt $t = t_{\text{peak}}$ und I_{test} der Strom zum Zeitpunkt $t = t_{\text{peak}} + 300$ ms ist.

Für die Dosis-Wirkungs-Kurve für Nifedipin wurde alle 10 s durch wiederholte Depolarisationen auf 0 mV der maximale Bariumstrom ausgelöst. Nachdem der *run up* abgeschlossen war erfolgte die 90 s andauernde Applikation der jeweiligen Nifedipin-Konzentration (gelöst in DMSO) in die TrisCl-Lösung. Durch die permanente Perfusion mit frischer TrisCl-Lösung wurde der Blocker nach Beendigung der Applikation wieder ausgespült. Der Prozentsatz der I_{Ba} -Hemmung wurde für jede Konzentration an 5-10 ÄHZ bestimmt, gemittelt und ein Fit der kleinsten Quadrate der Daten mit der Hill-Gleichung durchgeführt:

$$(6) \quad I_{Ba}\text{-Hemmung (\%)} = I_{\max,Block} / (1 + (IC_{50}/[nif])^{n_H})$$

Hierbei ist $I_{\max,Block}$ der maximale Prozentsatz der I_{Ba} -Hemmung und IC_{50} gibt die Nifedipin-Konzentration der halbmaximalen Blockierung an. $[nif]$ bezeichnet die applizierte Nifedipin-Konzentration und n_H den Hill-Koeffizienten.

Die statistischen Mittelwertanalysen erfolgten unter Anwendung des Student's two tailed t -test. Für den Vergleich mehrerer Datensätze miteinander wurde eine *one-way* ANOVA (*JMP 6.0 software*, SAS Institute, USA) durchgeführt.

2.3. Gewebsspezifische RT-PCR

cDNA Synthese

mRNA von Herz, Hirn und Cortischem Organ wurde von Mäusen und Ratten >P18 gewonnen. Hierfür wurde das jeweilige Organ herauspräpariert und jeweils 6 Cortische Organe bzw. $\sim 20 \mu\text{g}$ von Ventrikel oder Großhirn unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung bis zur Weiterverwendung erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff. Für die cDNA-Synthese wurden die tiefgefrorenen Gewebe zunächst mittels Ultraschall in $150 \mu\text{l}$ Lysispuffer homogenisiert. Nach Zentrifugation (2 min, $10800 \times g$) wurde die mRNA unter Verwendung von Dynabeads (Invitrogen, Karlsruhe) und dem Protokoll des Herstellers folgend isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte unmittelbar nach der

mRNA Isolierung auf Eis mit Hilfe eines RT-PCR Kits von Invitrogen (Karlsruhe). Hierfür wurde 1 µl oligo dT Primer_(20mer) (50 µM) mit je 2 µl mRNA für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis pro Ansatz 4 µl *reverse transcription buffer* (5x), 2 µl DTT (0.1 M), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 9 µl H₂O und 1 µl *superscript reverse transcriptase III* (200 U/µl) zugefügt. Nach Inkubationsschritten von 60 min bei 42 °C und 10 min bei 72 °C wurde die cDNA bei 20 °C gelagert.

2.4. Zellspezifische RT-PCR

cDNA Synthese

Für HZ-spezifische RT-PCR wurde die apikale Windung des Cortischen Organs (P4-P18) mit Cell-Tak auf einem Deckgläschen fixiert und in die Badkammer des Mikroskops überführt. Nachdem Hensen- und Claudius-Zellen mit Hilfe von *cleaning* Pipetten entfernt worden waren, konnten je Pipette zwischen 10 und 30 Haarsinneszellen geerntet werden. Borosilikat-Rohlinge für das Einsammeln des Zellmaterials wurden vorher für 3h bei 200 °C sterilisiert und anschließend zu Öffnungsdurchmessern von 10-15 µm ausgezogen. Durch Abbrechen der Pipettenspitze und mit Überdruck wurden die isolierten Zellen in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß überführt, welches sofort in flüssigen Stickstoff überführt wurde.

Für die cDNA-Synthese wurde das gewonnene Material (10 µl) mit 1 µl dNTP (10 mM) und 1 µl oligo dT_(20mer) Primer (50 µM) versehen und 5 min bei 65 °C inkubiert. Ein RT-Mix, bestehend aus 4 µl *reverse transcription buffer* (5 x), 2 µl DTT (0.1 M), 1 µl RNase OUT (40 U/µl) und 1 µl *reverse transcriptase superscript III* (200 U/µl; Invitrogen) wurde zugegeben und der Ansatz 45 min bei 50 °C inkubiert. Durch Erhitzen der Proben für 15 min bei 70 °C wurde die Enzymreaktion gestoppt, bevor die cDNA bei -70°C bis zur PCR Analyse eingefroren wurde. Für Negativkontrollen wurde abgesaugtes Probenmaterial behandelt wie beschrieben, jedoch keine Reverse Transkriptase (*reverse transcriptase superscript III*) zugegeben.

Glycogenfällung

Um die cDNA vor der Verwendung in der PCR von störenden Chemikalien- und Enzymresten aus der cDNA Synthese zu reinigen, wurde eine Glycogenfällung (Liss, 2002) durchgeführt. Zu je 10 µl cDNA wurden 2 µl Glycogen (0.5 µg/µl (Ambion, Tx, USA), 2.5 µl polyC RNA (100 ng/µl; GE Healthcare, München), 2.5 µl polydC DNA (100 ng/µl; GE Healthcare, München), 2 µl Natriumacetat (2 M, pH 4.0), 1 µl ddH₂O und 70 µl 100 % Ethanol (Sigma, München) zugegeben und die Proben über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (60 min, 4 °C, 13000 xg) und Abgießen des Überstandes schlossen sich ein Waschschrift mit 100 µl 75 % Ethanol und ein erneuter Zentrifugationsschritt (15 min, 4 °C, 13000 xg) an. Nach nochmaligem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in einem Heizblock (45 °C) getrocknet und so überschüssiger Ethanol verdampft. Anschließend wurde die cDNA in 10 µl sterilem Wasser aufgenommen und durch erneutes Erhitzen in Lösung gebracht (60 min, 45°C).

Verschachtelte (*nested*) PCR

Die cDNA Präparationen wurden zunächst in Test-PCRs auf Güte getestet. Hierfür wurden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase -spezifische Primer (GAPDH-Primer) eingesetzt.

Für das Amplifizieren spezifischer Fragmente der Ca_vβ- und Ca_vα- Untereinheit auf Basis relativ geringer Mengen cDNA aus HZ-spezifischer wurde die Methode der verschachtelten (*nested*) PCR angewendet. Für die PCR-Analysen wurden je nach Zellzahl 1 - 6 µl des RT-PCR-Produktes in einem Reaktionsansatz von insgesamt 25 µl eingesetzt, der je 1-2 µl des *forward* Primer (10 pmol/µl) und des *reverse* Primer (10 pmol/µl) und 1 puReTaq Ready-To-Go PCR bead (GE Healthcare, München) bzw. zur Hälfte des Gesamtvolumens MasterMix-S (Peqlab, Erlangen) enthielt. Je nach Volumen der eingesetzten cDNA wurde der Reaktionsansatz mit sterilem dH₂O auf 25 µl aufgefüllt.

Die 35 Zyklen (PCR-Profil: Denaturierung: 30 s, 94 °C; Primerbindung: 30 s 58-65 °C; Elongation: 40 s 72 °C) folgten einem initialen Denaturierungsschritt (3 min 94 °C) und wurden abschließend mit einem finalen

Elongationsschritt (10 min 72 °C) beendet. Um Polymerasereste, Nucleotide und unverbrauchte Primer zu eliminieren, wurde das Produkt nach Beendigung der ersten PCR über Säulen (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) dem Protokoll des Herstellers folgend aufgereinigt und anschließend 5 µl in einer zweiten (*nested*) PCR mit einem weiteren Primerpaar versetzt, das an Abschnitte innerhalb des ersten Fragmentes banden. Im Anschluss an die PCR wurden zum Nachweis der Fragmente 20 µl der PCR-Produkte mit Ladepuffer (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und mittels Gelelektrophorese (Agarosegele, 1.5% in 1x TAE) aufgetrennt. Färbung der DNA erfolgte über Ethidiumbromid.

Sequenzen der verwendeten Primer (5' -> 3'):

Nachweis von Ca_v1.3

| | |
|----------------|-----------------------------|
| α1D_for | CTCGGTTGTGAAGATTCTGAG |
| α1D_rev | GATGACGAAGCCACGAAGAT |
| α1D_for_nested | GAGGGTCTTGCGGCCTCTCAGAGC |
| α1D_rev_nested | ATCTCCACAAGGTAGTTGTAGACAGGA |

Nachweis von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)

| | |
|-----------------|------------------------|
| Gapd_for | TCTACTGGCGTCTTCACCA |
| Gapd_rev | AGGAGACAACCTGGTCCTCAGT |
| Gapd_for_nested | GAAGGCTGGGGCTCACCTGA |
| Gapd_rev_nested | ATGTTCTGGGCTGCCCCACG |

Nachweis von Ca_vβ1

| | |
|---------------|----------------------------|
| β1_for | GCCCAAGGACTTCCTACACATCAAGG |
| β1_rev | GGAACGCGTGTTGGAGCGCTCAATG |
| β1_for_nested | CTGGTGAAGGAAGGCTGCGAG |
| β1_rev_nested | GTGTTTGCTGGGGTTGTTGAGGAC |

Nachweis von $\text{Ca}_v\beta 2$

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| $\beta 2_{\text{for}}$ | CTTGCCGACTATCTGGAGGCATACTG |
| $\beta 2_{\text{rev}}$ | CAGCTACCCAAACAGCTTTTGAATTGTTTCAGG |
| $\beta 2_{\text{for_nested}}$ | CACCCTCCCAGCGGTAACCC |
| $\beta 2_{\text{rev_nested}}$ | GCTATTGGAGCAACAGCAATACAAATAGAC |

Nachweis von $\text{Ca}_v\beta 3$

| | |
|--------------------------------|----------------------------|
| $\beta 3_{\text{for}}$ | CTGTGGCATTGCTGTGAGGACCAATG |
| $\beta 3_{\text{rev}}$ | CAAAGACGATGATGGGAGCCAGTGAG |
| $\beta 3_{\text{for_nested}}$ | TGGGGTTCTGGATGAGGAGTGC |
| $\beta 3_{\text{rev_nested}}$ | TGCTGGGTGGTTGATGGTGTCAG |

Nachweis von $\text{Ca}_v\beta 4$

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| $\beta 4_{\text{for}}$ | GTGCCCTGGACGAAGATGTGCC |
| $\beta 4_{\text{rev}}$ | GTTGCTGTGTCTCATTCGCTGACTCTG |
| $\beta 4_{\text{for_nested}}$ | GACTGGTAAAAGAGGGCTGTGAGATTG |
| $\beta 4_{\text{rev_nested}}$ | GATTGCTGTGGGATATGGTGAGAGG |

2.5. Genotypisierung der $\text{Ca}_v\beta 4$ -Mäuse

Nachweis von $\text{Ca}_v\beta 4\text{KO}$ („*knock out*“)

| | |
|--|---------------------------|
| $\text{Ca}_v\beta 4\text{KO}_{\text{for}}$ | AAATGGTATCAGGAACATTCCGAGC |
| $\text{Ca}_v\beta 4\text{KO}_{\text{rev}}$ | TTTCCAAACCAGTGAAAGCGTTAGC |

Für die Isolierung genomischer DNA der heterozygot züchtenden „*lethargic*“ ($\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$) -Mäuse wurden Schwanzspitzenbiopsien vorgenommen. Dem Protokoll von *NucleoSpin* Tissue (Takara Bio, Japan) folgend wurde das Gewebe in 180 μl Lysis-Puffer und 25 μl Proteinase K über Nacht bei 56°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 200 μl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 210 μl Ethanol (99.9%) wurde die genomische DNA in der Membran der *NucleoSpin* Säulen gebunden, mit Hilfe von

Waschpuffern gewaschen und anschließend eluiert. Die Konzentration der genomischen DNA wurde mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt, bevor sie für die PCR (PCR-Profil: initiale Denaturierung: 5 min 94 °C, Denaturierung: 45 s 94 °C, Primerbindung: 30 s 60 °C, Elongation: 30 s 72 °C finale Elongation: 5 min 72 °C; 35 Zyklen) eingesetzt wurde. Mit spezifischen Primern für die „*knock out*“-Variante (Ca ν β 4KO_for und Ca ν β 4KO_rev) erhielt man für die Ca ν β 4^{-/-}-Mäuse aufgrund der Insertion von 4 Basen (TGGG) Fragmente von 83 bp und für Ca ν β 4^{+/+}-Mäuse Fragmente von 79 bp Länge. In genomischer DNA von heterozygoten (Ca ν β 4^{+/-}-Mäusen) waren beide Fragmente vorhanden.

Die PCR-Produkte wurden in einem 9 % Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA anschließend mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle spielen bei der Freisetzung von Neurotransmittern in Haarsinneszellen (HZ) eine wichtige Rolle. Die durch mechanische Stimulation hervorgerufene Depolarisation der HZ führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} , was die Exozytose von Neurotransmittern in inneren Haarsinneszellen (IHZ) und vermutlich auch in äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) auslöst.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung der Ca^{2+} -Kanäle in neonatalen und ausgereiften ÄHZ präsentiert.

3.1. $\text{Ca}_v1.3\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle in neonatalen (P1-P8) äußeren Haarsinneszellen der Maus¹

Die Degeneration der ÄHZ in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ Mäusen (Platzer *et al.*, 2000; Glueckert *et al.*, 2003) legte die Vermutung nahe, dass dieser Kanal auch in diesem HZ-Typ existiert und für die Differenzierung und Reifung der HZ von Bedeutung ist. Daher untersuchten wir spannungssensitive „whole-cell“- Ca^{2+} -Ströme zunächst in neonatalen (P1-P8). Um die Beteiligung des $\text{Ca}_v1.3$ in ÄHZ beurteilen zu können, wurde HZ-spezifische RT-PCR und elektrophysiologische Ableitungen an ÄHZ von $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen durchgeführt.

3.1.1. Biophysikalische Eigenschaften des Ca^{2+} -Kanals in neonatalen ÄHZ

Mit Tris^+ -Ionen in der Extrazellulärlösung (Badlösung) und Cs^+ Ionen in der Intrazellulärlösung (Pipettenlösung), Bedingungen also, unter denen der Großteil der K^+ - und Na^+ -Kanalströme blockiert war, riefen Depolarisationen Ca^{2+} -Ströme (I_{Ca}) in ÄHZ hervor. Mit Calcium als Ladungsträger wiesen diese Ströme eine

¹ Daten von Martina Knirsch und Marcus Michna aus (Michna *et al.*, 2003)

geringe (in 1.3 mM Ca^{2+}) bis leichte (in 10 mM Ca^{2+}) Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung (CDI) auf. Die Ströme mit Barium als Ladungsträger (I_{Ba}) inaktivierten nicht, d.h. es lag keine spannungsabhängige Inaktivierung (VDI) vor. Ca^{2+} -Kanal-Ströme mit 1.3 mM Ca^{2+} als Ladungsträger hatten kleine Maximalamplituden, die in 10 mM Ca^{2+} anstiegen und in 10 mM Ba^{2+} noch weiter an Größe zunahmen. Das Verhältnis der Stromdichten (Quotient aus Maximalamplitude und Kapazität der Zelle) in Abhängigkeit von den jeweiligen Ladungsträgern (1.3 mM Ca^{2+} : 10 mM Ca^{2+} : 10 mM Ba^{2+}) zueinander war 1 : 1.8 : 3.3. Das Membranpotential, an dem der maximale Einwärtsstrom (V_{max}) auftrat, wurde ebenfalls durch den Ladungsträger beeinflusst. So wurde V_{max} durch Änderung der extrazellulären Konzentration von 1.3 mM Ca^{2+} auf 10 mM Ca^{2+} zu positiveren Werten hin verschoben, was die Folge eines Abschirmungseffekts der negativen Oberflächenladungen ist (Zhou & Jones, 1995). Die Strom-Spannungs-Kurve des I_{Ba} hingegen war, verglichen mit Strom-Spannungs-Kurven in äquimolarem Ca^{2+} , um 5 mV zu negativen Potentialen hin verschoben. Aufgrund der größeren Ströme bei Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger im Vergleich zu Ca^{2+} und der Blockierung störender K^{+} -Ströme durch Ba^{2+} (siehe 2.2.) verwendeten wir für die Untersuchung der Ca^{2+} -Kanal-Ströme im Folgenden Ba^{2+} -Ionen in der Extrazellulärlösung.

Die Stromdichten des I_{Ba} veränderten sich mit dem Alter (Abb. 1E). So wies die durchschnittliche Stromdichte an P2 mit 35.6 pA/pF ein Maximum auf, verblieb bis P7 auf einem Niveau >19 pA/pF und sank an P8 auf 6.7 pA/pF ab. Dies steht in klarem Gegensatz zur altersabhängigen Regulation der Ca^{2+} Stromdichte in IHZ, die am postnatalen Tag 6 ein Maximum erreicht und an P2 nur die Hälfte des Maximalstroms aufweist (Beutner & Moser, 2001).

Abb. 3A zeigt schnell aktivierende I_{Ba} , die durch 8 ms andauernde Depolarisationen hervorgerufen wurden. Die Aktivierungszeitkonstanten waren hierbei mit denen von inneren Haarsinneszellen vergleichbar ($\tau_{\text{act}} \sim 0.3$ ms bei V_{max} ; (Platzer *et al.*, 2000). In Abb. 3B ist eine Strom-Spannungs-Kurve (IV) von I_{Ba} gezeigt, wobei die während der letzten Millisekunde des Depolarisierungsschrittes gemittelten I_{Ba} -Werte gegen die jeweils angelegte

Spannung aufgetragen sind. Die Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 3B) wiesen die für Ströme spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle typische Glockenform auf. Der I_{Ba} aktivierte hier ab einer Depolarisation vom Haltepotential (-80 mV) auf -40 mV und erreichte seine maximale Amplitude bei -5 mV. Das Anfitzen der IV-Kurve mit einer Boltzmann-Funktion (Gleichung (1), siehe Methoden) ergab $V_{1/2} = -21.3$ mV, $k = 6.9$ mV.

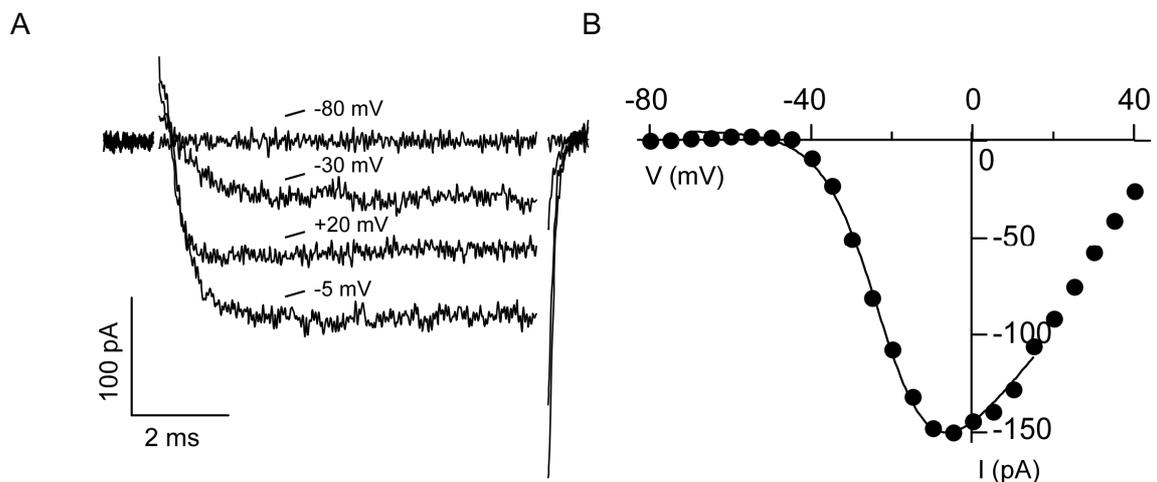


Abbildung 3: Schnell aktivierender und deaktivierender I_{Ba} in neonatalen ÄHZ der Maus. **A**, ausgewählte Ba^{2+} Stromspuren einer neonatalen ÄHZ (P2), hervorgerufen durch Depolarisationsschritte auf die angegebenen Potentiale ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV. **B**, die zugehörige Strom-Spannungs-Kurve wurde jeweils durch Mittelung des I_{Ba} während der letzten Millisekunden des Spannungspulses ermittelt und mit einer Boltzmann-Funktion 1. Ordnung angefitzt

Für den Vergleich innerer (Platzer *et al.*, 2000) und äußerer HZ wurden Parameter wie der Maximalstrom I_{max} , die Kapazität der Zelle C , die maximale Stromdichte I_{BaD} , das Potential des Maximalstroms V_{max} , das Potential der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ und die Steigung der Boltzmann-Funktion k ermittelt (Tabelle 1).

Ergebnisse

Tabelle 1: Biophysikalische Eigenschaften des I_{Ba} in neonatalen äußeren (P1-P7) und inneren (P2-P9) HZ der Maus. P, postnataler Tag. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.D. von Maximalstrom (I_{max}), Membrankapazität (C), maximaler Stromdichte (I_{BaD}), Membranpotential des Maximalstroms (V_{max}), halbmaximaler Aktivierung ($V_{1/2}$) und des Steigungsfaktors (k) für ÄHZ und IHZ. $V_{1/2}$ und k wurden durch Anfitzen der Daten mit einer Boltzmann Funktion 1. Ordnung ermittelt.

*statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.05$). Werte für ÄHZ aus (Michna *et al.*, 2003); Werte für IHZ z.T. aus (Platzer *et al.*, 2000).

| HZ-Typ | I_{max} (pA) | C (pF) | I_{BaD} (pA*pF ⁻¹) | V_{max} (mV) | $V_{1/2}$ (mV) | k (mV) |
|--------|----------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------|
| ÄHZ | 112.4±48.7* n=105 | 4.7±0.8* n=105 | 24.4±10.8* n=105 | -1.9±6.9 n=34 | - 15.0±7.1* n=34 | 8.2±1.1* n=34 |
| IHZ | 421±206 n=5 | 6.5±0.4 n=5 | 64.7±29.4 n=5 | -5.0±4.1 n=13 | -19.6±4.6 n=13 | 7.6±0.7 n=13 |

Alle hier verglichenen Daten wurden unter Verwendung der gleichen Lösungszusammensetzungen sowie bei Raumtemperatur (20-22 °C) gewonnen. Der Hauptunterschied des I_{Ba} äußerer und innerer Haarsinneszellen bestand in der Differenz der Maximalstromamplituden. Neonatale ÄHZ zeigten durchschnittliche I_{Ba} Maximalamplituden von -112.4 ± 48.7 pA ($n = 105$), in neonatalen IHZ dagegen erreichte I_{max} Werte von -421 ± 206 pA ($n = 5$). Letztere wiesen zudem signifikant größere Membrankapazitäten auf als neonatale ÄHZ. Um die unterschiedlichen Zellgrößen der beiden Zelltypen zu berücksichtigen, wurden die jeweiligen Stromdichten betrachtet. So ergab sich eine durchschnittliche Stromdichte in neonatalen ÄHZ von 24.4 ± 10.8 pA/pF, die 38 % der Stromdichte der neonatalen IHZ (64.7 ± 29.4 pA/pF) betrug. V_{max} und $V_{1/2}$ waren in ÄHZ leicht positiver als in IHZ und die Steigung der Boltzmann-Funktion k wies in äußeren Haarsinneszellen signifikant höhere Werte auf als in inneren Haarsinneszellen, was bedeutet, dass in ÄHZ die Kanalöffnung weniger stark vom Membranpotential abhing.

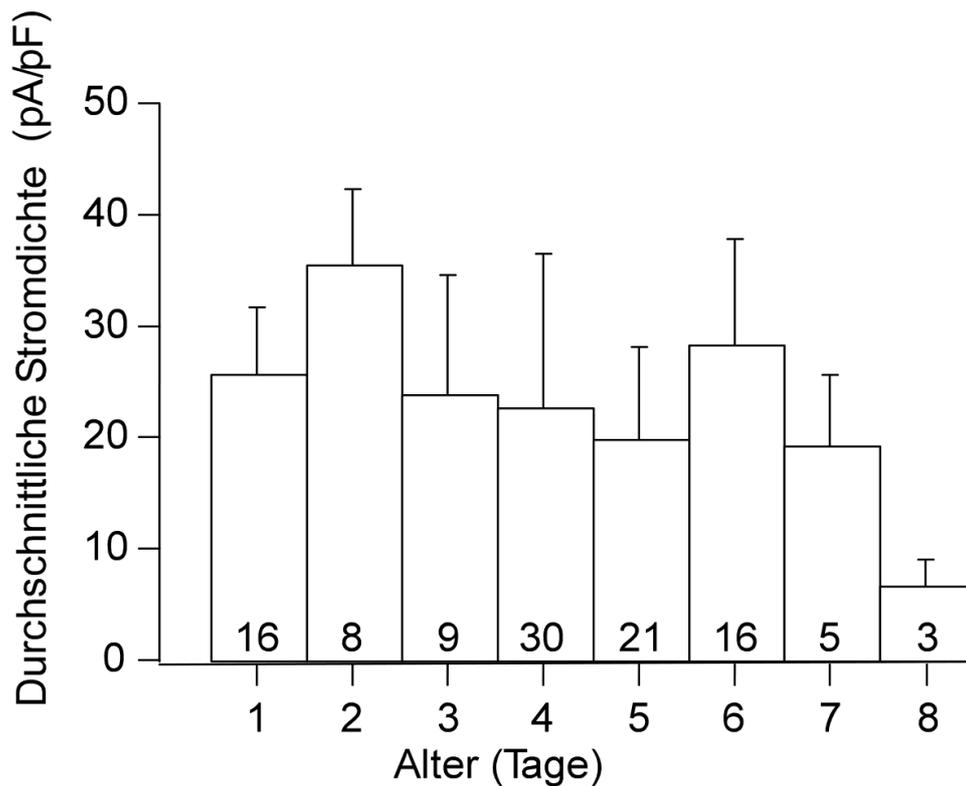


Abbildung 4: Ca²⁺Kanal-Ströme in neonatalen ÄHZ der Maus.

Durchschnittliche I_{Ba}-Stromdichten der ÄHZ von neonatalen Mäusen ± S.D. als Funktion des Alters. Die Anzahl der jeweils gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben. Modifiziert nach (Michna *et al.*, 2003)

3.1.2. Pharmakologische Eigenschaften des Ca²⁺-Kanals in äußeren Haarsinneszellen

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob Dihydropyridin (DHP)-sensitive L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (LTCC) am Ca²⁺-Kanal-Strom neonataler ÄHZ beteiligt sind, untersuchten wir sowohl den Einfluss des LTCC-Agonisten Bay K 8644 als auch den Effekt von Nifedipin, einem LTCC Antagonisten.

Eine Aktivierung des Kanals durch Bay K 8644 ist eine sehr spezifische Eigenschaft von L-Typ Kanälen. In ÄHZ konnte durch Superfusion mit 5 µM Bay K 8644 ein Anstieg des maximalen I_{Ba} auf 178.5±57.8 % (n = 14) erzielt werden. Im Vergleich zu IHZ, in denen eine Zunahme des Bariumstroms um 292 % (Platzer *et al.*, 2000) nach Superfusion von Bay K 8644 bekannt ist, war der

Bariumstrom in äußeren Haarsinneszellen damit weniger sensitiv gegenüber diesem Agonisten. Offensichtlich liegt eine unterschiedlich starke Sensitivität der Ca^{2+} -Kanäle in beiden Haarzelltypen vor.

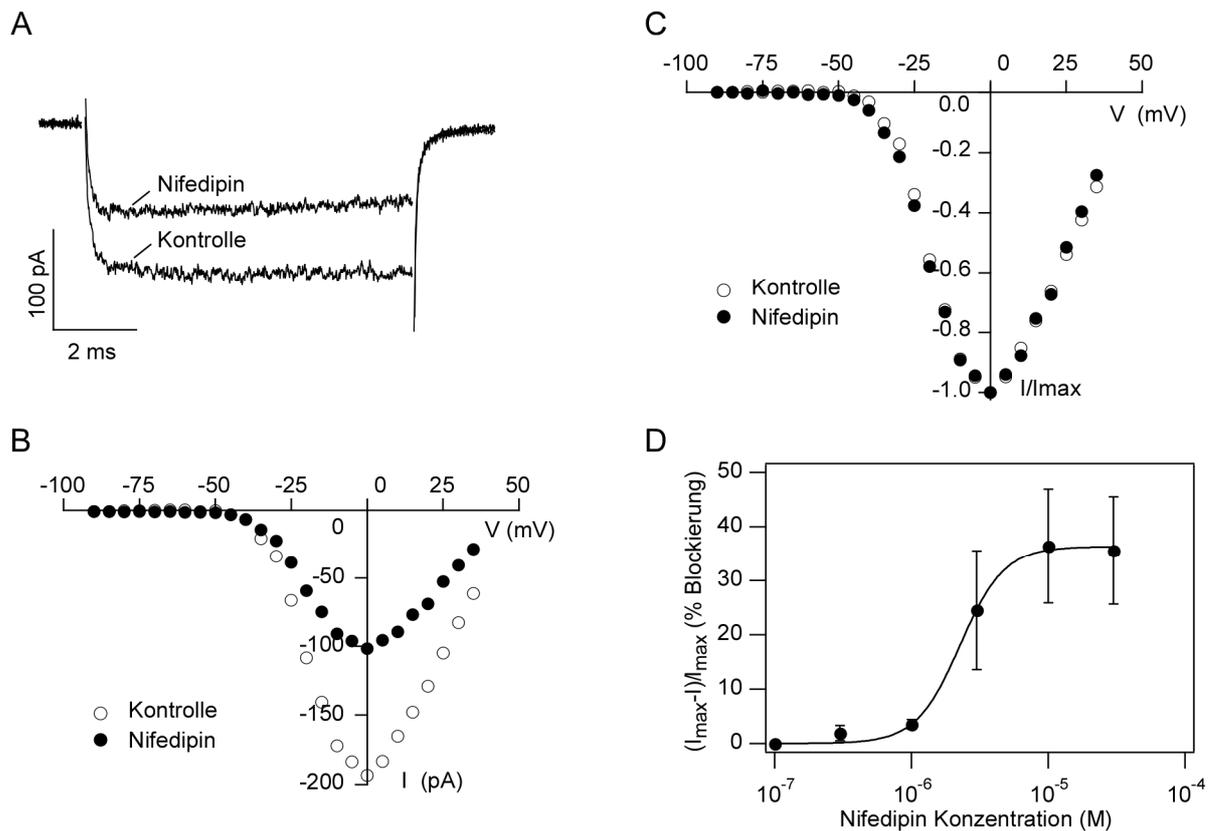


Abbildung 5: Blockierung des I_{Ba} in ÄHZ durch den LTCC-Antagonisten Nifedipin. A, Maximalstromspuren einer ÄHZ (P4) vor (Kontrolle) und während der Applikation von $10 \mu\text{M}$ Nifedipin. **B,** die zugehörige Strom-Spannungs-Kurve wurde jeweils durch Mittelung des I_{Ba} während der letzten Millisekunden des Spannungspulses ermittelt und mit einer Boltzmann-Funktion 1. Ordnung angefitet.

C, Für den Vergleich des Gesamtstroms mit dem Nifedipin-resistenten Reststrom wurden die Strom-Spannungs-Kurven auf ihre jeweiligen Maxima normalisiert. **D,** Dosis-Wirkungs-Kurve äußerer HZ für Nifedipin. Es ist jeweils der Wert der durchschnittlichen prozentualen Blockierwirkung von je 5-10 ÄHZ angegeben. Die Kurve wurde mit der Hill-Gleichung (Gleichung (6)) angepasst ($\text{IC}_{50} = 2.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$, Hill-Koeffizient = 2.7 ± 0.4).

Modifiziert nach (Michna *et al.*, 2003).

Gleichfalls testeten wir die Wirksamkeit des Dihydropyridins und L-Typ-Kanal-Antagonisten Nifedipin. Abb. 5A und B zeigen Barium-Ströme einer neonatalen ÄHZ vor und während der Superfusion mit $10 \mu\text{M}$ Nifedipin sowie die entsprechenden Strom-Spannungs-Kurven.

Nifedipin reduzierte den Maximalstrom auf 56.5 % des Kontrollstroms. Dies liefert eine weitere Bestätigung dafür, dass zumindest ein Teil des I_{Ba} äußerer HZ durch LTCC fließt. Skaliert man die Strom-Spannungs-Kurve des Nifedipin-resistenten Stroms auf das Maximum des Kontrollstroms, so ergeben sich zwei nahezu deckungsgleiche Kurven (Abb. 5C). Um die Sensitivität des Ca^{2+} -Kanal-Stroms in ÄHZ für Nifedipin quantifizieren zu können, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt (Abb. 5D). Konzentrationen zwischen 1 und 10 μM blockierten den I_{Ba} teilweise, wobei eine weitere Erhöhung der Dosis (30 μM) keine zunehmende Blockierwirkung erzielte. Das Anpassen der Kurve mit einer Hill-Gleichung (Gleichung (6)) ergab eine maximale Reduzierung des I_{Ba} um $36.3 \pm 0.9 \%$, einen Hill-Koeffizienten von 2.7 ± 0.4 und einen IC_{50} von $2.3 \pm 0.1 \mu M$. Der relativ hohe IC_{50} -Wert spiegelt die niedrige Sensitivität der LTCC in ÄHZ gegenüber Nifedipin wieder. Ein Grund für diese unvollständige Hemmwirkung könnte das Vorliegen einer gemischten Population von LTCC und Nicht-LTCC in diesem Haarsinneszelltyp sein. Die blockierende Wirkung von Nifedipin (10 μM) auf den Ca^{2+} -Kanal-Stroms in ÄHZ ($33.5 \pm 0.3 \%$ blockierter I_{Ba} ; $n = 14$) war durchaus mit der in IHZ ($44.5 \pm 11.3 \%$ blockierter I_{Ba} ; $n = 4$) vergleichbar, jedoch wesentlich niedriger als bei LTCC von $Ca_v1.2$ -medierten Strömen, bei denen ein vollständiger Block von I_{Ba}/I_{Ca} durch 10 μM Nifedipin beobachtet wurde (Koschak *et al.*, 2001; Xu & Lipscombe, 2001).

3.1.3. Molekulare Identität der Ca^{2+} -Kanäle in äußeren Haarsinneszellen

Transkripte für die $\alpha 1$ -Untereinheit $Ca_v1.3$ konnten über Einzelzell-RT-PCR sowohl in äußeren als auch in inneren Haarsinneszellen nachgewiesen werden (Abb. 7 in (Michna *et al.*, 2003)).

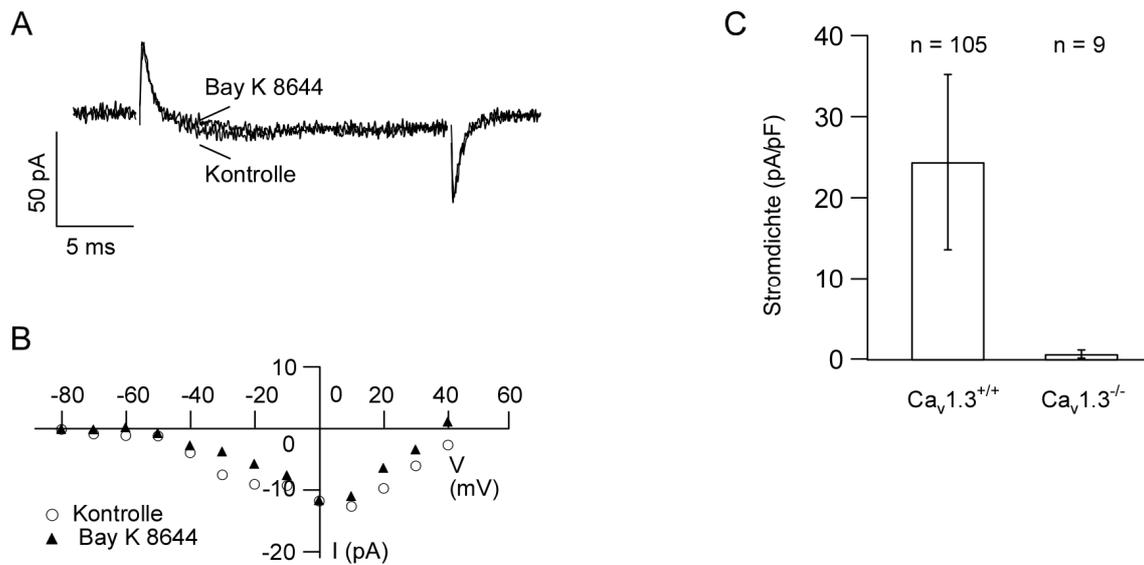


Abbildung 6: Ca²⁺-Kanal-Ströme in Ca_v1.3^{-/-} ÄHZ.

A, Ba²⁺Ströme einer Ca_v1.3^{-/-} ÄHZ (P2) bei Depolarisationen auf 0 mV vor (Kontrolle) und während der Applikation von 5 µM Bay K 8644. **B**, die zugehörige Strom-Spannungskurve wurde jeweils durch Mittelung des I_{Ba} während der letzten Millisekunden des Spannungspulses ermittelt und mit einer Boltzmann-Funktion 1. Ordnung angefitet. **C**, gemittelte Stromdichten von I_{Ba} ± S.D. in ÄHZ von Ca_v1.3^{-/-} und Ca_v1.3^{+/+} -Mäusen.

Modifiziert nach (Michna *et al.*, 2003)

Um den Anteil des Ca_v1.3-vermittelten Stroms am gesamten Ca²⁺-Strom in ÄHZ zu bestimmen, wurden elektrophysiologische Messungen an Ca_v1.3^{-/-} -Mäusen durchgeführt. Äußere Haarsinneszellen von Ca_v1.3^{-/-} -Mäusen wiesen drastisch reduzierte I_{Ba}-Amplituden auf (Abb. 6A). Der größte Strom aller getesteten äußeren Haarsinneszellen von Ca_v1.3^{-/-} -Mäusen zeigte hier eine maximale Amplitude von -13 pA, die auch durch die Applikation von Bay K 8644 nicht vergrößert werden konnte (Abb. 6A und B). In einigen dieser ÄHZ war überhaupt kein messbarer Einwärtsstrom vorhanden. Die durchschnittliche Maximalamplitude mit Ba²⁺ als Ladungsträger lag bei -2.8 ± 3.2 pA und wurde durch die Applikation von Bay K 8644 (5 µM) nicht verändert (-3.0 ± 3.9 pA; n = 9). Verglichen mit dem Wildtyp war die Kapazität äußerer Haarsinneszellen in den „knock out“ -Mäusen unverändert (Wildtyp: 4.7 ± 0.8 pF; n = 105; Ca_v1.3^{-/-}: 4.5 ± 1.1 pF; n = 9). Die Stromdichten von 24.4 ± 10.8 pA/pF (n = 105) in ÄHZ des Wildtyps und 0.6 ± 0.5 pA/pF (n = 9) in Ca_v1.3^{-/-} -Mäusen (Abb. 6C) lassen den Schluss zu, dass mehr als 97 % des I_{Ba} in äußeren Haarsinneszellen durch Ca_v1.3-LTCC fließen.

3.2. Ca_v1.3-Ca²⁺-Kanäle in reifen äußeren Haarsinneszellen von Maus und Ratte²

Die Maximalamplituden der Ca²⁺-Kanal-Ströme nahmen mit Erreichen ihres ausgereiften Phänotyps nach dem postnatalen Tag 6 (P6) deutlich ab (Abb. 4). Um zu untersuchen, ob auch in ausgereiften ÄHZ funktionelle Ca²⁺-Kanäle vorliegen, wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ba²⁺-Ströme und Ca_v1.3-spezifische mRNA in maturen ÄHZ von Maus und Ratte analysiert.

3.2.1. Optimierung der Versuchsbedingungen für elektrophysiologische Messungen an reifen äußeren Haarsinneszellen

Elektrophysiologische Ableitungen an äußeren Haarsinneszellen >P7 wurden mit zunehmendem Alter schwieriger. Die für das Aufzeichnen von Ba²⁺-Strömen nötigen Seals im Gigaohmbereich waren hierbei erschwert zu etablieren, zudem war die Dauer der Ableitungen verkürzt, da der Leckwiderstand (R_{Leck}) bereits nach wenigen Minuten auf sehr geringe Werte absank. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf veränderte Membraneigenschaften wie zunehmende Steifigkeit und erhöhte Fragilität der äußeren Haarsinneszellen während der Reifung. Auch wurde ein Anschwellen der Zellen in Hepes-Hanks-Lösung (Abb. 7A) und der üblicherweise verwendeten TrisCl-Lösung beobachtet. Patch-Clamp-Messungen an reifen ÄHZ wurden ab P8 zusätzlich durch das Einsetzen der Elektromotilität erschwert (Zheng *et al.*, 2000).

Um das Anschwellen der Haarsinneszellen zu verhindern, wurden der TrisCl-Lösung 10 µM Tamoxifen hinzugefügt (Abb. 7D-F) oder ein Teil der Cl⁻ durch

² Die hier beschriebenen Daten sind bei J Neurosci eingereicht und befinden sich in positiver Begutachtung.

*Knirsch M., *Brandt N., Braig C., Kuhn S., Hirt B., Münkner S., Knipper M., Engel J.; Persistence of Ca_v1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *gleichberechtigte Autorenschaft.

Laktobionat ersetzt (Tris-Laktobionat-Lösung). Tamoxifen fungiert als Hemmstoff volumenregulatorischer Cl^- -Kanäle (Hoffmann, 2000). Laktobionat, ein großes Anion, blockiert diese Cl^- -Kanäle (Siegel & Zeddes, 2001) und verzögert vermutlich somit das Anschwellen der Zellen. In Tris-Laktobionat-Lösung behielten reife ÄHZ auch über einen längeren Zeitraum ihre zylindrische Form und zeigten keine vergrößerten Zellkerne (Abb. 7A, B). Aus diesem Grund verwendeten wir für die Ableitung von reifenden und ausgereiften ÄHZ Tris-Laktobionat-Lösung oder später TEA-Laktobionat-Lösung.

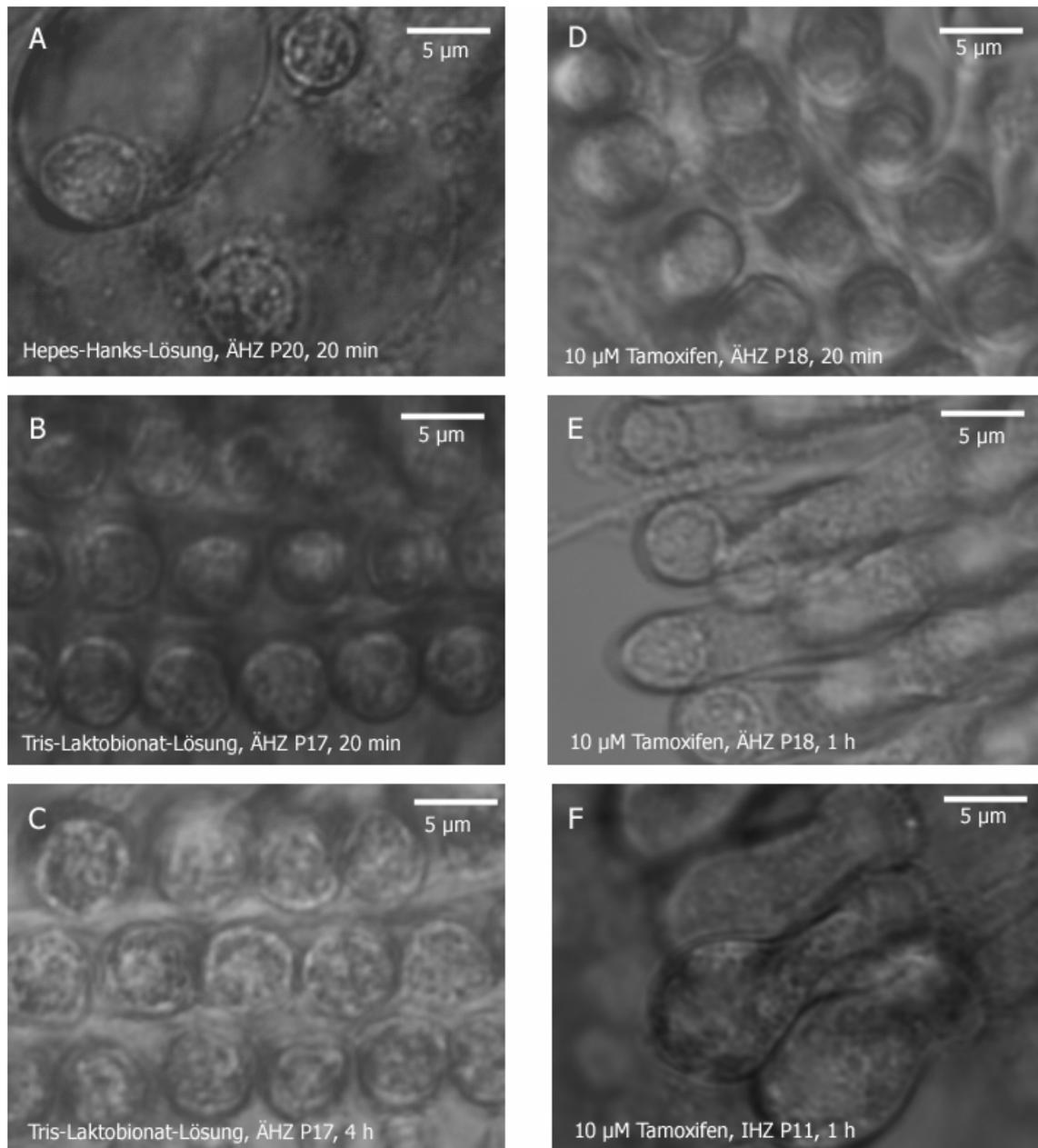


Abbildung 7: Zustand reifer Haarsinneszellen unter verschiedenen extrazellulären Lösungsbedingungen.

A, ÄHZ (P20) sind nach 20 min in Hapes-Hanks-Lösung stark angeschwollen. **B**, **C**, ÄHZ (P17) nach 20 min (**B**) und 4 h (**C**) in Tris-Laktobionat-Lösung (160 mM Laktobionat). **D**, ÄHZ (P 18) behielten ihre ursprüngliche Form nach 20 min in TrisCl-Lösung mit 10 µM Tamoxifen. **E**, geschwollene ÄHZ nach 1 h in TrisCl-Lösung mit 10 µM Tamoxifen. **F**, geschwollene IHZ (P11) nach 1 h in TrisCl-Lösung mit 10 µM Tamoxifen.

3.2.2. Biophysikalische Eigenschaften des Ca^{2+} -Kanals in reifen äußeren Haarsinneszellen der Maus

Der maximale I_{Ba} äußerer Haarsinneszellen sank auch unter optimierten Bedingungen während der ersten postnatalen Woche von Werten über -70 pA (Michna *et al.*, 2003) auf unter -45 pA. Abb. 8A-F zeigt Stromspuren (I_{Ba}) mit entsprechenden Strom-Spannungs-Kurven äußerer Haarsinneszellen zum Zeitpunkt des Hörbeginns (P12) und danach (P19). Sowohl der Verlauf des Maximalstroms (I_{Ba}) bei einer Depolarisation der ÄHZ auf 0 mV als auch die zugehörige Strom-Spannungs-Kurve (Abb. 8A, B) ähnelten den Daten, die an neonatalen ÄHZ erhoben wurden (Michna *et al.*, 2003). K^+ -Ströme durch KCNQ4-Kanäle in ausgereiften ÄHZ erreichen unblockiert Amplituden von bis zu 5 nA (Marcotti & Kros, 1999; Kharkovets *et al.*, 2006). Die Kombination aus extrazellulären Tris^+ - und Ba^{2+} - sowie intrazellulären Cs^+ -Ionen blockierte somit ausreichend jegliche K^+ -Kanal-Auswärtsströme. Einen wichtigen Hinweis, dass auch in reifen ÄHZ Ca^{2+} -Ionen durch L-Typ-Kanäle fließen, gab die Sensitivität des I_{Ba} gegenüber dem L-Typ-Kanal-Agonisten Bay K 8644 (Abb. 8C). In Anwesenheit von 5 μM Bay K 8644 ließ sich der I_{Ba} reifer ÄHZ auf $148 \pm 21 \%$ ($n = 3$, P10-P12) des Kontrollstroms verstärken (neonatal P1-P7: $178 \pm 58 \%$; (Michna *et al.*, 2003). Eine spannungsabhängige Inaktivierung des Ca^{2+} Kanals, eine Eigenschaft von L-Typ-Kanälen, die denen der neonatalen ÄHZ fehlt (Michna *et al.*, 2003), trat auch in reifen ÄHZ selbst nach lang anhaltenden Depolarisationen nicht auf (Abb. 8D). Abbildung 8F zeigt eine Zusammenstellung der durchschnittlichen maximalen Einwärtsströme (I_{Ba}) äußerer Haarsinneszellen der Maus zwischen P1 und P19. Die Amplitude des I_{Ba} sank zwischen P6 und P8, dem Zeitfenster, in dem in ÄHZ die Elektromotilität einsetzt (Oliver & Fakler, 1999) und die KCNQ4-Leitfähigkeit heraufreguliert wird (Marcotti & Kros, 1999; Kharkovets *et al.*, 2006) von -125 pA auf weniger als -50 pA ab. Nach Hörbeginn (um P12; (Ehret, 1985)) nahm die Maximalamplitude weiter ab und erreichte am postnatalen Tag P19 Werte zwischen -10 und -15 pA ($n = 3$).

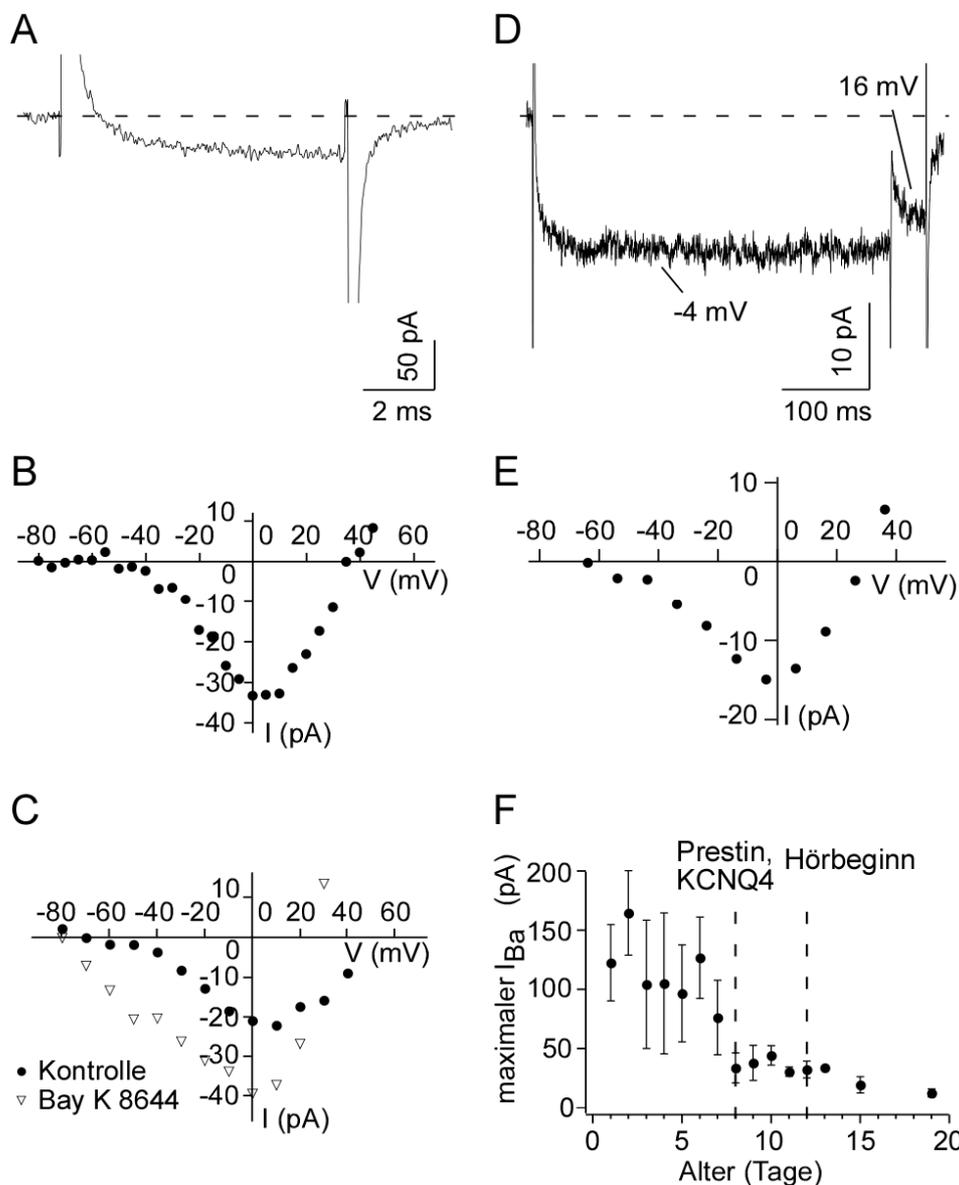


Abbildung 8: Ca^{2+} -Kanal-Ströme (I_{Ba}) in ÄHZ der Maus zum Zeitpunkt des Hörbeginns (P12) und späterer Altersstadien. **A, Maximalstrom (I_{Ba}), hervorgerufen durch eine 8 ms andauernde Depolarisation einer apikalen ÄHZ (P12) ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV auf 0 mV. Die durch das Prestin bedingten kapazitiven Transienten, die zu Beginn und Ende der Stromantwort auftraten, wurden herausgeschnitten. Gestrichelte Linie: Nullstrom. **B**, zugehörige Strom-Spannungs-Kurve. **C**, Strom-Spannungs-Kurve einer weiteren apikalen ÄHZ (P12) vor (Kontrolle) und während der Applikation von 5 μM Bay K 8644. **D**, nicht-inaktivierender I_{Ba} einer apikalen ÄHZ (P19) während der lang andauernden Depolarisation eines Inaktivierungsprotokolls. **E**, zugehörige Strom-Spannungs-Kurve, die am Ende der 400 ms andauernden Depolarisierungsschritte ermittelt wurde. Die großen kapazitiven Transienten in A und D sind durch die nichtlineare Kapazität der ÄHZ bedingt. **F**, entwicklungsabhängige Regulation des maximalen I_{Ba} als Funktion des Alters. Werte von P1-P8 wurden aus Michna *et al.*, 2003 entnommen. Anzahl der Zellen >P8: P9: 4, P10: 2, P11: 2, P12: 4, P13: 1, P15: 2, P19: 3. ÄHZ >P8 stammten ausschließlich aus der apikalen Windung, mit Ausnahme zweier medialer ÄHZ an P15. Modifiziert nach (Knirsch *et al.*, 2007).**

3.2.3. Ca^{2+} -Kanal-Ströme in neonatalen HZ der Ratte³

Da es mit steigendem Alter der Mäuse immer schwieriger wurde, Ganzzellströme an ausgereiften ÄHZ abzuleiten, wurden die Maus-Daten durch Messungen des I_{Ba} in ÄHZ von Ratten ergänzt. Der I_{Ba} erreichte hier wie bei den Mäusen in beiden Haarzelltypen während der postnatalen Phase noch vor Hörbeginn ein entwicklungsabhängiges Maximum, was den an HZ der Maus gewonnenen Daten entsprach (Marcotti & Kros, 1999; Beutner & Moser, 2001; Michna *et al.*, 2003). Mit einem τ_{act} von 0.30 ± 0.10 ms (P3; $n = 5$) bei V_{max} in ÄHZ und von 0.35 ± 0.06 (P5-P12; $n = 7$) in IHZ zeigte der I_{Ba} in HZ neonataler Ratten (Abb. 9 A, D) eine rasche Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik, was mit den an HZ der Maus gewonnenen Daten übereinstimmte (Platzer *et al.*, 2000; Michna *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005). Die Maxima der glockenförmigen Strom-Spannungskurven beider Haarzelltypen lagen bei etwa 0 mV (Abb. 9B, E) und auch das schwach ausgeprägte Inaktivierungsverhalten (VDI) des I_{Ba} äußerer HZ glich dem in IHZ (Abb. 9C, F). Abweichend zu den ÄHZ war die I_{Ba} -Amplitude des entwicklungsabhängigen Maximums in IHZ mehr als doppelt so hoch (Abb. 9B, E) und trat früher auf (siehe 3.2.5).

³ Daten von Niels Brandt, Stephanie Kuhn und Martina Knirsch

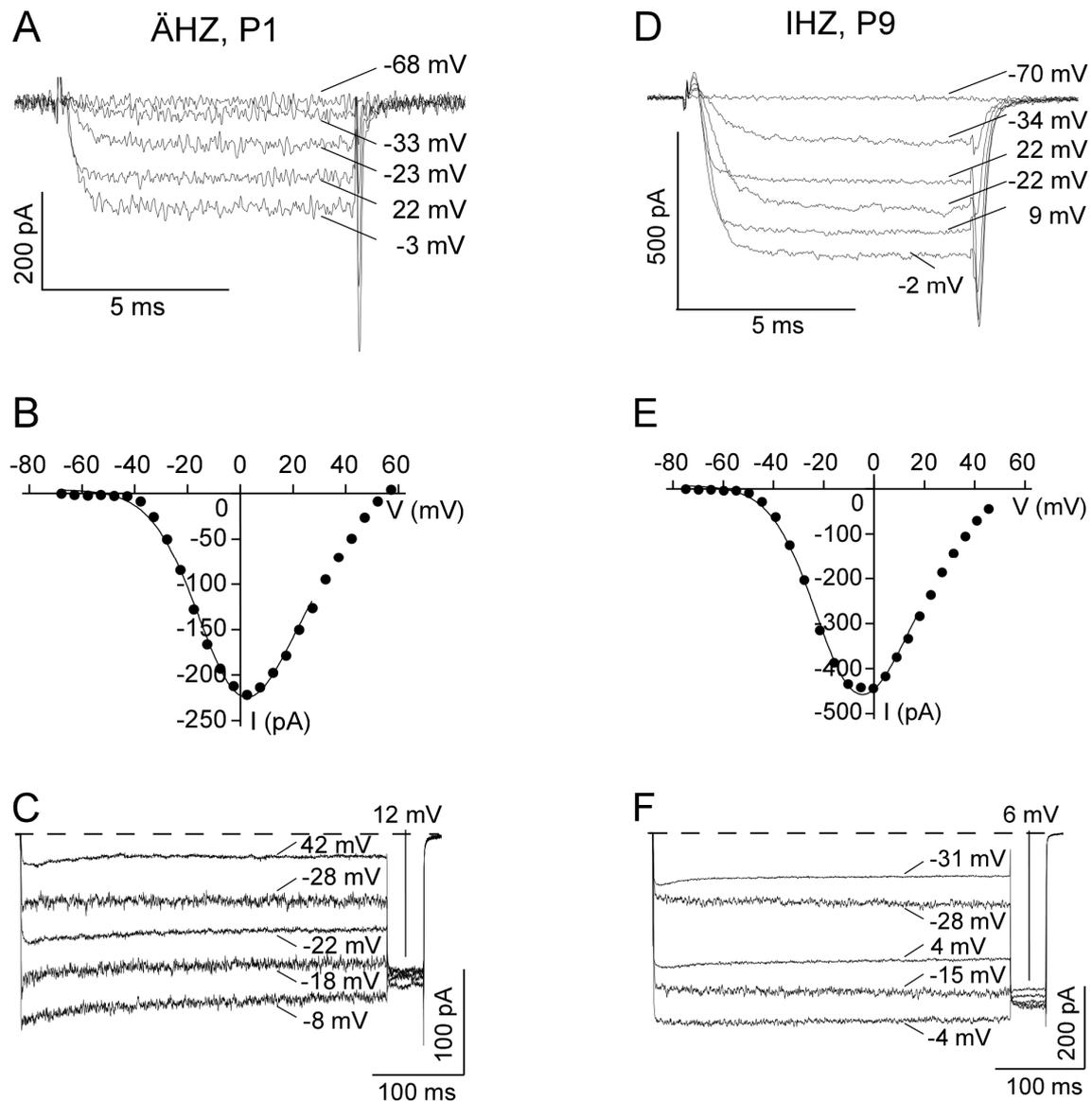


Abbildung 9: Ca^{2+} Kanal-Ströme (I_{Ba}) in neonatalen ÄHZ und IHZ der Ratte zum Zeitpunkt der jeweiligen entwicklungsabhängigen I_{Ba} Maxima. A-C Ba^{2+} -Ströme und Strom-Spannungskurven der ÄHZ einer Ratte an P1, $C=7.1$ pF, $R_{Leck}=6.1$ G Ω . **A, ausgewählte Stromspuren einer ÄHZ als Antwort auf 8 ms andauernde Depolarisierungsstufen, ausgehend von einem Haltepotential von -68 mV. **B**, die zugehörige Strom-Spannungskurve wurde jeweils durch Mittelung des I_{Ba} während der letzten Millisekunden des Spannungspulses ermittelt und mit einem Boltzmann-Fit nach Gleichung (2) angefitet; ($V_{1/2} = -10.4$ mV, $k= 13.8$ mV). **C** Ba^{2+} -Ströme mit geringer spannungsabhängiger Inaktivierung als Antwort auf ein lang andauerndes Inaktivierungsprotokoll. **D-F**, Ba^{2+} -Stromspuren einer IHZ einer Ratte an P9, $C= 10.1$ pF, $R_{Leck} = 2.8$ M Ω . **D**, ausgewählte Stromspuren einer IHZ als Antwort auf 8 ms andauernde Depolarisierungsstufen, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV. **E**, zugehörige Strom-Spannungskurve und Boltzmann-Fit nach Gleichung (2) ($V_{1/2} = -19.4$ mV, $k= 13.6$ mV). **F**, Ba^{2+} -Ströme mit geringer spannungsabhängiger Inaktivierung als Antwort auf ein 400 ms andauerndes Inaktivierungsprotokoll. Modifiziert nach (Knirsch *et al.*, 2007).**

3.2.4. Ca^{2+} -Kanal-Ströme in reifen HZ der Ratte⁴

Durch Verwendung einer modifizierten Extrazellulär-Lösung (95 oder 100 mM Cl^-) und aufgrund der robusteren Natur reifer ÄHZ der Ratte konnten hier längere und stabilere Ableitungen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme vorgenommen werden.

Wie auch in ÄHZ der Maus riefen Depolarisationen reifer ÄHZ der Ratte neben kleinen Einwärtsströmen (I_{Ba}) zunächst große kapazitive transiente Ströme aufgrund der nichtlinearen Kapazität (Santos-Sacchi, 1991) hervor, die die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanal-Ströme überlagerten. Das Anfitzen der Transienten mit einer monoexponentiellen Funktion ergab Zeitkonstanten (τ) von 0.26-0.34 ms. Berücksichtigt man, dass die Amplituden der Transienten etwa ein 20-Faches der maximalen I_{Ba} -Amplitude erreichten, kann von einem Abklingen der Transienten nach einem Zeitraum ausgegangen werden, der dem 7-fachen der Transienten-Zeitkonstanten (~ 2.8 ms) entspricht. In der Tat ist 2.8 ms nach Beginn der Depolarisation in ausgereiften ÄHZ die maximale I_{Ba} -Amplitude erreicht (Abb. 10B). Die Kinetik der Aktivierung des Ca^{2+} -Kanal-Stroms in ausgereiften ÄHZ ist demnach nicht langsamer als die der neonatalen Ca^{2+} -Kanal-Ströme ($\tau=0.3$ ms bei V_{max}).

Im Vergleich zu neonatalen ÄHZ zeigten die Strom-Spannungs-Kurven reifer ÄHZ eine Verschiebung zu positiveren Werten (Abb. 10C). Lange Depolarisationspulse riefen ebenso wie bei neonatalen ÄHZ geringe spannungsabhängige Inaktivierung hervor (Abb. 10D). Die Maximalamplitude des I_{Ba} reifer ÄHZ betrug mit -66 ± 18 pA ($n = 13$; P28) nur etwa 30 % des I_{Ba} reifer IHZ (-219 ± 26 pA, $n = 6$; P30). Auch IHZ zeigten eine mit der Reifung in Richtung positiverer Werte verschobene Strom-Spannungs-Kurve (Abb. 10F) und ebenfalls keine spannungssensitive Inaktivierung (Abb. 10G). Die Strom-Spannungs-Kurve von reifen ÄHZ war um 9 mV positiver als die der reifen IHZ. Die Aktivierungszeitkonstanten des Ca^{2+} -Kanals in ausgereiften IHZ bei V_{max} betrug 0.32 ± 0.05 ms (P17-P30; $n = 5$).

⁴ Daten von Niels Brandt und Stephanie Kuhn

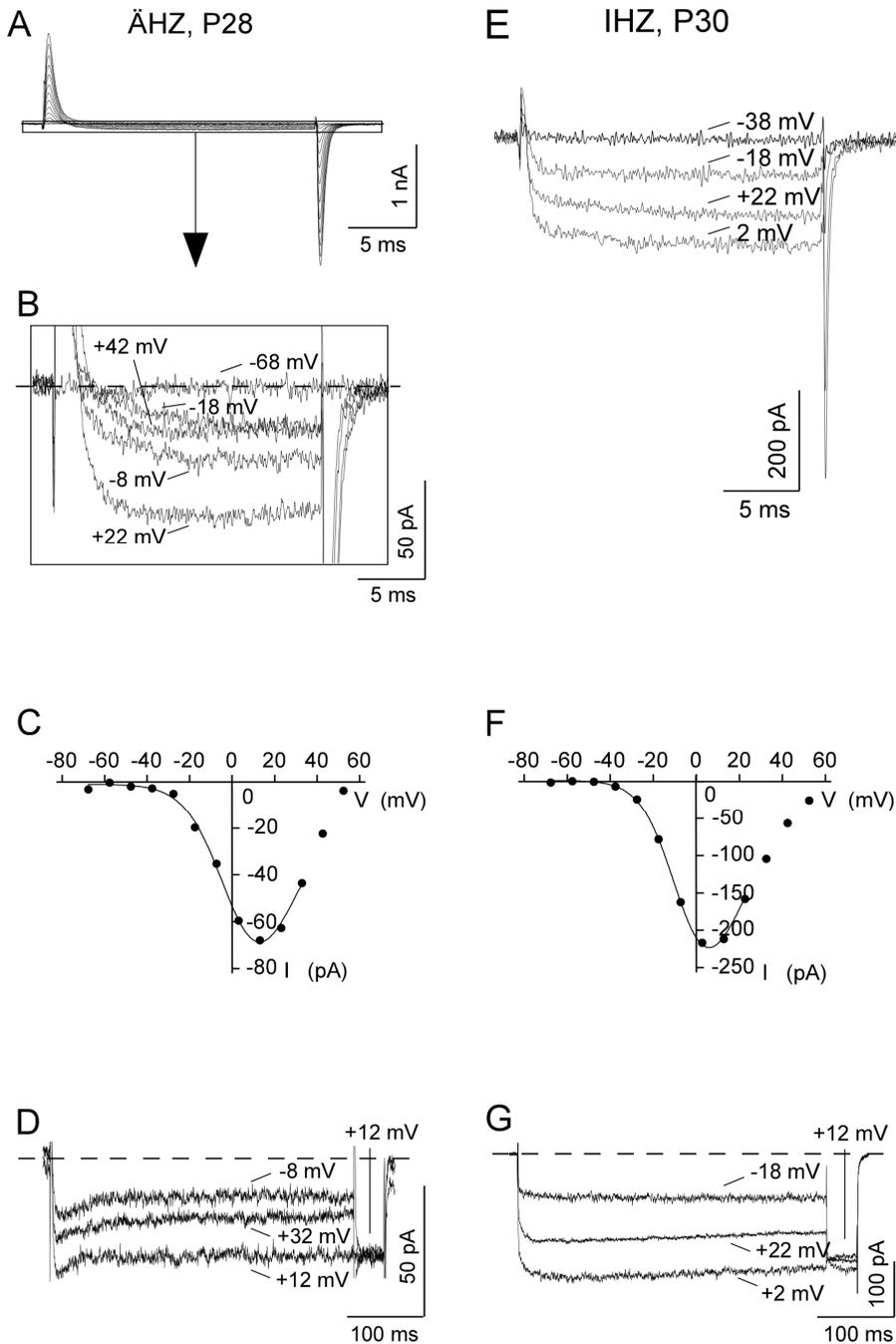


Abbildung 10: Ca^{2+} Kanal-Ströme (I_{Ba}) in matten ÄHZ und IHZ der Ratte. A-D Ba^{2+} -Ströme und Strom-Spannungskurven einer Ratten ÄHZ, P28, $C = 16.1 \text{ pF}$, $R_{\text{Leck}} = 1.8 \text{ M}\Omega$. **A**, I_{Ba} einer ÄHZ, hervorgerufen durch 20 ms andauernde Depolarisierungsschritte, ausgehend von einem Haltepotential von -68 mV auf $+52 \text{ mV}$. Die großen kapazitiven Transienten, die zu Beginn und Ende der Stromantwort auftraten, waren durch die nichtlineare Kapazität der ÄHZ bedingt. Die kleinen Einwärtsströme innerhalb des eingezeichneten Rechtecks in **A** sind in **B** vergrößert dargestellt. **C**, zugehörige Strom-Spannungskurve mit Boltzmann-Fit nach Gleichung (2), $V_{1/2} = 2.2 \text{ mV}$, $k = 13.6 \text{ mV}$. **D**, Ba^{2+} -Ströme mit schwacher spannungsabhängiger Inaktivierung als Antwort auf ein lang andauerndes Inaktivierungsprotokoll einer weiteren ÄHZ, P28 ($C = 17.6 \text{ pF}$, $R_{\text{Leck}} = 1.7 \text{ G}\Omega$). **E-G**: I_{Ba} einer Ratten IHZ, P30, $C = 14.7 \text{ pF}$, $R_{\text{Leck}} = 1.6 \text{ G}\Omega$. **E**, Durch Depolarisierungsschritte hervorgerufene Ba^{2+} Ströme, ausgehend von einem Haltepotential von -68 mV . **F**, zugehörige Strom-Spannungskurve mit Boltzmann Fit nach Gleichung (2), $V_{1/2} = 7.1 \text{ mV}$, $k = 11.8 \text{ mV}$. **G**, Ba^{2+} -Ströme ohne spannungsabhängige Inaktivierung als Antwort auf ein 400 ms andauerndes Inaktivierungsprotokoll. Modifiziert nach (Knirsch *et al.*, 2007).

3.2.5. Die Amplitude des Barium-Stroms zeigte sowohl in ÄHZ als auch in IHZ von Maus und Ratte ein entwicklungsabhängiges Maximum

Während der Reifung innerer und äußerer Haarsinneszellen konnte sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen nach einem neonatalen Maximum des I_{Ba} eine anschließende Reduzierung auf niedrige Amplituden beobachtet werden (Abb. 4 und Abb. 11). Der I_{Ba} äußerer Haarsinneszellen von Ratten war bereits nach Geburt auf einem hohen Niveau von -174 ± 46 pA ($n = 6$; P1-P4), sank ab P8 drastisch ab und verblieb auf diesem niedrigen Niveau bis zum Alter P28. Innere Haarsinneszellen von Ratten hingegen wiesen einen stetigen Anstieg des I_{Ba} nach der Geburt auf, welcher in einem Maximum zwischen P9 und P11 (-421 ± 63 pA, P9-P11; $n = 10$) gipfelte (Abb. 11B) und nach Hörbeginn auf ein niedrigeres Niveau absank. Das Maximum von I_{Ba} in ÄHZ neonataler Ratten (P1-P4) entsprach damit etwa 41 % des I_{Ba} -Maximums neonataler IHZ (P9-P11).

Um den zeitlichen Verlauf der Regulation des I_{Ba} zwischen beiden Typen Haarsinneszellen besser vergleichen zu können, wurden die I_{Ba} -Werte jeweils auf ihre Maximalwerte normiert (Abb. 11C). Verschoob man die Werte der ÄHZ um 8 Tage in Richtung älterer Stadien, so ergab sich eine auffallende Übereinstimmung der abfallenden Schenkel beider Kurven, was auf eine ähnliche Kinetik der die Ca^{2+} -Kanal-Expression herabregulierenden Prozesse in beiden Typen Haarsinneszellen hinweist.

Der I_{Ba} zeigte auch in HZ von Mäusen dieses entwicklungsabhängige Regulationsmuster. Hier war ein Anstieg der Maximalamplitude in ÄHZ bis P2 (Abb. 4 und Abb. 11 E) zu beobachten, in IHZ erreicht I_{Ba} an P6 maximale Werte (Marcotti & Kros, 1999). Eine Verschiebung der in ÄHZ gemessenen maximalen I_{Ba} -Werte um 4 Tage zeigte hier ebenso einen vergleichbaren Verlauf der Regulation in beiden Haarsinneszelltypen (Abb. 11F).

Stellt man die I_{Ba} -Amplituden der ÄHZ und IHZ hörender Ratten einander gegenüber, so wird offensichtlich, dass sich die Ströme in ÄHZ $\geq P12$ und IHZ $\geq P15$ (Fig. 11B) faktisch nicht mehr änderten. Die durchschnittlichen Werte des

Ergebnisse

maturen I_{Ba} betragen -58 ± 9 pA ($n = 20$) in ÄHZ (P19-P30) und -181 ± 50 pA ($n = 24$) in IHZ (P17-P30). Somit entsprach die maximale I_{Ba} -Amplitude in reifen ÄHZ 32 % des I_{Ba} in ausgereiften IHZ. Die entwicklungsabhängige Herunterregulation des I_{Ba} zeigte in beiden Haarzell-Typen eine ähnliche Kinetik, jedoch wurde bezüglich der Reifung spannungsensitiver Ca^{2+} -Kanal-Ströme ein zeitlicher Vorsprung der ÄHZ gegenüber den IHZ deutlich.

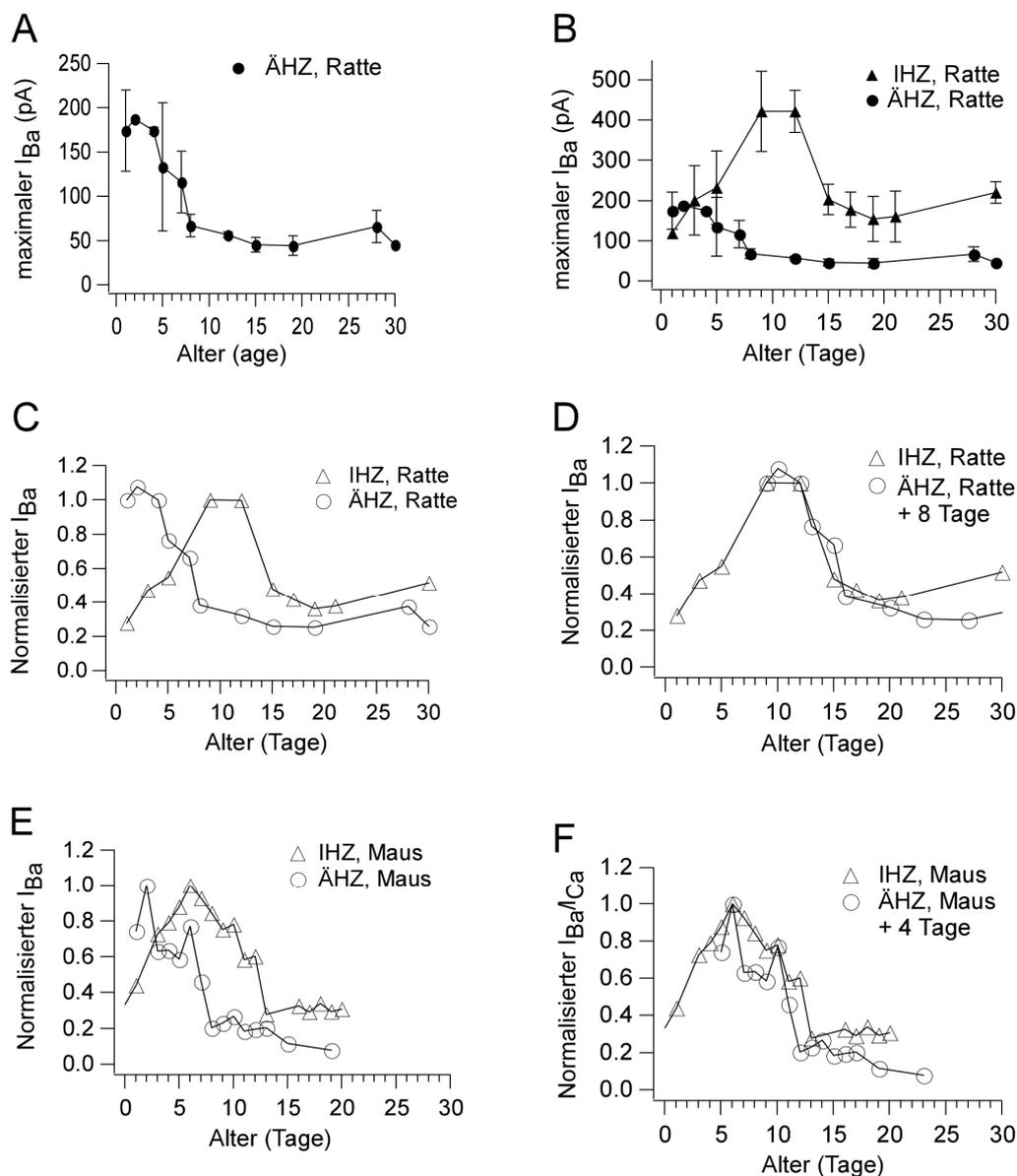


Abbildung 11: Ca^{2+} -Kanal-Ströme zeigen sowohl in ÄHZ als auch in IHZ von Ratte und Maus eine entwicklungsabhängige Regulation.

A, durchschnittliche Maximalströme (I_{Ba}) in ÄHZ der Ratte als Funktion des Alters. Anzahl der ÄHZ in P1: 6; P2: 1; P4: 2; P5: 5; P7: 6; P8: 3; P12: 2; P15: 5; P19: 6; P28: 13; P30: 1. ÄHZ stammten $\leq P8$ aus der apikalen und medialen, $>P8$ aus der apikalen Cochleawindung. **B**, durchschnittliche Maximalströme (I_{Ba}) in IHZ (▲) und ÄHZ (●) der Ratte als Funktion des Alters. Anzahl der IHZ in P1: 1; P3: 2; P5: 14; P9: 3; P11: 7; P15: 13; P17: 10; P19: 3; P21: 5; P30: 6. **C**, auf das entwicklungsabhängige Maximum normierte Durchschnittswerte des I_{Ba} in IHZ (△) und ÄHZ (○) von Ratten. **D**, die um 8 Tage nach rechts verschobene normalisierte I_{Ba} -Kurve von ÄHZ entsprach der Entwicklung des I_{Ba} in IHZ. **E**, auf das entwicklungsabhängige Maximum normalisierte Durchschnittswerte des I_{Ba} in ÄHZ der Maus (○) (aus Abb. 4) und ebenfalls normalisierte IHZ- Daten (I_{Ca}) von Mäusen aus (Marcotti *et al.*, 2003b) (△). **F**, die um 4 Tage nach rechts verschobene normalisierte I_{Ba} -Kurve von ÄHZ entsprach der Entwicklung des I_{Ca} in IHZ. Modifiziert nach (Knirsch *et al.*, 2007).

3.2.6. Nachweis von $\text{Ca}_v1.3$ mRNA in ausgereiften Haarsinneszellen von Maus und Ratte

Dass $\text{Ca}_v1.3$ die dominierende Ca^{2+} -Kanal- $\alpha 1$ -Untereinheit in neonatalen und maturen inneren und neonatalen äußeren HZ bildet (Platzer *et al.*, 2000; Michna *et al.*, 2003; Brandt *et al.*, 2003; Dou *et al.*, 2004), konnte durch Messungen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in HZ von $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen bereits gezeigt werden. Um hierzu auch für ausgereifte ÄHZ eine Aussage treffen zu können – ÄHZ in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen degenerieren ab P14, IHZ ab P35 – wurde das Vorhandensein von $\text{Ca}_v1.3$ mittels zellspezifischer RT-PCR untersucht. Hierzu wurden apikale Cochleawindungen präpariert und mittels Mikropipetten spezifisch IHZ und ÄHZ gewonnen (siehe 2.4.). In reifen HZ (P12, P18, P32) von Ratten und Mäusen konnten mit Hilfe von verschachtelter PCR $\text{Ca}_v1.3$ -spezifische Transkripte (421bp) nachgewiesen werden (Abb. 12).

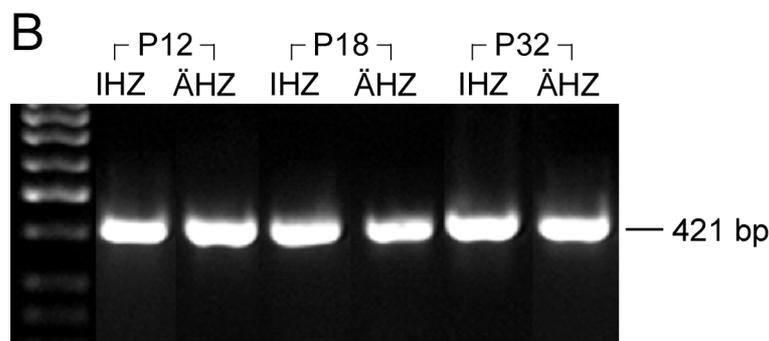
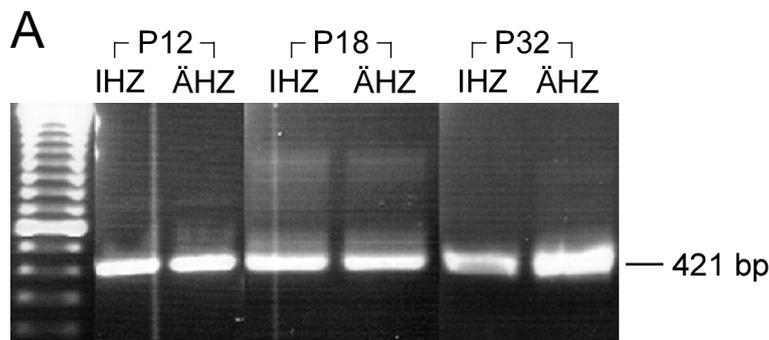


Abbildung 12: Nachweis $\text{Ca}_v1.3$ -spezifischer Transkripte in HZ von Maus und Ratte zum Zeitpunkt des Hörbeginns und späterer Stadien (P12-P32) mittels zellspezifischer RT-PCR. A, B, Ein $\text{Ca}_v1.3$ -spezifisches Fragment von 421 bp Länge wurde in IHZ und ÄHZ von Maus (A) und Ratte (B) in unterschiedlichen Altersstadien nachgewiesen. Modifiziert nach (Knirsch *et al.*, 2007).

3.3. Die $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten in äußeren und inneren Haarsinneszellen der Maus⁵

Funktionale L-Typ-Kanäle bestehen stets aus der porenbildenden α_1 -Untereinheit, einer β - und $\alpha_2\delta$ -, sowie in den meisten Fällen einer γ -Untereinheit. Die β -Untereinheit nimmt für die Integration des stabilen Proteins α_1 in der Plasmamembran sowie bei der Modulation des Kanals eine wichtige Funktion ein.

Hierbei stellt sich die Frage, ob es präferierte Kombinationen einer bestimmten α_1 -Untereinheit mit ganz bestimmten $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten gibt. Für manche Zelltypen scheint dies der Fall zu sein. So liegt im Skelettmuskel $\text{Ca}_v1.1$ mit $\text{Ca}_v\beta1$ kombiniert vor, in ventrikulären Herzmuskelzellen $\text{Ca}_v1.2$ mit $\text{Ca}_v\beta2_a$. Für Neurone sind spezifische Paarungen von $\text{Ca}_v\alpha_1$ mit $\text{Ca}_v\beta$ nicht bekannt. Aufgrund der Expression aller 4 $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten in Neuronen ist die Untersuchung hierbei schwierig.

Da in cochleären HZ fast nur $\text{Ca}_v1.3$ exprimiert ist (>90 % (Platzer *et al.*, 2000; Michna *et al.*, 2003; Knirsch *et al.*, 2007)), sind HZ ein besonders geeignetes System, die Kombination der Untereinheiten des $\text{Ca}_v1.3$ in nativen Zellen zu untersuchen.

3.3.1. Nachweis $\text{Ca}_v\beta$ -spezifischer Transkripte in äußeren und inneren Haarsinneszellen

(Green *et al.*, 1996) konnten erstmals die $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten $\text{Ca}_v\beta1$, $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$, nicht jedoch $\text{Ca}_v\beta2$ mit Hilfe von RT-PCR-Analysen in cDNA aus der Maus-Cochlea nachweisen. Als Kontrollen wiesen sie $\text{Ca}_v\beta1$, $\text{Ca}_v\beta2$, $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$ im Gehirn nach.

⁵ Manuskript in Vorbereitung für Publikation.

*Knirsch M., *Kuhn S., Rüttiger L., Münkner S., Kasperek S., Freichel M., Flockerzi V., Knipper M., Engel J.; The auxiliary beta subunits 1-4 of presynaptic Cav1.3 channels in cochlear hair cells. *gleichberechtigte Autorenschaft.

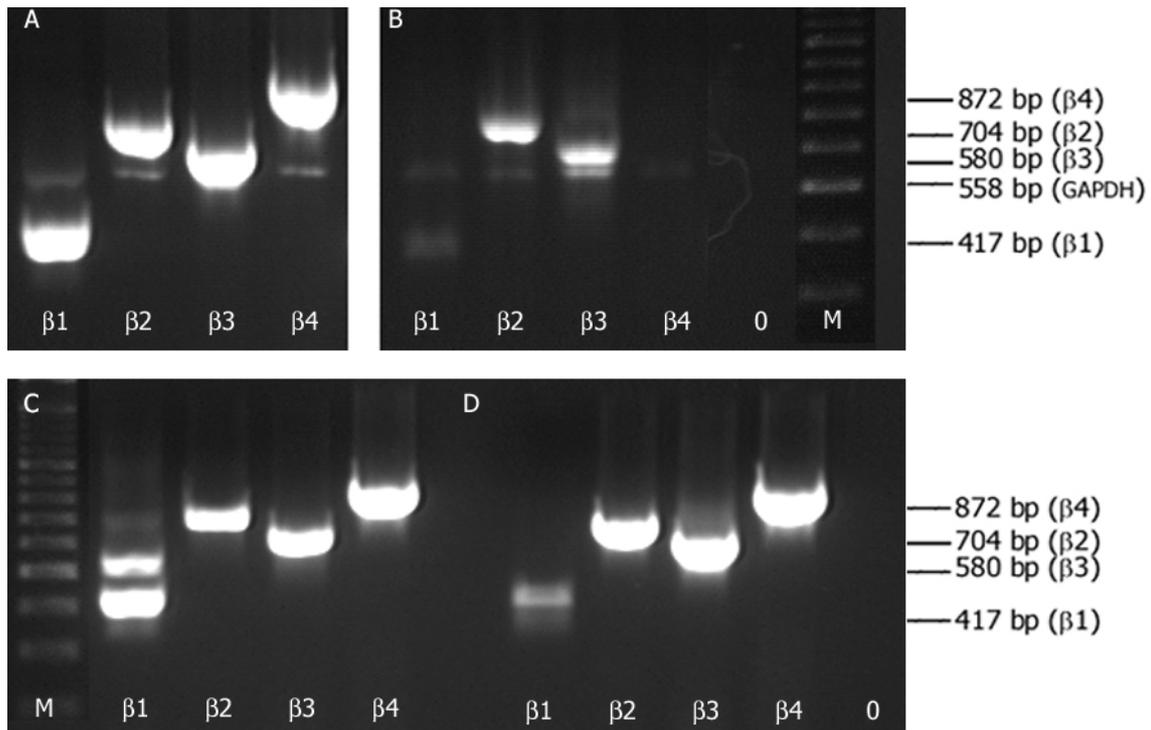


Abbildung 13: Nachweis $Ca_v\beta$ -spezifischer Transkripte in äußeren und inneren Haarsinneszellen, Cortischem Organ und im Cortex der Maus mittels zellspezifischer verschachtelter RT-PCR. **A**, Detektion $Ca_v\beta$ -spezifischer Fragmente in ÄHZ (P4): $Ca_v\beta_1$ (417 bp), $Ca_v\beta_2$ (704 bp), $Ca_v\beta_3$ (580 bp), $Ca_v\beta_4$ (872 bp) sowie jeweils schwache Banden für GAPDH (558 bp). **B**, Detektion $Ca_v\beta$ -spezifischer Fragmente in IHZ (P4): $Ca_v\beta_1$ (417 bp; sehr schwaches Signal), $Ca_v\beta_2$ (704 bp), $Ca_v\beta_3$ (580 bp) sowie jeweils schwache Banden für GAPDH (558 bp). **C**, **D**, Detektion aller 4 $Ca_v\beta$ -spezifischen Fragmente im Cortischen Organ (C) und Cortex (D) der Maus (P18). $Ca_v\beta_1$ -spezifische Primer amplifizierten in cDNA des Cortischen Organs (C) 3 Banden unterschiedlicher Länge (~ 400 bp; ~ 550 bp; ~ 700 bp). M, Marker; 0, Negativkontrolle.

Unklar blieb jedoch, ob möglicherweise ein spezifisches Verteilungsmuster der $Ca_v\beta$ -Untereinheiten in äußeren und inneren Haarsinneszellen der Cochlea existiert. In beiden Typen HZ fließt der Großteil des Ca^{2+} -Kanal-Stroms durch dieselbe α_1 -Untereinheit. Die dennoch bestehenden biophysikalischen Unterschiede des I_{Ba} in ÄHZ und IHZ, wie die unterschiedlich ausgeprägte spannungsabhängige Inaktivierung des I_{Ba} (3.6 ± 1.5 % in ÄHZ (Michna *et al.*, 2003); 11.1 ± 4.8 % in IHZ (Platzer *et al.*, 2000) und die unterschiedliche Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung (Michna *et al.*, 2003), sowie die unterschiedliche Sensitivität der HZ gegenüber Bay K 8644 (Michna *et al.*, 2003), könnten eine Folge unterschiedlicher Kombinationen von $Ca_v\alpha_1$ - und $Ca_v\beta$ -Untereinheiten sein. Mit der entwicklungsabhängigen Regulation der Strom-Amplitude in HZ (Marcotti

& Kros, 1999) könnte ebenfalls die Anwesenheit verschiedener $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten verbunden sein.

Um mögliche Kandidaten für die Kombination der $\text{Ca}_v\alpha 1$ -Untereinheit mit einer spezifischen $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit in den Sinneszellen des Cortischen Organs zu identifizieren, wurde mRNA aus dem Cortischen Organ und aus isolierten neonatalen äußeren und inneren HZ sowie für Positivkontrollen aus Herzgewebe und aus dem Cortex der Maus gewonnen und die entsprechende cDNA synthetisiert. Zur Überprüfung wurde die cDNA stets auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) getestet. Hierbei wurden Fragmente von 558 bp amplifiziert. Für die Gewinnung HZ-Typ-spezifischer cDNA wurde die mRNA von nur 10-30 ÄHZ bzw. IHZ verwendet. Aufgrund des hohen Aufwands für die Gewinnung von ÄHZ und IHZ enthielten die in der PCR verwendeten Proben oft nur das Material aus 5-15 Zellen als Matrize, was sich auf die Detektierbarkeit von Banden negativ auswirkte. Meist konnten $\text{Ca}_v\beta$ -spezifische Amplifikate nur nach verschachtelter (*nested*) PCR detektiert werden. Die Aufreinigung des 1. PCR-Produktes vor dem Einsetzen in die 2. PCR verbesserte ebenfalls die Qualität der Ergebnisse.

Spezifische Transkripte für alle 4 $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten konnten zunächst in der cDNA des Cortischen Organs sowie von Hirngewebe der Maus nachgewiesen werden (Abb. 13 C und D). Die Primer wurden so gewählt, dass alle bekannten Splice-Varianten abgedeckt wurden. Die Fragmente der verschachtelten PCR wiesen die erwarteten Basenpaarlängen von 417 bp ($\text{Ca}_v\beta 1$), 704 bp ($\text{Ca}_v\beta 2$), 580 bp ($\text{Ca}_v\beta 3$) und 872 bp ($\text{Ca}_v\beta 4$) auf und konnten nach Auftrennung des Produkts über Gel-Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die PCR der cDNA des Cortischen Organs mit $\text{Ca}_v\beta 1$ spezifischen Primern erzeugte 2 starke Banden unterschiedlicher Größe (Abb. 13 C), die anhand ihrer Basenpaar (bp) -Längen den ~ 550 bp und ~ 400 bp Banden von Green et al. (Green *et al.*, 1996) zugeordnet wurden. Ein sehr schwaches Signal wurde von einem Fragment von ~ 700 bp Länge erzeugt, das auch in den Analysen von Green et al. (1996) auftrat. Offensichtlich liegen im Cortischen Organ tatsächlich unterschiedliche Splice-Varianten von $\text{Ca}_v\beta 1$ vor, die jedoch nicht näher untersucht wurden. Ziel

war es, das Vorhandensein der 4 $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten in den HZ zu klären. Außerdem tauchte die Aufspaltung der $\text{Ca}_v\beta 1$ -spezifischen Banden in unterschiedliche Fragmente bei der Charakterisierung der HZ cDNA nicht auf, hier wurde jeweils nur das 417 bp-Fragment amplifiziert (Abb. 13A und B).

Obwohl die Qualität der cDNA stets durch die Amplifikation GAPD-spezifischer Fragmente überprüft wurde, ergab die $\text{Ca}_v\beta$ -spezifische PCR in HZ nicht immer einheitliche Ergebnisse. In neonatalen ÄHZ wurde mRNA aller 4 β -Untereinheiten detektiert (Abb. 13A). Der Nachweis von $\text{Ca}_v\beta 2$ und $\text{Ca}_v\beta 3$ gelang hierbei in allen Proben. Die Untereinheiten $\text{Ca}_v\beta 1$ und $\text{Ca}_v\beta 4$ dagegen konnten nicht in allen Versuchen gezeigt werden.

In cDNA von neonatalen IHZ ließen sich die Untereinheiten $\text{Ca}_v\beta 2$ und $\text{Ca}_v\beta 3$ konsistent nachweisen (Abb. 13B). Die Amplifikation von $\text{Ca}_v\beta 1$ erzeugte oft nur schwache Signale und $\text{Ca}_v\beta 4$ konnte nur äußerst selten detektiert werden. Der konsistente Nachweis von $\text{Ca}_v\beta 2$ mRNA im Cortischen Organ, in ÄHZ und IHZ steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von (Green *et al.*, 1996), die diese β -Untereinheit in der Cochlea der Maus nicht nachweisen konnten.

3.3.2. Biophysikalische Eigenschaften der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in Haarsinneszellen von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen

Die widersprüchlichen Resultate der RT-PCR lieferten kein eindeutiges Verteilungsmuster der β -Untereinheiten in äußeren und inneren HZ. Da uns transgene Mausmodelle für $\text{Ca}_v\beta 3$ und $\text{Ca}_v\beta 4$ zur Verfügung standen (M. Freichel, V. Flockerzi, Homburg/Saar) konnten wir diese nutzen, um die Rolle der akzessorischen Untereinheiten $\text{Ca}_v\beta 3$ und $\text{Ca}_v\beta 4$ und deren möglichen Einfluss auf die Feinmodulation der elektrophysiologischen Eigenschaften des $\text{Ca}_v 1.3$ in HZ zu analysieren.

Bei den Mausstämmen handelte es sich zum einen um eine Maus mit konstitutiver Gendeletion von $\text{Ca}_v\beta 3$ ($\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$). Als Kontrolle diente ein Stamm mit demselben genetischen Hintergrund (SvJ 129). Zum anderen wurde ein Stamm mit einer Spontanmutation im $\text{Ca}_v\beta 4$ -Gen verwendet, die zu einem 4 bp-Einschub und zur

Verschiebung des Leserasters führt. Diese Mäuse ($\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$) sind demnach einem konstitutiven „*knock out*“-Modell für $\text{Ca}_v\beta 4$ vergleichbar. Da dieser Mausstamm nur heterozygot züchtete, dienten homozygote Wurfgeschwister ($\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$) als Kontrolle.

Die Hörleistung der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse (P21) und der jeweiligen Kontrolltiere, die anhand der auditorisch evozierte Hirnstammpotentiale (ABR) und Messungen der Distorsionspunkte otoakustischer Emissionen (DPOAE) beurteilt wurde, war nicht eingeschränkt (nicht publizierte Daten, Lukas Rüttiger). Um die Auswirkungen der fehlenden β -Untereinheit auf die Feinmodulation der Ca^{2+} -Kanal-Ströme zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Messungen an neonatalen (P4-P7) und murenen (P19-P22) inneren und neonatalen (P1-P7) äußeren HZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse und den zugehörigen Kontrolltieren (Wildtyp, WT) durchgeführt. Aufgrund der mit der Reifung äußerer HZ einsetzenden Elektromotilität sowie der veränderten Membraneigenschaften, die erfahrungsgemäß (siehe 3.2.1.) große Schwierigkeiten beim Messen der kleinen und empfindlichen Ca^{2+} -Kanal-Ströme bereiten, beschränken sich die elektrophysiologischen Messungen hierbei nur auf neonatale ÄHZ.

Abbildung 14A und F (IHZ) und Abbildung 15A (ÄHZ) zeigen ausgewählte Barium-Stromspuren der HZ von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen mit den zugehörigen Kontrollen. Es sind hier nur diejenigen Stromspuren gezeigt, die durch Depolarisationen auf Membranpotentiale hervorgerufen wurden, die der halbmaximalen und der maximalen Aktivierung entsprachen. Die korrespondierenden Strom-Spannungs-Kurven, die sich aus der Mittelung des Stroms während der letzten Millisekunde des Depolarisierungsschrittes gegen die entsprechend angelegte Spannung (mV) ergaben, zeigten den für spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle typischen glockenförmigen Verlauf (vgl. auch (Platzer *et al.*, 2000; Michna *et al.*, 2003; Knirsch *et al.*, 2007)). In Abb. 14B, D, G, I (IHZ) und Abb. 15B und E (ÄHZ) sind jeweils die gemittelten Strom-Spannungskurven des I_{Ba} innerer und äußerer Haarsinneszellen der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$, $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ - und Kontrolltiere dargestellt. In beiden Haarzelltypen aktivierte I_{Ba} ab einer Depolarisation vom Haltepotential (-80 mV) auf -50 mV und

erreichte seine maximale Amplitude bei ~ 0 mV (V_{\max}) in inneren und ~ -2 mV in äußeren Haarsinneszellen.

3.3.2.1. Elektrophysiologische Messungen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in inneren Haarsinneszellen von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen⁶

Die Maximalamplituden des I_{Ba} innerer Haarsinneszellen von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen zeigten sowohl in neonatalen (-321 ± 106 pA; $n = 9$) als auch in maturen (-238 ± 56 pA; $n = 4$) Altersstadien keinen signifikanten Unterschied zu denen der jeweiligen Kontrolltiere (neonatal -396 ± 231 pA; $n = 7$; matur -240 ± 109 pA; $n = 3$) (Abb. 14C und E). In neonatalen $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen erreichte der I_{Ba} in IHZ mit -408 ± 72 pA ($n = 7$) vergleichbare Werte wie in den Kontrolltieren (-342 ± 104 pA; $n = 8$) (Abb. 14H). Auch im ausgereiften Stadium wies der maximale I_{Ba} innerer Haarsinneszellen keine signifikanten Unterschiede zwischen $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen (-213 ± 78 pA; $n = 12$) und den jeweiligen Kontrollen (-284 ± 78 pA; $n = 13$) auf (Abb. 14K). Eine Reduktion des I_{Ba} innerer HZ mit zunehmendem Alter (Johnson *et al.*, 2005) konnte in den WT-Zellen nicht beobachtet werden, wohl aber in den „knock out“-Zellen. In reifen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäuse war der I_{Ba} signifikant kleiner ($p < 0.05$) als in neonatalen Altersstadien, ebenso wiesen reife IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse signifikant ($p < 0.01$) kleinere I_{Ba} Amplituden auf als in entsprechend jüngeren Stadien.

Die Membrankapazität von IHZ, welche auch ein Maß für die Zellgröße darstellt, nimmt mit dem Alter leicht zu (Brandt *et al.*, 2003). So wurden zwischen neonatalen und reifen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -, $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und der $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ -Mäuse jeweils signifikant unterschiedliche Kapazitäten gemessen. Lediglich die Membrankapazitäten innerer $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -HZ zeigten bereits im neonatalen Stadium relativ große Werte, die mit der Reifung nicht weiter zunahmten. (Abb. 16A). Vergleich man die Kapazitäten der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -HZ mit denen der Kontrolltiere, so waren hier nur die Werte der neonatalen $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -HZ (6.1 ± 0.5 pF; $n = 7$)

⁶ An IHZ gewonnene Daten von Stephanie Kuhn

signifikant kleiner ($p < 0.01$) als die der neonatalen Kontrollen (8.4 ± 1.7 pF; $n = 9$).

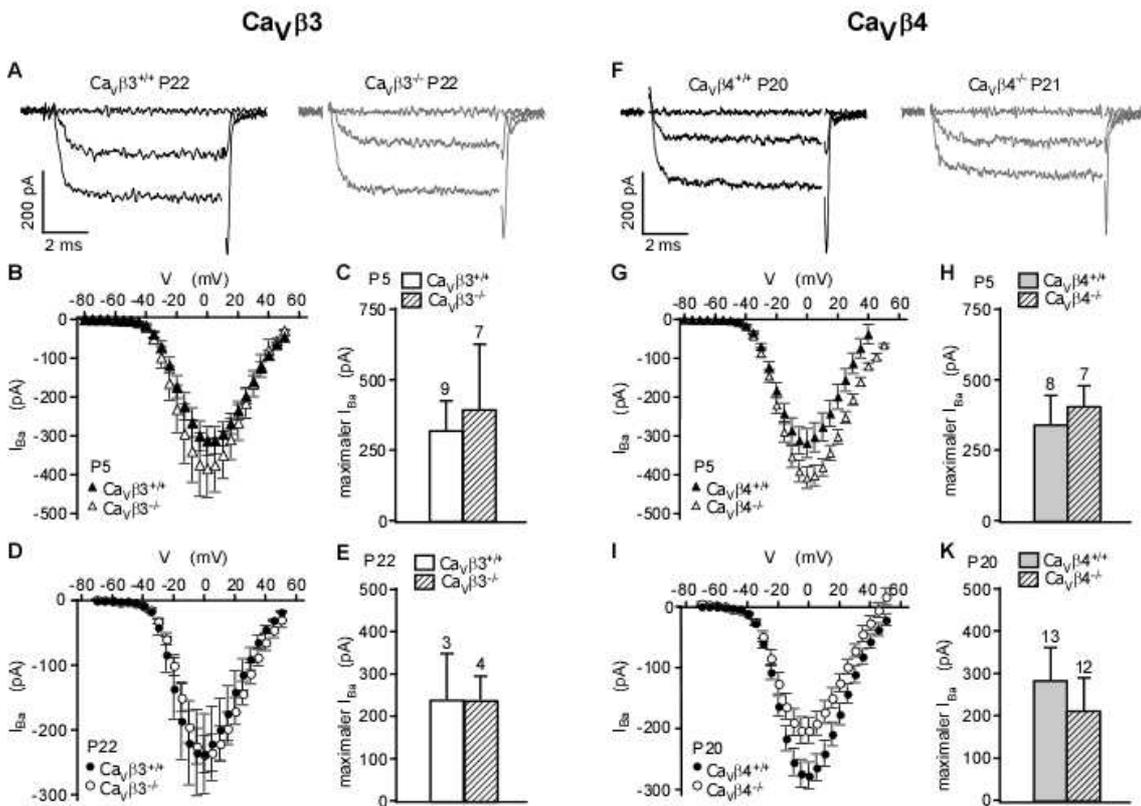


Abbildung 14: Ca^{2+} -Kanal-Ströme neonataler und maturaer IHZ von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (WT). **A**, ausgewählte Stromspuren (I_{Ba}) maturaer IHZ von WT- (schwarz) und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen (grau), hervorgerufen durch Depolarisationen von einem Haltepotential von -80 mV auf $V_{1/2}$ und V_{max} . **B**, mittlere Strom-Spannungs-Kurven \pm S.E.M. für den I_{Ba} in IHZ neonataler WT- ($n = 9$) und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen ($n = 7$); Haltepotential: -70 mV. **C**, Maximalstrom (I_{Ba}) \pm S.D. in IHZ neonataler WT- und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen. **D**, gemittelte Strom-Spannungs-Kurven \pm S.E.M. für den I_{Ba} in IHZ maturaer WT- ($n = 3$) und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen ($n = 4$). **E**, Maximalstrom (I_{Ba}) \pm S.D. in IHZ maturaer WT- und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen. **F**, ausgewählte Stromspuren (I_{Ba}) in IHZ maturaer WT- (schwarz) und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen (grau), hervorgerufen durch Depolarisationen von einem Haltepotential von -80 mV auf $V_{1/2}$ und V_{max} . **G**, mittlere Strom-Spannungs-Kurven \pm S.E.M. für den I_{Ba} in IHZ neonataler WT- ($n = 8$) und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen ($n = 7$), Haltepotential: -70 mV. **H**, Maximalstrom (I_{Ba}) \pm S.D. in IHZ neonataler $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ - und WT-Mäusen. **I**, mittlere Strom-Spannungs-Kurven \pm S.E.M. für den I_{Ba} in IHZ maturaer WT- ($n = 13$) und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen ($n = 12$). **K**, Maximalstrom (I_{Ba}) \pm S.D. in IHZ maturaer WT- und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen.

In ausgereiften $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen und auch in neonatalen und reifen $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen hatte die Abwesenheit dieser beiden β -Untereinheiten keinen Einfluss auf die Kapazität der HZ. Das Anpassen der IV-Kurven mit einer Boltzmann-Funktion 2. Ordnung nach Goldman-Hodgkin-Katz (Gleichung (2)) unter Berücksichtigung der sehr verschiedenen Ba^{2+} -Konzentrationen in

Extrazellulär- und Intrazellulärlösung ergab nur in den neonatalen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse eine signifikante ($p < 0.05$) Verschiebung der halbmaximalen Spannung $V_{1/2}$ auf positivere Werte (-9.6 ± 5.4 mV ($n = 7$)) (Abb. 16B). $V_{1/2}$ des I_{Ba} der Kontrolltiere lag durchschnittlich bei -15.7 ± 5.3 mV ($n=9$).

Auch der Steigungsfaktor k (mV) der Boltzmann-Funktion, ein Parameter, der die Empfindlichkeit des Kanals gegenüber Spannungsänderungen beschreibt, war in neonatalen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse mit 13.9 ± 1.0 mV ($n = 7$) signifikant ($p < 0.0001$) größer als in den neonatalen Kontrollen (11.4 ± 1.1 ; $n = 9$) (Abb. 16C).

Die Abwesenheit von $\text{Ca}_v\beta 4$ hat also eine geringere Spannungssensitivität des Kanals zur Folge. Sowohl in den maturen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse als auch in den IHZ von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen hatte das Fehlen von $\beta 3$ oder $\beta 4$ keinen Einfluss auf den Faktor k . Interessanterweise war k in reifen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - sowie der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse gegenüber den neonatalen Stadien signifikant erhöht (Abb. 16C), was bedeutet, dass die Aktivierungskurve als Funktion der Spannung weniger steil verläuft.

3.3.2.2. Elektrophysiologische Messungen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in äußeren Haarsinneszellen von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen

ÄHZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäuse wiesen mit Maximalamplituden von durchschnittlich -69 ± 36 pA ($n = 9$) im Vergleich zu -115 ± 61 pA ($n = 7$) der $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ -Mäuse eine signifikant reduzierte I_{Ba} -Amplitude auf (Abb. 15C). Hingegen war der Maximalstrom in ÄHZ von $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu ihren Kontrollen unverändert (Abb. 15F).

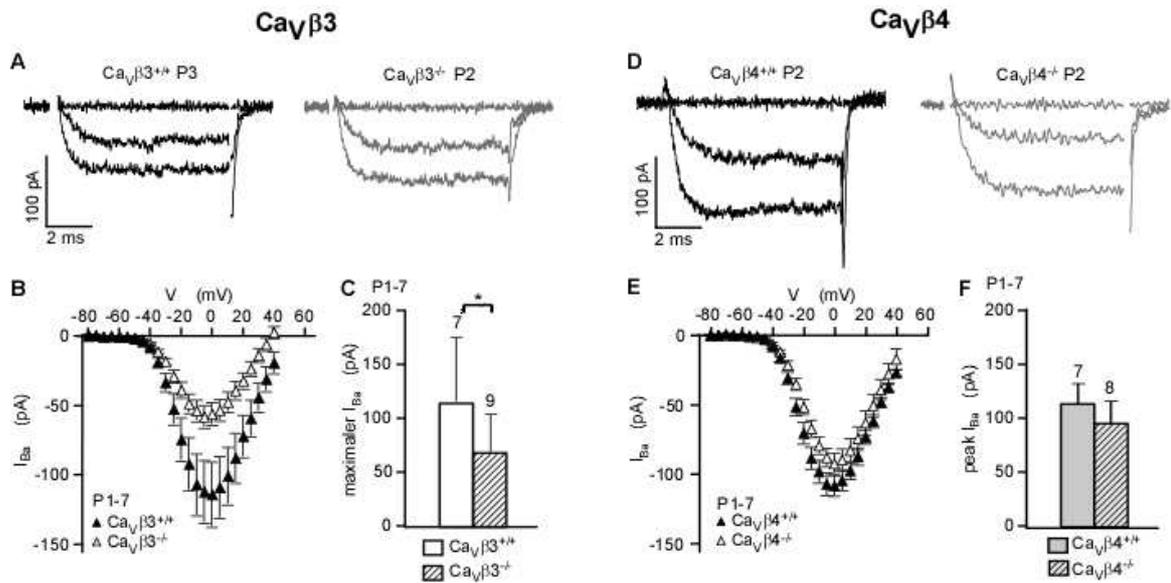


Abbildung 15: Ca^{2+} -Kanal-Ströme neonataler ÄHZ von $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. **A** ausgewählte Stromspuren (I_{Ba}) neonataler ÄHZ von WT- (schwarz) und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäusen (grau), hervorgerufen durch Depolarisationen von einem Haltepotential von -80 mV auf $V_{1/2}$ und V_{max} . **B** mittlere Strom-Spannungskurven \pm S.E.M. für den I_{Ba} in ÄHZ neonataler $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ ($n = 9$) und WT-Mäuse ($n = 7$). **C** Maximalstrom (I_{Ba}) \pm S.D. in ÄHZ neonataler WT- und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäuse. **D** ausgewählte Stromspuren (I_{Ba}) von ÄHZ neonataler WT-(schwarz) und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse (grau), hervorgerufen durch Depolarisationen von einem Haltepotential von -80 mV auf $V_{1/2}$ und V_{max} . **E** mittlere Strom-Spannungskurven \pm S.E.M. für den I_{Ba} in ÄHZ neonataler WT- ($n = 7$) und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse ($n = 8$). **F** Maximalstrom (I_{Ba}) \pm S.D. von ÄHZ neonataler WT- und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse. * ($p < 0.05$) statistisch signifikanter Unterschied.

Die Kapazität C und die halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ war in ÄHZ weder durch das Fehlen der $\beta 3$ - noch der $\beta 4$ -Untereinheit beeinflusst (Abb. 16A und B) und entsprach hier sowohl in den „knock out“-Zellen als auch in den Kontrollen den Werten aus (Michna *et al.*, 2003) (Tabelle 1). Interessanterweise waren die Kapazitäten der WT-Kontrollen ($\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ und $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$) signifikant unterschiedlich (Abb. 16A und Tabelle 3).

In ÄHZ hatte jedoch sowohl das Fehlen der $\beta 3$ - als auch der $\beta 4$ -Untereinheit eine signifikante Verringerung des Steigungsfaktors k zur Folge (Abb. 16C). So ergab der Boltzmann-Fit nach Gleichung (2) für den I_{Ba} in ÄHZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäuse für k einen durchschnittlichen Wert von 12.3 ± 0.9 mV ($n = 8$), in ÄHZ der Kontrollen betrug k 13.4 ± 0.7 mV ($n = 7$). Entsprechend erhielt man in ÄHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse ein durchschnittliches k von 12.9 ± 1.0 mV ($n = 8$), in ÄHZ der

Ergebnisse

Ca_vβ4^{+/+} -Mäuse hingegen einen signifikant höheren Wert (13.8 ± 0.3 ; n = 8) (Abb. 16C).

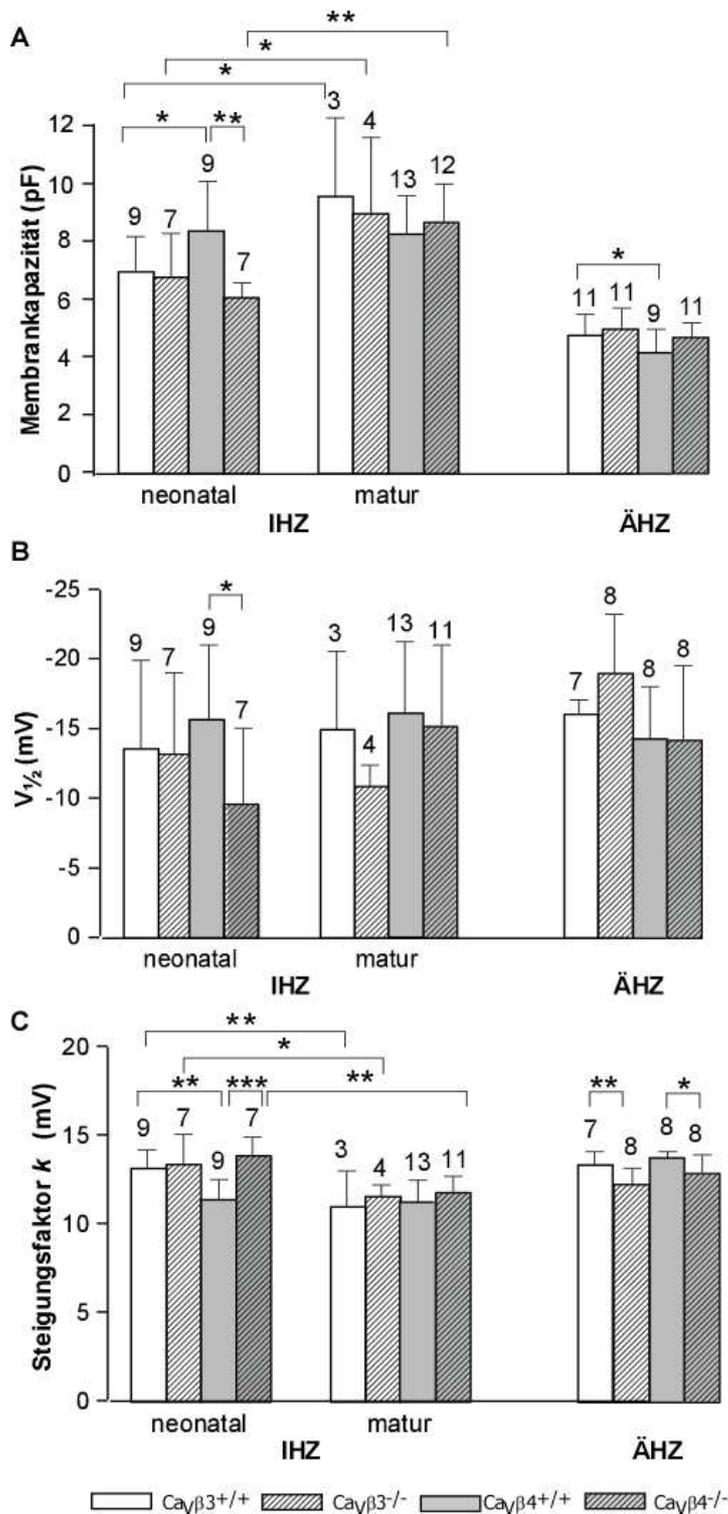


Abbildung 16: Einfluss des Fehlens der β3- oder β4-Untereinheit auf die Membrankapazität und Eigenschaften des Ca_v1.3-Ca²⁺-Kanals in HZ. **A**, Membrankapazitäten neonataler und maturer IHZ sowie neonataler ÄHZ der Ca_vβ3^{-/-}, Ca_vβ4^{-/-} sowie WT -Mäuse. **B-C**: Halbmaximale Aktivierung ($V_{1/2}$; B) und Steigungsfaktor (k ; C) für neonatale und mature IHZ, sowie neonatale ÄHZ der Ca_vβ3^{-/-}, Ca_vβ4^{-/-} sowie WT -Mäuse. $V_{1/2}$ und k wurden durch Anpassen der Daten mit einer Boltzmann-Funktion 2. Ordnung (Gleichung (2)) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ statistisch signifikanter Unterschied.

3.3.2.3. Aktivierung und Inaktivierung der Ca²⁺-Kanal-Ströme

Um den Einfluss der β 3- und β 4-Untereinheit auf die biophysikalischen Eigenschaften des Ca²⁺-Kanals in den HZ weiter aufzuklären, wurde sowohl die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals auch seine spannungsabhängige Inaktivierung untersucht.

Durch Anfitten der Kinetik der Barium-Stromspuren im Bereich der ersten Millisekunden nach Depolarisationsbeginn erhielt man die Zeitkonstante τ_{act} , die ein Maß für die Öffnungsgeschwindigkeit des Kanals darstellt. Je kleiner τ_{act} , desto schneller reagiert der Kanal auf eine Spannungsänderung. Die Stromspuren wurden mit einem Exponential-Fit 2. Ordnung unter Berücksichtigung der treibenden Spannung nach Goldman-Hodgkin-Katz (Gleichung (3) und (4)) angefittet. In Abb. 17 sind die Zeitkonstanten τ_{act} des I_{Ba} in inneren (Abb. 17A-F) und äußeren HZ (Abb. 17E und F) der Ca_v β 3^{-/-} - und Ca_v β 4^{-/-} -Mäuse und ihrer Kontrollen gegen die jeweils angelegte Spannung aufgetragen. Die Aktivierung der Ca²⁺-Kanäle verlief in neonatalen IHZ in Abwesenheit sowohl der β 3- (Abb. 17A) als auch der β 4-Untereinheit (Abb. 17B) signifikant rascher als in den Kontrollzellen. Die Aktivierungskinetik in reifen IHZ dagegen wurde durch das Fehlen der β 3-, bzw. der β 4-Untereinheit nicht beeinflusst (Abb. 17C und D).

In ÄHZ wurde die Aktivierung des Kanals durch die Abwesenheit der β 3-Untereinheit nicht verändert (Abb. 17E). Das Fehlen der β 4-Untereinheit in ÄHZ reduzierte jedoch die Aktivierungsgeschwindigkeit signifikant, was sich in größeren τ_{act} -Werten widerspiegelte (Abb. 17F).

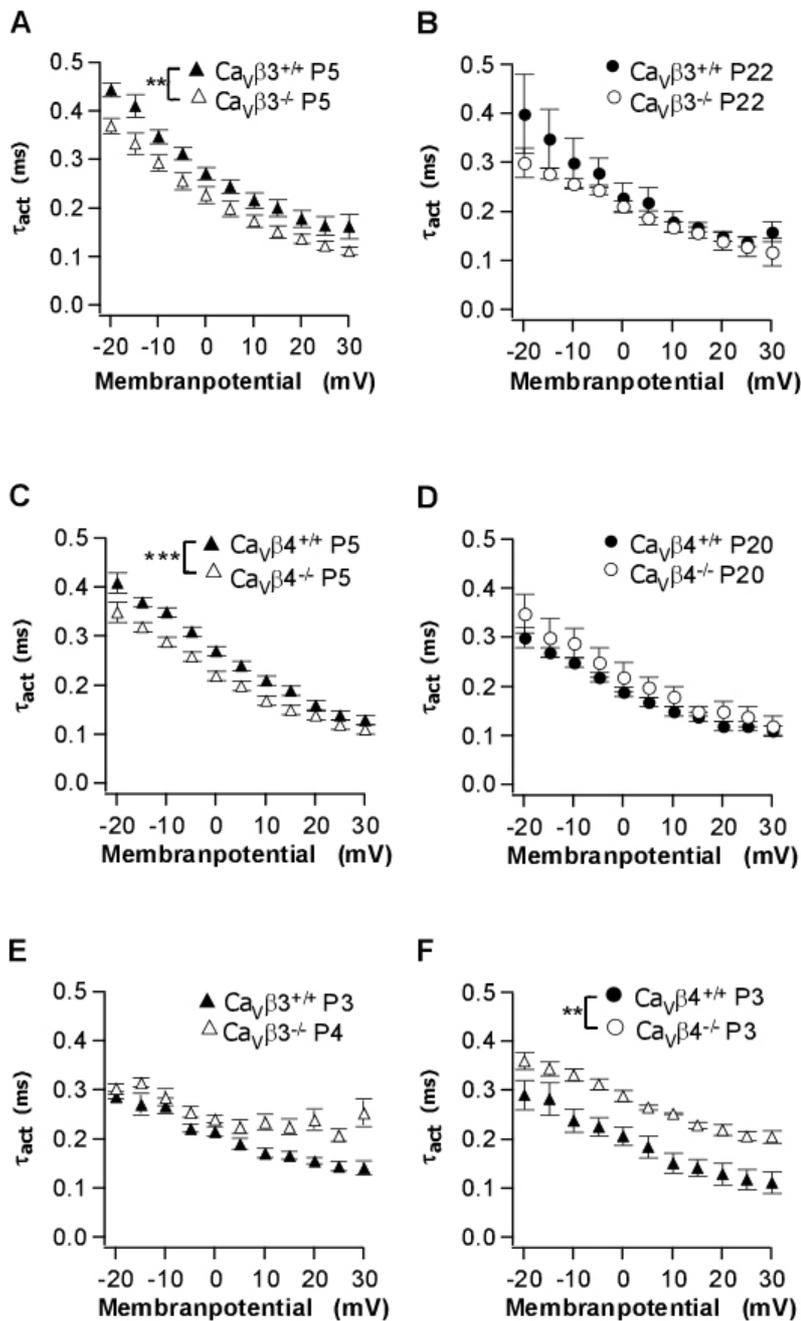


Abbildung 17: Aktivierungskinetik der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in neonatalen und murenen IHZ und neonatalen ÄHZ der $Ca_v\beta3^{-/-}$, $Ca_v\beta4^{-/-}$ - sowie entsprechender WT-Mäuse.

A-F: Aktivierungszeitkonstanten τ_{act} (ms) des I_{Ba} neonataler (A) und murener (B) $Ca_v\beta3^{-/-}$ IHZ, neonataler (C) und murener (D) $Ca_v\beta4^{-/-}$ IHZ sowie neonataler $Ca_v\beta3^{-/-}$ (E) und $Ca_v\beta4^{-/-}$ (F) ÄHZ und entsprechender WT-Kontrollen in Abhängigkeit vom Membranpotential. Fit nach Gleichung (3) und (4). Die Aktivierungskurven als Funktion des Membranpotentials waren für A, C und F signifikant unterschiedlich in. Gen-Deletion der $Ca_v\beta3$ oder $Ca_v\beta4$ -Untereinheit bewirkte eine Beschleunigung der Stromaktivierung in neonatalen IHZ (A, C), während das Fehlen der $Ca_v\beta4$ -Untereinheit in neonatalen ÄHZ die Aktivierung verlangsamt (F). (neonatale IHZ $Ca_v\beta3^{-/-}$, n = 7; neonatale $Ca_v\beta3^{+/+}$ -IHZ, n = 9; mature $Ca_v\beta3^{-/-}$ -IHZ, n = 4; mature $Ca_v\beta3^{+/+}$ -IHZ, n = 3; neonatale $Ca_v\beta4^{-/-}$ -IHZ, n = 6; neonatale $Ca_v\beta4^{+/+}$ -IHZ, n = 9; mature $Ca_v\beta4^{-/-}$ -IHZ, n = 7; mature $Ca_v\beta4^{+/+}$ -IHZ, n = 10; neonatale $Ca_v\beta3^{-/-}$ -ÄHZ, n = 5; neonatale $Ca_v\beta3^{+/+}$ -ÄHZ, n = 4; neonatale $Ca_v\beta4^{-/-}$ -ÄHZ, n = 6; neonatale $Ca_v\beta4^{+/+}$ -ÄHZ, n = 6). p<0.05; ** p<0.01; ***p< 0.0001

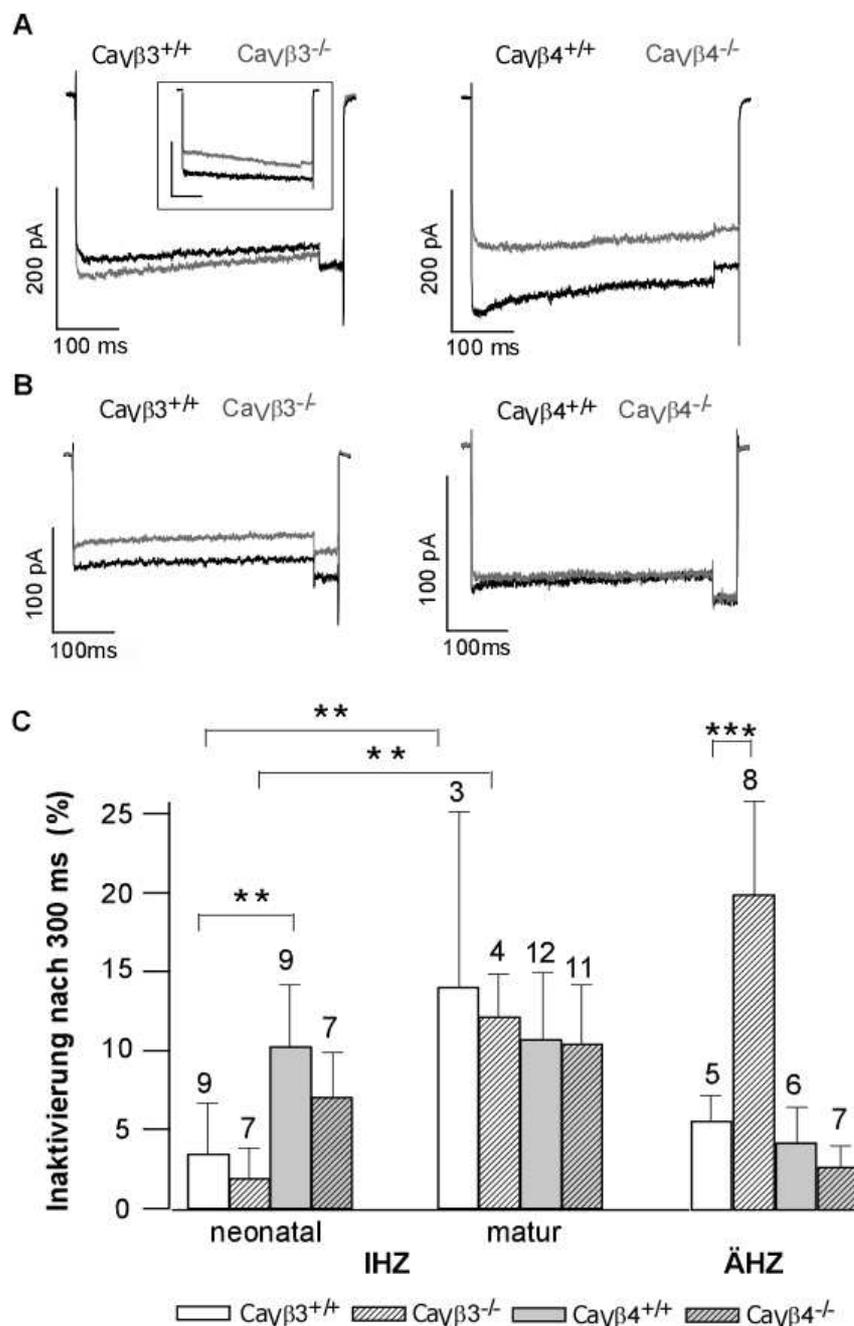


Abbildung 18: Spannungsabhängige Inaktivierung des I_{Ba} in IHZ und ÄHZ von $Ca_v\beta 3^{-/-}$, $Ca_v\beta 4^{-/-}$ - und WT-Mäusen. **A, Ausgewählte Ba^{2+} -Stromspuren, hervorgerufen durch eine 400 ms andauernde Depolarisation von einem Haltepotential von -70 mV (-80 mV) auf $V_{max} + 10$ mV. Links: I_{Ba} je einer reifen WT- (schwarz) und $Ca_v\beta 3^{-/-}$ -IHZ (grau), (Kasten: neonatale IHZ). Rechts: I_{Ba} je einer murenen WT- (schwarz) und $Ca_v\beta 4^{-/-}$ -IHZ (grau). **B**, Ausgewählte Ba^{2+} -Stromspuren, hervorgerufen durch eine 400 ms andauernde Depolarisation von einem Haltepotential von -80 mV auf $V_{max} + 10$ mV. Links: I_{Ba} je einer neonatalen WT- (schwarz) und $Ca_v\beta 3^{-/-}$ -ÄHZ (grau), Rechts: I_{Ba} je einer neonatalen WT- (schwarz) und $Ca_v\beta 4^{-/-}$ -ÄHZ (grau). **C**, Grad der Inaktivierung (%) des I_{Ba} 300 ms nach Erreichen des Maximalwerts für den Strom, hervorgerufen durch Depolarisation auf $V_{max} + 10$ mV in neonatalen und reifen IHZ, sowie in neonatalen ÄHZ. Fit nach Gleichung (5). Die Inaktivierung war in reifen IHZ sowohl der $Ca_v\beta 3^{-/-}$ - als auch der $Ca_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den neonatalen HZ signifikant erhöht. In ÄHZ wurde die Inaktivierung durch den Mangel an $Ca_v\beta 3$ signifikant verstärkt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ statistisch signifikanter Unterschied.**

Die spannungsabhängige Inaktivierung (VDI) des Ca^{2+} -Kanals ist in HZ nur schwach ausgeprägt ($3.6 \pm 1.5 \%$ in neonatalen ÄHZ (Michna *et al.*, 2003) ($11.1 \pm 4.8 \%$ in neonatalen IHZ (Platzer *et al.*, 2000)).

Anhand langer Depolarisationsprotokolle wurde der Grad der Inaktivierung (%) 300 ms nach Erreichen des Maximalwerts für die Stromspur ermittelt, die durch Depolarisation auf $V_{\text{max}}+10$ mV hervorgerufen wurde.

Solche Stromspuren sind in Abb. 18A und B für reife innere und neonatale äußere HZ mit und ohne $\beta 3$ - bzw. $\beta 4$ -Untereinheit gezeigt. Das Fehlen der $\beta 3$ -, bzw. der $\beta 4$ -Untereinheit hatte sowohl in neonatalen als auch in maturen Stadien innerer HZ keinen Einfluss auf die spannungsabhängige Inaktivierung (Abb. 18C).

Der I_{Ba} in neonatalen IHZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ -Mäuse wies eine geringe ($\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$: $3.4 \pm 3.2 \%$; $n = 9$; $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$: $1.9 \pm 1.9 \%$; $n = 7$), während der Reifung signifikant ($p < 0.01$) stärker ausgeprägte Inaktivierung auf (Abb. 18C ; $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$: $14.0 \pm 11.1 \%$; $n = 3$; $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$: $12.2 \pm 2.7 \%$; $n = 4$). Der I_{Ba} neonataler Stadien zeigte z.T. bei anhaltenden Depolarisationen keine Inaktivierung, sondern wies sogar eine zusätzliche aktivierende Komponente auf (Abb. 18A, kleines Kästchen). Bemerkenswerterweise inaktivierte der I_{Ba} in IHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -Mäuse ($10.2 \pm 3.9 \%$; $n = 9$) in neonatalen Stadien signifikant stärker ($p < 0.01$) als bei $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ -Mäusen ($3.4 \pm 3.2 \%$; $n = 9$; Tabelle 3). Diese Differenz zwischen beiden Kontrollstämmen existierte in maturen Stadien innerer HZ nicht mehr ($\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$: $14.0 \pm 11.1 \%$; $n = 3$; $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$: $10.7 \pm 4.2 \%$; $n = 12$). In ÄHZ hatte das Fehlen der $\beta 3$ -Untereinheit eine signifikante Verstärkung ($p < 0.0001$) der spannungsabhängigen Inaktivierung der Calcium-Kanäle zur Folge ($\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$: $4.7 \pm 1.6 \%$; $n = 5$; $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$: $19.92 \pm 5.9 \%$; $n = 8$), $\text{Ca}_v\beta 4$ hingegen änderte die Inaktivierung des I_{Ba} in ÄHZ nicht ($\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$: $4.2 \pm 2.2 \%$; $n = 6$; $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$: $2.7 \pm 1.3 \%$; $n = 8$; Abb. 18C).

Tabelle 2: Überblick über die signifikanten Effekte des Fehlens von $\text{Ca}_v\beta 3$ und $\text{Ca}_v\beta 4$ auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in inneren und äußeren Haarsinneszellen. Der Verlust von $\text{Ca}_v\beta 3$ führte in neonatalen IHZ zu signifikant schnelleren Aktivierungszeitkonstanten (τ_{Akt}) und in neonatalen ÄHZ zu verringerten Maximalstromamplituden (I_{max}), einer Verschiebung des Steigungsfaktors (k) und einer Verstärkung der Inaktivierung (Inakt.). Der Mangel an $\text{Ca}_v\beta 4$ hatte veränderte Membrankapazitäten (C), eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung und des Steigungsfaktors (k), sowie eine beschleunigte Aktivierung des Stroms in IHZ zur Folge. In ÄHZ wurde durch das Fehlen von $\text{Ca}_v\beta 4$ der Steigungsfaktor (k) verschoben und die Aktivierungskinetik des Stroms verlangsamt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ statistisch signifikanter Unterschied.

| | HZ-Typ (Alter) | I_{max} | C | $V_{1/2}$ | k | τ_{Akt} | Inakt. |
|---|----------------|------------------|-----|-----------|-----|---------------------|--------|
| $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ vs $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ | IHZ (P4-P7) | | | | | ** | |
| | IHZ (P19-P22) | | | | | | |
| | ÄHZ (P1-P7) | * | | | ** | | *** |
| $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ vs $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ | IHZ (P4-P7) | | ** | * | *** | *** | |
| | IHZ (P19-P22) | | | | | | |
| | ÄHZ (P1-P7) | | | | * | ** | |

Tabelle 3

Überblick über signifikante Unterschiede zwischen den elektrophysiologischen Eigenschaften von Wildtyp-Haarsinneszellen der $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -Mäuse. Neonatale IHZ der Wildtyp-, $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -Mäuse unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihrer Membrankapazität (C), des Steigungsfaktors (k) und des Grads der Inaktivierung (Inakt.) der Ca^{2+} -Kanal-Ströme. Auch die Membrankapazitäten (C) neonataler ÄHZ der Wildtyp $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -Mäuse waren signifikant unterschiedlich.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

| | HZ-Typ (Alter) | I_{max} | C | $V_{1/2}$ | k | τ_{Akt} | Inakt. |
|---|----------------|------------------|-----|-----------|-----|---------------------|--------|
| $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ vs $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ | IHZ (P4-P7) | | * | | ** | | ** |
| | IHZ (P19-P22) | | | | | | |
| | ÄHZ (P1-P7) | | * | | | | |

4 Diskussion

Im Gegensatz zu den L-Typ-Kanälen (LTCC) $Ca_v1.1$, der exklusiv in der Skelettmuskulatur exprimiert ist, und $Ca_v1.4$, einem bisher nur in der Retina gefundenen Ca^{2+} -Kanal, handelt es sich bei $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ um in vielen Geweben exprimierte Kanäle. Oftmals treten beide Isoformen sogar gemeinsam auf. Beide Kanäle existieren in Photorezeptoren der Retina, in endokrinen Zellen, wie beispielsweise den β -Zellen des Pankreas und in geringer Dichte auch in den Schrittmacherzellen des Herzmuskels (Takimoto *et al.*, 1997; Platzer *et al.*, 2000; Mangoni *et al.*, 2003), glatter Muskulatur (Takimoto *et al.*, 1997) und vielen Neuronen (Hell *et al.*, 1993).

Da bisher kein isoform-spezifischer pharmakologischer Modulator bekannt ist, kann die jeweilige Beteiligung von $Ca_v1.2$ - bzw. $Ca_v1.3$ -Kanälen am gesamten Ca^{2+} -Strom in nativem Gewebe nicht bestimmt werden.

Haarsinneszellen exprimieren als L-Typ-Kanäle ausschließlich $Ca_v1.3$ und weniger als 10 % der Ca^{2+} -Ströme fließen durch andere Kanäle. Sie bilden daher ein gutes Modell, um native isolierte $Ca_v1.3$ -Ströme zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten für Ca^{2+} -Kanal-Ströme in äußeren (ÄHZ) und inneren Haarsinneszellen (IHZ) von Maus und Ratte sowohl neonataler als auch reiferer Stadien erhoben und analysiert. Des Weiteren wurde die Kombination der $Ca_v1.3$ -Kanäle mit spezifischen β -Untereinheiten untersucht.

Die Eigenschaften des nativen Ca^{2+} -Kanal-Stroms wiesen viele Übereinstimmungen mit den Daten von (Koschak *et al.*, 2001; Xu & Lipscombe, 2001) an heterolog isoliert exprimierten $Ca_v1.3$ -Kanälen auf, wie beispielsweise die negative Aktivierung und das Fehlen der spannungsabhängigen Inaktivierung (VDI) des Bariumstroms (I_{Ba}).

4.1. Calcium-Kanal-Ströme in neonatalen äußeren Haarsinneszellen von Maus und Ratte

Die Ströme durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle in neonatalen ÄHZ von Maus und Ratte wiesen große Ähnlichkeiten zu den Ca^{2+} -Kanal-Strömen neonataler IHZ der Maus (Platzer *et al.*, 2000) und auditorischer Haarsinneszellen (HZ) von Huhn (Zidanic & Fuchs, 1995) und Schildkröte (Schnee & Ricci, 2003) auf. Die rasche Kinetik der Aktivierung, das Fehlen einer schnellen Inaktivierung der Ba^{2+} -Ströme, die unvollständige Blockierbarkeit durch den L-Typ Antagonisten Nifedipin, sowie das Verhältnis $I_{\text{Ba}}/I_{\text{Ca}}$ stimmten in äußeren und inneren HZ überein. Daneben bestanden zahlreiche Unterschiede, wie beispielsweise negativere Werte für V_{max} und $V_{1/2}$ in IHZ und größere Werte für die Steilheit der Strom-Spannungs-Kurve in ÄHZ. Auch war I_{Ba} in IHZ sensitiver gegenüber BayK 8644 als in ÄHZ.

Diese Differenzen der Stromeigenschaften in neonatalen ÄHZ und IHZ könnten möglicherweise durch unterschiedliches Splicing der $\alpha 1$ -Untereinheit verursacht oder aber eine Folge differentieller Kombinationen der $\alpha 1$ -Untereinheit mit assoziierender β - oder $\alpha 2\delta$ -Untereinheit bzw. deren Splice-Varianten in beiden Haarzelltypen sein.

Der Hauptunterschied aber bestand in der im Vergleich mit IHZ dreifach niedrigeren Stromdichte in ÄHZ. Bereits in der ersten postnatalen Woche, also deutlich vor Hörbeginn um P12 (Ehret, 1985) kommt es in IHZ zu einer Ca^{2+} -abhängigen Transmitterfreisetzung an afferenten Synapsen (Beutner & Moser, 2001; Glowatzki & Fuchs, 2002). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung sind IHZ noch nicht in der Lage, auf einen akustischen Reiz mit Rezeptorpotentialen zu reagieren, sie zeigen jedoch langsame, von extrazellulärem Ca^{2+} abhängige Spontanoszillationen des Membranpotentials (Kros *et al.*, 1998; Marcotti & Kros, 1999; Marcotti *et al.*, 2003a). Derartige Ca^{2+} -abhängige Aktionspotentiale stellen im sich entwickelnden Nervensystem ein bekanntes Phänomen dar, das für die Feinabstimmung der neuronalen Verschaltung von Bedeutung zu sein scheint. So gehen wir davon aus, dass die durch die Ca^{2+} -Aktionspotentiale hervorgerufene Glutamatfreisetzung am basalen Pol der IHZ zur Reifung und Verfeinerung der

synaptischen Verschaltung sowohl in der Peripherie als auch im zentralen auditorischen Signalweg führt. Außerdem sind die Ca^{2+} -Aktionspotentiale für die Reifung der IHZ selbst wichtig (Brandt *et al.*, 2003). Oszillationen des Membranpotentials, ähnlich den Ca^{2+} -Aktionspotentialen der IHZ, konnten in ÄHZ nur schwer ausgelöst werden. Hierfür war eine Injektion von mindestens 40 pA notwendig (Marcotti & Kros, 1999), was möglicherweise mit der *in vitro* gemessenen dreifach niedrigeren I_{Ba} -Stromdichte in neonatalen ÄHZ zusammenhängt. Offen bleibt jedoch, ob dagegen *in vivo* Mechanismen existieren, die die Zelle bis hin zu Oszillationen auslösenden Membranpotentialen depolarisieren. Falls diese Ca^{2+} -Aktionspotentiale tatsächlich auch in ÄHZ auftreten, so könnten diese bei der finalen Differenzierung der ÄHZ und der Bildung synaptischer Verbindungen eine Rolle spielen. Während der ersten beiden postnatalen Wochen etablieren sich die Afferenzen und Efferenzen an den ÄHZ, wobei Kollaterale der Afferenzen vom Typ-I am Tag der Geburt an ÄHZ ausgebildet sind, die sich anschließend zurückziehen. Gleichzeitig erfolgt die Innervierung durch Typ-II-Afferenzen (Echteler, 1992). Die efferente Innervierung durch das mediale olivocochleäre Bündel entsteht zwischen P3 und P10 (Sobkowicz *et al.*, 1982; Simmons, 2002). In zahlreichen Zelltypen und Geweben nehmen Ca^{2+} -Ströme durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) bei der Regulation der Genexpression eine wichtige Funktion ein. Möglicherweise gilt dies auch für die Ca^{2+} -Kanäle in neonatalen ÄHZ. Die Tatsache, dass das Fehlen des Ca^{2+} -Einstroms in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen nicht nur zu Defiziten in IHZ führt (Platzer *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2003), sondern auch in ÄHZ die Entwicklung zum reifen Phänotyp unterbindet und zum Zeitpunkt des Hörbeginns eine frühzeitige Degeneration der ÄHZ in diesen Mäusen bewirkt (Platzer *et al.*, 2000; Glueckert *et al.*, 2003; Dou *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2006), könnte ein Hinweis darauf sein. Offen blieb zunächst die Frage, ob reife ÄHZ ebenfalls über funktionelle Ca^{2+} -Kanäle verfügen und wenn ja, wozu.

4.2. Calcium-Kanal-Ströme in reifen äußeren Haarsinneszellen von Maus und Ratte

Im ersten Teil dieser Arbeit (Michna *et al.*, 2003) konnten wir zeigen, dass in dem Zeitraum, in dem ÄHZ ihren maturen Phänotyp entwickeln und den schnellen K^+ -Strom $I_{K,n}$ (Marcotti & Kros, 1999) sowie das Motorprotein Prestin (Weber *et al.*, 2002) exprimieren, die Barium-Stromdichte um 65 % abfällt. (Chen *et al.*, 1995) und (Nakagawa *et al.*, 1991) wiesen nach, dass ÄHZ von Meerschweinchen, die bereits am Tag der Geburt über ein ausgereiftes Cortisches Organ verfügen, ebenfalls L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle besitzen. Wir vermuteten daher, dass auch in ausgereiften ÄHZ der Maus LTCC eine Rolle spielen. Da apikale und mediale ÄHZ von $Ca_v1.3^{-/-}$ -Mäusen im Laufe des Reifeprozesses degenerieren (Engel *et al.*, 2006), stehen sie nicht als geeignetes Modell für die Aufklärung der Rolle von LTCC in reifen Stadien zur Verfügung. Jedoch konnten wir in ÄHZ von Wildtypmäusen auch nach Einsetzen der Elektromotilität und somit nach Erreichen des reifen Phänotyps Ca^{2+} -Kanal-Ströme nachweisen. Zudem analysierten wir die elektrophysiologischen Eigenschaften der neonatalen und reifen Barium-Ströme in HZ der Ratte. Neonatale Barium-Ströme in inneren und äußeren HZ der Ratte wiesen große Ähnlichkeit mit denen neonataler Mäuse auf (Michna *et al.*, 2003). Reife ÄHZ zeigten dieselbe geringe spannungsabhängige Inaktivierung und Sensitivität gegenüber Bay K 8644 wie neonatale ÄHZ. Der Nachweis von $Ca_v1.3$ mRNA und entsprechendem Protein in ÄHZ noch nach Hörbeginn legt den Schluss nahe, dass der I_{Ba} sowohl in jungen als auch in älteren Altersstadien durch die $Ca_v1.3$ $\alpha 1$ -Untereinheit fließt.

Der Phänotyp der ausgereiften ÄHZ war durch eine drastische Reduzierung des I_{Ba} in der zweiten postnatalen Woche gekennzeichnet. Noch kurz nach der Geburt konnten in ÄHZ von Maus und Ratte annähernd gleiche I_{Ba} -Amplituden (170-180 pA) gemessen werden, wohingegen die durchschnittlichen Werte des I_{Ba} in ÄHZ der Maus an Tag P19 auf etwa 13 pA abfielen, in ÄHZ der Ratte jedoch noch Amplituden von 58 pA (P19-P32) erreicht wurden. Angesichts der großen Fragilität reifer ÄHZ der Maus und der damit verkürzten Ableitdauer gehen wir

davon aus, dass in diesem Fall der oftmals beobachtete *run-up* (Martini *et al.*, 2000) des I_{Ba} noch nicht abgeschlossen war und die in den ÄHZ der Maus gemessenen Maximalwerte daher nicht die eigentliche Situation widerspiegeln. Angesichts des instabilen metabolischen Zustands der reifen ÄHZ von Mäusen in den verwendeten Lösungen könnte der Abbau der Ca^{2+} -Kanäle durch Proteasen ebenfalls ein Grund für diese extrem kleinen I_{Ba} -Amplituden sein. Für die Interpretation der Ca^{2+} -Ströme in reifen ÄHZ und deren Bedeutung für die afferente Signalweiterleitung wurden die an ÄHZ von Ratten erhobenen Daten herangezogen.

Sowohl in ÄHZ als auch in IHZ erfolgt postnatal eine Herunterregulation der Ca^{2+} -Kanal-Ströme, die in ÄHZ um etwa 4-8 Tage früher erfolgt als in IHZ. Maximale Ca^{2+}/Ba^{2+} Ströme wurden in IHZ in dem Alter gemessen (Maus: P6, Ratte: P9-P11), in dem auch Spontanaktivität in Form von Ca^{2+} -Aktionspotentialen auftritt (Beutner & Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003b; Brandt *et al.*, 2007), in ÄHZ lag der Zeitpunkt des maximalen Ca^{2+}/Ba^{2+} Einstroms zwischen P1 und P4.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob der Ca^{2+} -Strom in reifen ÄHZ der Ratte ausreicht, Exozytose auszulösen. Vergleicht man die Maximalamplitude des I_{Ba} der reifen ÄHZ (~ 58 pA) mit denen der IHZ (~ 181 pA), so ergab sich ein Verhältnis von 1:3. Berücksichtigt man nun, dass am basalen Pol der IHZ etwa 13 Präsynapsen durch den lokalen Ca^{2+} -Einstrom der $Ca_v1.3$ -Kanäle getriggert werden (Khimich *et al.*, 2005), so lässt sich daraus schließen, dass hierfür ~ 14 pA I_{Ba} pro afferenter Faser ausreichen. Da für ÄHZ mit 3 Afferenzen pro Zelle eine viel geringere Anzahl bekannt ist (Berglund & Ryugo, 1987), beträgt hier der I_{Ba} ~ 19 pA pro Afferenz, was etwa in derselben Größenordnung liegt wie in IHZ. Die Hypothese, dass der Ca^{2+} -Strom durch $Ca_v1.3$ -Kanäle am basalen Ende der reifen ÄHZ hier Exozytose auslösen kann, wird durch den immunhistochemischen Nachweis des $Ca_v1.3$ ausschließlich in der präsynaptischen Region äußerer und innerer HZ weiter gestützt (Knirsch *et al.*, 2007). Ein weiterer Hinweis auf funktionale Afferenzen an ÄHZ lieferte die immunhistochemische Färbung des Ribbon-Synapsen-Proteins CtBP2/RIBEYE an der Basis neonataler und

ausgereifter ÄHZ (Schug *et al.*, 2006;Engel *et al.*, 2006). Ein weiteres Argument für eine afferente Innervierung der ÄHZ liefert das Vorkommen von spannungsgesteuerten Na⁺-Kanälen an Typ-II-Afferenzen direkt unterhalb der ÄHZ, die hier bei der Umwandlung von EPSP (erregende postsynaptische Potentiale) in Aktionspotentiale eine Rolle spielen könnten (Hossain *et al.*, 2005). Zudem weist das Auftreten von postsynaptischen Glutamatrezeptoren unterhalb der ÄHZ (Kuriyama *et al.*, 1994;Engel *et al.*, 2006) sowie Glutamat-transportierender Proteine in Deiterszellen (Furness *et al.*, 2002) ebenfalls auf eine Funktion der ÄHZ in der afferenten Reizweiterleitung hin.

Man nimmt an, dass die ÄHZ als lokaler Schallverstärker wirken, dessen Verstärkungsfaktor über mediale Efferenzen gesteuert wird. Zu klären bleibt, woher die Neurone im medialen Olivocochleären Komplex (MOC; ipsi- und contralaterale Neurone) die Signale für die Feineinstellung der ÄHZ-Hemmung letztendlich bekommen. Berücksichtigt man die kurzen Latenzzeiten der Neurone des MOC, die innerhalb von <10 ms auf hohe Schalldrücke reagieren, so muss es sich um die myelinisierten, dicken Typ-I-Afferenzen der IHZ handeln, die dieses Rückkopplungssystem aktivieren (Lieberman & Brown, 1986;Brown, 1993). Der Großteil der MOC-Neurone jedoch reagiert nicht auf kurze akustische Reize, sondern benötigt Schallereignisse von >25 ms Dauer (Lieberman & Brown, 1986). Eine Beteiligung der langsameren Typ-II-Afferenzen ist hierbei daher sehr wahrscheinlich.

Die erstaunliche Leistung, die das menschliche Cortische Organ erbringt, indem es Schalldrücke von ~6 Größenordnungen zu verarbeiten vermag, ist zum einen nur durch den cochleären Verstärkungsmechanismus der ÄHZ möglich, der durch Flüssigkeitsverschiebungen im subtektorialen Spalt wiederum die IHZ aktiviert, zum anderen durch die unterschiedliche Sensitivität der Typ-I-Fasern (Lieberman, 1982) und die Modulation der Typ-I-Fasern unterhalb der IHZ durch die efferenten Fasern des lateralen Olivocochleären Komplexes (LOC) (Maison *et al.*, 2003;Ruel *et al.*, 2006). Außerdem werden bei hohen Schalldruckpegeln auch IHZ aus angrenzenden Bereichen mit gereizt.

Die hier beschriebenen elektrophysiologischen Daten und die Ergebnisse der molekularbiologischen und immunhistochemischen Analysen der spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanäle in ÄHZ machen eine funktionelle afferente Signalweiterleitung in diesem Haarsinneszelltyp sehr wahrscheinlich.

Abgesehen von der Funktion, Exozytose auszulösen, ist nicht auszuschließen, dass der Ca^{2+} -Einstrom in ÄHZ auch der Aktivierung benachbarter Ca^{2+} -sensitiver K^+ -Kanäle dient, beispielsweise der SK-Kanäle (Oliver *et al.*, 2000) oder der BK-Kanäle (Ruttiger *et al.*, 2004). Auch ist eine Beteiligung bei der Ca^{2+} -getriggerten Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern denkbar (Lioudyno *et al.*, 2004).

4.3. Die β -Untereinheiten des $\text{Ca}_v1.3$ in cochleären Haarsinneszellen der Maus

Spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) spielen bei der normalen Funktionsweise sowie der Pathophysiologie von Neuronen und anderen erregbaren Zellen eine wichtige Rolle. Aufgrund der einzigartigen Eigenschaft der Ca^{2+} -Kanäle, elektrische Signale in Signale für die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse umzuwandeln, ist der Transport des Kanals aus dem Endoplasmatischen Retikulum und der korrekte Einbau in die Plasmamembran für das normale Funktionieren der Zelle von großer Wichtigkeit. Die porenbildende transmembranäre $\alpha 1$ -Untereinheit der VDCC ist mit mehreren Untereinheiten assoziiert. In sämtlichen *high voltage activated* (HVA) Calcium-Kanälen, zu denen auch die L-Typ-Kanäle gehören, ist die $\alpha 1$ -Untereinheit stets mit einer intrazellulären β -Untereinheit und einer membranständigen $\alpha 2\delta$ -Untereinheit verbunden. Die $\alpha 2\delta$ -Untereinheit steht in einigen Kanälen mit einer transmembranären γ -Untereinheit in Kontakt (Chang & Hosey, 1988; Witcher *et al.*, 1993). Die 4 für die β -Untereinheiten codierenden Gene (Castellano & Perez-Reyes, 1994) liegen sowohl beim Menschen (Gregg *et al.*, 1993; Taviaux *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997) als auch bei der Ratte auf unterschiedlichen Chromosomen. Zudem sind zahlreiche Splice-Varianten bekannt.

Die erste publizierte β -Untereinheit, $\text{Ca}_v\beta_{1a}$, tritt ausschließlich im Skelettmuskel auf (Ruth *et al.*, 1989), während $\text{Ca}_v\beta_{1b}$ und $\text{Ca}_v\beta_{1c}$ vornehmlich in Gehirn, Herz und Milz der Ratte exprimiert sind (Williams *et al.*, 1992). Alle vier Splice-Varianten der β_2 -Untereinheit, $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, $\text{Ca}_v\beta_{2b}$, $\text{Ca}_v\beta_{2c}$ und $\text{Ca}_v\beta_{2d}$, wurden in Herz, Aorta, Gehirn, Lunge und Luftröhre gefunden (Yamada *et al.*, 2001). $\text{Ca}_v\beta_3$ (Hullin *et al.*, 1992; Castellano *et al.*, 1993b) und $\text{Ca}_v\beta_4$ (Castellano *et al.*, 1993a) kommen im Gehirn der Ratte sowie in weiteren Geweben vor. Obwohl jede α_1 -Untereinheit zusammen mit unterschiedlichen β -Untereinheiten aufgereinigt werden konnte (Scott *et al.*, 1996) bestehen teilweise Präferenzen bezüglich der Kombination aus α_1 und ihrer hauptsächlichen β -Untereinheit, die zudem im Laufe der Entwicklung reguliert werden können. Im Skelettmuskel tritt α_{1s} beispielsweise vorrangig mit $\text{Ca}_v\beta_{1a}$ kombiniert auf, im Herzmuskel liegt α_{1c} gemeinsam mit $\text{Ca}_v\beta_{2c}$ vor, im Gehirn α_{1B} mit $\text{Ca}_v\beta_3$ und im Kleinhirn α_{1A} mit $\text{Ca}_v\beta_3$ oder $\text{Ca}_v\beta_4$ (Vance *et al.*, 1998). (Green *et al.*, 1996) konnten durch RT-PCR-Analysen $\text{Ca}_v\beta_1$ - $\text{Ca}_v\beta_4$ im Gehirn und erstmals mehrere Splice-Varianten von $\text{Ca}_v\beta_1$, sowie $\text{Ca}_v\beta_3$ und $\text{Ca}_v\beta_4$ in der Cochlea der Maus nachweisen, jedoch nicht $\text{Ca}_v\beta_2$. Dem sind die Ergebnisse der RT-PCR der hier vorliegenden Arbeit entgegenzuhalten, die alle 4 β -Untereinheiten im Cortischen Organ zeigen. Auch die hier nicht gezeigten Immunfärbungen mit Antikörpern gegen $\text{Ca}_v\beta_1$ - $\text{Ca}_v\beta_4$ (Marlies Knipper, Harald Winter) wiesen alle 4 β -Untereinheiten im Cortischen Organ nach.

Ohne β -Untereinheit wird die $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheit nicht zur Plasmamembran transportiert und dort verankert (Perez-Reyes *et al.*, 1992): Ein Rückhaltesignal im I-II Loop nahe der *alpha interaction domain* (AID), einem Bereich auf der α_1 -Untereinheit, verhindert den Einbau in die Membran. Erst wenn hier mit einer auf der β -Untereinheit lokalisierten Bindungsstelle, der *beta interaction domain* (BID), eine Bindung mit einer β -Untereinheit ausgebildet wurde, wird das Rückhaltesignal unwirksam und der Kanal kann an die vorgesehene Stelle in der Membran transportiert und eingebaut werden (Bichet *et al.*, 2000). Aus der Kombination von α_1 mit einer beliebigen β -Untereinheit resultiert eine enorme Zunahme der Ca^{2+} -Kanal-Strom-Amplitude, was nicht auf einem Anstieg der

Einzelkanalleitfähigkeit, sondern auf die vergrößerte Anzahl der stabil in die Membran integrierter Kanäle zurückzuführen ist (Kamp *et al.*, 1996; Altier *et al.*, 2002).

Wird die $\alpha 1$ -Untereinheit isoliert heterolog exprimiert, so zeigt sich eine völlig andere Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung als bei nativen Ca^{2+} -Kanal-Strömen (Perez-Reyes *et al.*, 1989), was durch die Co-Expression mit einer β -Untereinheit normalisiert werden kann. Die Co-Expression einer beliebigen β -Untereinheit mit einer beliebigen $\alpha 1$ -Untereinheit führt stets zu einer Beschleunigung der Aktivierungskinetik und einer Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurve um 10-15 mV in negative Richtung (Lacerda *et al.*, 1991; De Waard M. & Campbell, 1995). Nicht nur die Expression in der Plasmamembran, sondern auch die Modulierung des Kanals unterliegt somit dem Einfluss der β -Untereinheit. (Cens *et al.*, 1999b) zeigte, dass die Kinetik der Inaktivierung (VDI und CDI) des Ca^{2+} -Kanal-Stroms (*Xenopus* Oocyten) durch $\alpha 1_A$ und $\alpha 1_C$ mit Beteiligung von $\text{Ca}_V\beta 1_b$, $\text{Ca}_V\beta 3$ und $\text{Ca}_V\beta 4$ rascher und stärker verläuft als in Co-Expression mit $\text{Ca}_V\beta 2_a$. Durch $\text{Ca}_V\beta 2$ konnte in Oocyten von *Xenopus* sogar eine Verlangsamung und Verzögerung der Inaktivierung beobachtet werden (Sokolov *et al.*, 2000). Die an äußeren und inneren Haarsinneszellen gemessenen Ca^{2+} -Kanal-Ströme ähneln bezüglich ihrer schwachen oder fehlenden Inaktivierung diesen Strömen mit Beteiligung von $\text{Ca}_V\beta 2$. Eine Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle in HZ von $\text{Ca}_V\beta 2^{-/-}$ - und $\text{Ca}_V\beta 1^{-/-}$ -Mäusen war zum Zeitpunkt der Arbeit nicht möglich, da diese „knock out“-Tiere aufgrund der lebenswichtigen Funktionen von $\text{Ca}_V\beta 1$ in der Skelettmuskulatur bzw. von $\text{Ca}_V\beta 2$ im Herzmuskel postnatal nicht lebensfähig sind. Die fehlende β -Untereinheit kann in diesen Geweben nicht durch andere Untereinheiten substituiert werden. Publiziert sind lediglich Untersuchungen an isoliert kultivierten, nicht kontraktile $\text{Ca}_V\beta 1^{-/-}$ -Muskelzellen (Gregg *et al.*, 1996).

Im Gehirn (Meerschweinchen, Kaninchen) wurden neuronale L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($\text{Ca}_V 1.2$ und $\text{Ca}_V 1.3$) in Anordnung mit allen 4 bekannten β -Untereinheiten

identifiziert, wobei die jeweils bevorzugte Kombination von der jeweiligen Gehirnregion abhängig ist (Pichler *et al.*, 1997).

In HZ des Cortischen Organs ist fast ausschließlich $\text{Ca}_v1.3$ exprimiert. Es lag mit diesen Zellen daher ein optimales Modell zur Untersuchung der Kombination dieser $\text{Ca}_v\alpha1$ -Untereinheit mit einer möglicherweise präferierten β -Untereinheit vor.

RT-PCR

Durch die teils widersprüchlichen Ergebnisse der HZ-spezifischen RT-PCR, die eine Beteiligung aller 4 β -Untereinheiten in ÄHZ und zumindest die Anwesenheit von $\text{Ca}_v\beta2$ und $\text{Ca}_v\beta3$ in IHZ sicherstellten, konnten keine eindeutigen Aussagen über die Expression der β -Untereinheiten in HZ liefern. Obwohl bei der Isolation der HZ für RT-PCR-Experimente Kontaminationen vom jeweils anderen HZ-Typ strikt vermieden wurden, ist eine Verunreinigung der Proben durch efferente oder afferente Fasern nicht auszuschließen. Möglicherweise existiert in den Axonen ein zur Verschaltung mit den HZ zielender mRNA-Transport für $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten (Cens *et al.*, 1999a; Cens *et al.*, 1999b).

Immunhistochemische Färbungen mit β -spezifischen Antikörpern zeigten deutliche Signale für alle 4 β -Untereinheiten im Cortischen Organ (Marlies Knipper, Harald Winter 2006; nicht veröffentlichte Daten). Eine genaue Zuordnung der Färbungen zu HZ oder efferenten oder afferenten Fasern war auf lichtmikroskopischer Ebene jedoch hierdurch nicht möglich.

Da die Ergebnisse auf molekularer und immunhistochemischer Ebene kein aussagekräftiges Verteilungsmuster der Untereinheiten in IHZ und ÄHZ ergaben, wurden die Auswirkungen des Fehlens von $\text{Ca}_v\beta3$ und $\text{Ca}_v\beta4$ auf die Ca^{2+} -Kanal-Ströme in HZ analysiert.

Die uns zur Verfügung stehenden $\text{Ca}_v\beta3^{-/-}$ -Mäuse zeigten phänotypisch keine Auffälligkeiten. In Neuronen ist $\text{Ca}_v\beta3$ bevorzugt mit α_{1B} kombiniert, der Verlust von $\text{Ca}_v\beta3$ führt zu einer abgeschwächten Schmerzverarbeitung von Entzündungsreizen (Murakami *et al.*, 2002).

In „*lethargic*“ (*lh*) $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen, einem Mausmodell für menschliche Petit-Mal-Epilepsie (Noebels & Sidman, 1979; Hosford *et al.*, 1992), ist durch einen Einschub von 4bp auf Chromosom 2 das Translations-Leseraster verschoben, was ein verkürztes Protein mit Verlust der AID und damit der funktionalen Bindung an die $\alpha 1$ -Untereinheit zur Folge hat, ohne die der Kanal nicht in die Plasmamembran integriert wird (Burgess *et al.*, 1997). An beiden „*knock out*“ -Mausstämmen wurden elektrophysiologische Untersuchungen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in inneren und äußeren IHZ durchgeführt.

Aktivierungskinetik

Ein beschleunigender Effekt durch β -Untereinheiten wurde in zahlreichen heterologen Expressionssystemen gezeigt (Castellano *et al.*, 1993a; Castellano *et al.*, 1993b). In ÄHZ der $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse hatte das Fehlen von $\text{Ca}_v\beta 4$ eine verlangsamte Aktivierungskinetik zur Folge, ein Hinweis auf eine Beteiligung dieser Untereinheit im Ca^{2+} -Kanal in ÄHZ im Wildtyp.

Da die Anwesenheit der β -Untereinheiten allgemein die Geschwindigkeit der Aktivierung erhöht (Welling *et al.*, 1993; Lacinova *et al.*, 1995), in neonatalen IHZ jedoch die Zeitkonstanten der Aktivierung bei Abwesenheit von $\text{Ca}_v\beta 3$, bzw. $\text{Ca}_v\beta 4$ schneller waren als in den Kontrolltieren, könnte hier der Ausfall von dieser Untereinheiten zu einer starken Hochregulation einer anderen β -Untereinheit mit schneller aktivierendem Effekt geführt haben.

Die Aktivierungskinetik des Ca^{2+} -Stroms in reifen IHZ war durch den Verlust von $\text{Ca}_v\beta 3$ und $\text{Ca}_v\beta 4$ nicht beeinflusst. Möglicherweise modulieren im maturen Phänotyp der IHZ andere $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheiten die Aktivierungskinetik.

In *dorsal root ganglions* (DRG) geht $\text{Ca}_v\beta 3$ als wichtigste β -Untereinheit mit $\alpha 1_A$, $\alpha 1_B$, $\alpha 1_C$, $\alpha 1_D$ und $\alpha 1_E$ stabile Bindungen ein. Fehlt in diesen Zellen $\text{Ca}_v\beta 3$, so führt dies ebenfalls nicht zu einer Verlangsamung der Aktivierungskinetik (Murakami *et al.*, 2002). Vermutlich wird auch hier die fehlende β -Untereinheit durch $\text{Ca}_v\beta 1$, $\text{Ca}_v\beta 2$ oder $\text{Ca}_v\beta 4$ substituiert.

Maximale Amplitude des I_{Ba}

In glatter Muskulatur der Aorta (α_{1C}) von $\text{Ca}_V\beta 3^{-/-}$ -Mäusen ist die Amplitude des I_{Ba} um 30% reduziert (Murakami *et al.*, 2003). Auch in ÄHZ hatte der Verlust von $\text{Ca}_V\beta 3$ eine Reduktion der I_{Ba} Amplitude um $\sim 20\%$ zur Folge. Offenbar ist in den ÄHZ der $\text{Ca}_V\beta 3^{-/-}$ -Mäuse aufgrund der fehlenden $\beta 3$ -Untereinheit die Anzahl der funktional in die Plasmamembran integrierter $\alpha 1$ -Untereinheiten reduziert, was zu einer geringeren Ca^{2+} -Stromdichte in diesen Zellen führte.

Eine Abnahme des I_{Ba} innerer HZ mit zunehmendem Alter (Johnson *et al.*, 2005) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit interessanterweise ausschließlich in IHZ der $\text{Ca}_V\beta^{-/-}$ -Tiere beobachtet, nicht jedoch in den HZ der Kontrolltiere. $\text{Ca}_V\beta 3$ und $\text{Ca}_V\beta 4$ nehmen in diesen beiden Mausstämmen ($\text{Ca}_V\beta 3^{-/-}$ und $\text{Ca}_V\beta 3^{+/+}$: SvJ 129, $\text{Ca}_V\beta 4^{+/+}$: gemischter genetischer Hintergrund) möglicherweise eine elementare Funktion in der Aufrechterhaltung des Expressionsniveaus von $\alpha 1$ in der Plasmamembran innerer HZ ein.

Membrankapazität C

Der Verlust von $\text{Ca}_V\beta 2$ in embryonalen Herzmuskelzellen führt zwar zu einem stark reduzierten Ca^{2+} -Kanal-Strom, jedoch zu keiner veränderten Membrankapazität der Zellen (Weissgerber *et al.*, 2006).

Neonatale IHZ ohne $\text{Ca}_V\beta 4$ wiesen signifikant geringere Kapazitäten auf als die Kontrollzellen. Erstaunlicherweise hatte hier der Verlust der β -Untereinheit einen Einfluss auf die Zellgröße selbst, während der gesamte Ca^{2+} -Kanal-Strom nicht reduziert war, die Stromdichte in IHZ ohne $\text{Ca}_V\beta 4$ somit zunahm. Für diesen Effekt haben wir momentan keine Erklärung. Neonatale IHZ von $\text{Ca}_V 1.3^{-/-}$ -Mäusen beispielsweise zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine veränderten Membrankapazitäten (Platzer *et al.*, 2000), jedoch war die Kapazität durch den Verlust der $\alpha 1$ -Untereinheit hier in reifen Stadien leicht reduziert (Brandt *et al.*, 2003).

Halbmaximale Aktivierung $V_{1/2}$

Die Anwesenheit von $\text{Ca}_V\beta 4$ zeigte in heterologen Expressionssystemen einen hyperpolarisierenden Effekt auf die Strom-Spannungs-Kurve (Castellano *et al.*,

1993a;Richards *et al.*, 2004). Dies erklärt die depolarisierende Verschiebung von $V_{1/2}$ durch das Fehlen von $Ca_v\beta 2$ (Weissgerber *et al.*, 2006) oder $Ca_v\beta 3$ (Murakami *et al.*, 2002).

Dem entspricht die Beobachtung in IHZ neonataler $Ca_v\beta 4^{-/-}$ -Mäusen, deren halbmaximale Aktivierung ($V_{1/2}$) der Ca^{2+} Kanäle durch das Fehlen von $Ca_v\beta 4$ in Richtung positiverer Potentiale verschoben war. Offenbar fehlt hier die hyperpolarisierende Wirkung von $Ca_v\beta 4$, die nicht durch eine der anderen β -Untereinheiten kompensiert wird.

Der Verlust von $Ca_v\beta 4$ hatte auf den Ca^{2+} -Kanal-Strom beider Haarzelltypen unterschiedliche Effekte: in neonatalen IHZ war die Spannungssensitivität reduziert, in ÄHZ dagegen erhöht. Auch das Fehlen von $Ca_v\beta 3$ führte in ÄHZ zu einer Steigerung der Spannungssensitivität. In IHZ wurde die Sensitivität des Kanals gegenüber Veränderungen des Membranpotentials durch $Ca_v\beta 3$ nicht modifiziert. In reifen IHZ der $Ca_v\beta 3^{-/-}$ - und $Ca_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse war die Spannungssensitivität gegenüber neonatalen Stadien signifikant erhöht, eine altersabhängige Änderung, die in den Kontrolltieren nicht beobachtet wurde.

Spannungsabhängige Inaktivierung (VDI)

Angesichts der im Gegensatz zu den meisten anderen L-Typ Kanal-Strömen äußerst schwach ausgeprägten spannungsabhängigen und schwachen Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung in HZ ist eine Quantifizierung des Einflusses von $Ca_v\beta 3$ und $Ca_v\beta 4$ auf die Inaktivierung hier problematisch. Das Fehlen von $Ca_v\beta 3$ hatte in ÄHZ einen verstärkenden Effekt auf die spannungsabhängige Inaktivierung des Kanals, was jedoch aufgrund der schwachen Ausprägung und insbesondere der relativ kleinen Ströme hier nur schwierig einzuordnen ist. Die Untereinheiten $Ca_v\beta 1_b$, $Ca_v\beta 3$ und $Ca_v\beta 4$ verstärken und beschleunigen die Inaktivierung des Kanals (Cens *et al.*, 1999a;Cens *et al.*, 1999b), wohingegen $Ca_v\beta 2$ die Inaktivierung sowohl verlangsamt als auch verringert (Sokolov *et al.*, 2000). Für eine Beteiligung der $\beta 2$ -Untereinheit am Ca^{2+} -Kanal in Haarsinneszellen spricht daher die Eigenschaft des Ca^{2+} -Kanal-Stroms in diesen Zellen, kaum oder nur schwach ausgeprägt spannungsabhängig und Ca^{2+} -abhängig zu inaktivieren.

Hörfunktion

Aus dem Verlust der α_1 -Untereinheit in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ ($\alpha_{1D}^{-/-}$) Mäusen resultiert Taubheit und fortschreitende Degeneration der HZ (Platzer *et al.*, 2000). Auch in $\text{BK}\alpha^{-/-}$ -Mäusen führte das Fehlen der α -Untereinheit des spannungs- und Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanals zu fortschreitendem Hörverlust ab der 8. postnatalen Woche. Fehlte hingegen in $\text{BK}\beta_1^{-/-}$ -Mäusen die β -Untereinheit des BK-Kanals, führte dies nicht zu einer Beeinträchtigung des Hörvermögens (Rüttiger *et al.*, 2004). Auch $\text{Ca}_v\beta_3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta_4^{-/-}$ -Mäuse wiesen normale DPOAE (Distorsionspunkte otoakustischer Emissionen) sowie ABR (*auditory brainstem responses*) auf (Rüttiger 2006; unveröffentlichte Daten). Ein Fehlen der β_3 - bzw. β_4 -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals hatte somit keinen Einfluss auf ableitbare Hirnstammpotentiale und die Motilität äußerer HZ.

Grundsätzlich lässt sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen ableiten, dass sowohl in inneren als auch in äußeren HZ eine Mischung aus allen vier β -Untereinheiten vorliegt. Zwar deuten die elektrophysiologischen Daten darauf hin, dass das Fehlen von $\text{Ca}_v\beta_3$ und $\text{Ca}_v\beta_4$ in den HZ die Ca^{2+} -Kanaleigenschaften teilweise signifikant beeinflusst, doch handelt es sich bei diesen beiden β -Untereinheiten offenbar nicht um die entscheidenden β -Untereinheiten des Kanals. Viel mehr spricht das auffallend schwache Inaktivierungsverhalten des Ca^{2+} -Kanals in HZ generell hier für eine Beteiligung von $\text{Ca}_v\beta_2$, der einzigen β -Untereinheit, die einen deutlich abschwächenden und verlangsamen Effekt auf die Inaktivierung von spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanälen hat (Sokolov *et al.*, 2000).

Von großem Interesse wäre daher die Untersuchung von HZ-Strömen in lebensfähigen transgenen Mäusen, denen $\text{Ca}_v\beta_2$ bzw. $\text{Ca}_v\beta_1$ in den HZ fehlt (konditionale, HZ-spezifische $\text{Ca}_v\beta_2$ - bzw. $\text{Ca}_v\beta_1$ - „*knock out*“ -Mäuse oder konstitutive $\text{Ca}_v\beta_2^{-/-}$ - bzw. $\text{Ca}_v\beta_1^{-/-}$ -Mäuse mit kardialem bzw. skelettmuskulärem „*knock in*“).

Interessanterweise zeigten zahlreiche elektrophysiologische Parameter des Ca^{2+} -Kanal-Stroms in neonatalen IHZ ohne $\text{Ca}_v\beta_4$ signifikante Veränderungen gegenüber den WT-IHZ, wohingegen mittels RT-PCR $\text{Ca}_v\beta_4$ in jungen

Altersstadien in IHZ kaum nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise waren die PCR-Analysen (P2-P4) auf ein Zeitfenster mit sehr niedrigem Transkriptionsniveau für $\text{Ca}_v\beta 4$ beschränkt oder aber das Fehlen von $\text{Ca}_v\beta 4$ wurde durch die Expression einer weiteren β -Untereinheit kompensiert, was die Kanaleigenschaften entsprechend verändert. Durch quantitative RT-PCR an cDNA neonataler und ausgereifter IHZ und ÄHZ könnten eventuell bestehende altersabhängige Unterschiede in der Expression der β -Untereinheiten aufgeklärt werden.

Eine weitere Erkenntnis der hier vorgestellten Analysen der Ca^{2+} -Kanal-Ströme in HZ der $\text{Ca}_v\beta 3^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{-/-}$ -Mäuse sowie deren Kontrollen war die Heterogenität der Wildtypen (Tabelle 3). Die signifikanten Unterschiede zwischen Membrankapazitäten, Steigungsfaktor k und dem Grad der Inaktivierung der IHZ neonataler $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -Mäuse, sowie zwischen Membrankapazitäten der ÄHZ neonataler $\text{Ca}_v\beta 3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v\beta 4^{+/+}$ -Mäuse deuten darauf hin, dass die beiden hier verwendeten Mausstämme über eine leicht abweichende Ausstattung ihrer Ionenkanäle in den HZ verfügen.

5 Literatur

Literatur

Altier C, Dubel SJ, Barrere C, Jarvis SE, Stotz SC, Spaetgens RL, Scott JD, Cornet V, De WM, Zamponi GW, Nargeot J, & Bourinet E (2002). Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J Biol Chem* **277**, 33598-33603.

Arikkath J & Campbell KP (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 298-307.

Berglund AM & Ryugo DK (1987). Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J Comp Neurol* **255**, 560-570.

Beutner D & 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, & De WM (2000). The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**, 177-190.

Brandt A, Striessnig J, & Moser T (2003). CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* **23**, 10832-10840.

Brandt N, Kuhn S, Munkner S, Braig C, Winter H, Blin N, Vonthein R, Knipper M, & Engel J (2007). Thyroid hormone deficiency affects postnatal spiking activity and expression of Ca²⁺ and K⁺ channels in rodent inner hair cells. *J Neurosci* **27**, 3174-3186.

Brown MC (1993). Anatomical and physiological studies of type I and type II spiral ganglion neurons. In: *The Mammalian Cochlear Nuclei: Organization and function.*, ed. Merchán M, pp. 43-54. Plenum Press, New York.

Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, & de RY (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* **227**, 194-196.

Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, & Noebels JL (1997). Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* **88**, 385-392.

Castellano A & Perez-Reyes E (1994). Molecular diversity of Ca²⁺ channel beta subunits. *Biochem Soc Trans* **22**, 483-488.

Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, & Perez-Reyes E (1993b). Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* **268**, 3450-3455.

Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, & Perez-Reyes E (1993a). Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* **268**, 12359-12366.

Cens T, Restituito S, & Charnet P (1999a). Regulation of Ca-sensitive inactivation of a 1-type Ca²⁺ channel by specific domains of beta subunits. *FEBS Lett* **450**, 17-22.

Cens T, Restituito S, Galas S, & Charnet P (1999b). Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem* **274**, 5483-5490.

Chang FC & Hosey MM (1988). Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J Biol Chem* **263**, 18929-18937.

Chen C, Nenov A, Norris CH, & Bobbin RP (1995). ATP modulation of L-type calcium channel currents in guinea pig outer hair cells. *Hear Res* **86**, 25-33.

Dallos P & Corey ME (1991). The role of outer hair cell motility in cochlear tuning. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 215-220.

Davis H (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* **9**, 79-90.

De Waard M. & Campbell KP (1995). Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **485 (Pt 3)**, 619-634.

Dou H, Vazquez AE, Namkung Y, Chu H, Cardell EL, Nie L, Parson S, Shin HS, & Yamoah EN (2004). Null mutation of alpha1D Ca²⁺ channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* **5**, 215-226.

Dulon D & Lenoir M (1996). Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* **8**, 1945-1952.

Dung HC & Swigart RH (1972). Histo-pathologic observations of the nervous and lymphoid tissues of "lethargic" mutant mice. *Tex Rep Biol Med* **30**, 23-39.

Dung HC & Swigart RH (1971). Experimental studies of "lethargic" mutant mice. *Tex Rep Biol Med* **29**, 273-288.

Echteler SM (1992). Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6324-6327.

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

Ehret G (1977). Postnatal development in the acoustic system of the house mouse in the light of developing masked thresholds. *J Acoust Soc Am* **62**, 143-148.

Engel J, Braig C, Ruttiger L, Kuhn S, Zimmermann U, Blin N, Sausbier M, Kalbacher H, Munkner S, Rohbock K, Ruth P, Winter H, & Knipper M (2006). Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea. *Neuroscience* **143**, 837-849.

Felix H (2002). Anatomical differences in the peripheral auditory system of mammals and man. A mini review. *Adv Otorhinolaryngol* **59**, 1-10.

Fettiplace R & Fuchs PA (1999). Mechanisms of hair cell tuning. *Annu Rev Physiol* **61**, 809-834.

Furness DN, Hulme JA, Lawton DM, & Hackney CM (2002). Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* **3**, 234-247.

Glowatzki E & Fuchs PA (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, & Schrott-Fischer A (2003). Role of class D L-type Ca²⁺ channels for cochlear morphology. *Hear Res* **178**, 95-105.

Green GE, Khan KM, Beisel DW, Drescher MJ, Hatfield JS, & Drescher DG (1996). Calcium channel subunits in the mouse cochlea. *J Neurochem* **67**, 37-45.

Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, Sukhareva M, Haynes S, Powell JA, Coronado R, & Powers PA (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13961-13966.

Gregg RG, Powers PA, & Hogan K (1993). Assignment of the human gene for the beta subunit of the voltage-dependent calcium channel (CACNLB1) to chromosome 17 using somatic cell hybrids and linkage mapping. *Genomics* **15**, 185-187.

He DZ, Evans BN, & Dallos P (1994). First appearance and development of electromotility in neonatal gerbil outer hair cells. *Hear Res* **78**, 77-90.

Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahlijanian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, & Catterall WA (1993). Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* **123**, 949-962.

Hille B (1991). *Ionic channels of excitable membranes* Sinauer Associates.

Hoffmann EK (2000). Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem* **10**, 273-288.

Hosford DA, Clark S, Cao Z, Wilson WA, Jr., Lin FH, Morrisett RA, & Huin A (1992). The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science* **257**, 398-401.

Hosford DA & Wang Y (1997). Utility of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin, and topiramate against human absence seizures. *Epilepsia* **38**, 408-414.

Hossain WA, Antic SD, Yang Y, Rasband MN, & Morest DK (2005). Where is the spike generator of the cochlear nerve? Voltage-gated sodium channels in the mouse cochlea. *J Neurosci* **25**, 6857-6868.

Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, & Flockerzi V (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* **11**, 885-890.

Jagger DJ & Housley GD (2003). Membrane properties of type II spiral ganglion neurones identified in a neonatal rat cochlear slice. *J Physiol* **552**, 525-533.

Johnson SL, Marcotti W, & Kros CJ (2005). Increase in efficiency and reduction in Ca²⁺ dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* **563**, 177-191.

Kamp TJ, Perez-Garcia MT, & Marban E (1996). Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line. *J Physiol* **492 (Pt 1)**, 89-96.

Kharkovets T, Dedek K, Maier H, Schweizer M, Khimich D, Nouvian R, Vardanyan V, Leuwer R, Moser T, & Jentsch TJ (2006). Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *EMBO J* **25**, 642-652.

Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom DS, Egner A, Gundelfinger ED, & Moser T (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* **434**, 889-894.

Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Munkner S, Knipper M, & Engel J (2007). Persistence of Ca(v)1.3 Ca²⁺ 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, & Striessnig J (2001). alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* **276**, 22100-22106.

Kros CJ, Ruppertsberg JP, & Rusch A (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* **394**, 281-284.

Kuriyama H, Jenkins O, & Altschuler RA (1994). Immunocytochemical localization of AMPA selective glutamate receptor subunits in the rat cochlea. *Hear Res* **80**, 233-240.

Lacerda AE, Kim HS, Ruth P, Perez-Reyes E, Flockerzi V, Hofmann F, Birnbaumer L, & Brown AM (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel. *Nature* **352**, 527-530.

Lacinova L, Ludwig A, Bosse E, Flockerzi V, & Hofmann F (1995). The block of the expressed L-type calcium channel is modulated by the beta 3 subunit. *FEBS Lett* **373**, 103-107.

Liberman MC (1982). Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* **216**, 1239-1241.

Liberman MC & Brown MC (1986). Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res* **24**, 17-36.

Liberman MC, Dodds LW, & Pierce S (1990). Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* **301**, 443-460.

Lioudyno M, Hiel H, Kong JH, Katz E, Waldman E, Parameshwaran-Iyer S, Glowatzki E, & Fuchs PA (2004). A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci* **24**, 11160-11164.

Maison SF, Adams JC, & Liberman MC (2003). Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J Comp Neurol* **455**, 406-416.

Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzter J, Reimer D, Striessnig J, & Nargeot J (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5543-5548.

Manley GA & Koppl C (1998). Phylogenetic development of the cochlea and its innervation. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 468-474.

Marcotti W, Geleoc GS, Lennan GW, & Kros CJ (1999). Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflugers Arch* **439**, 113-122.

Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, & Kros CJ (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 SL, Rusch A, & Kros CJ (2003b). Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* **552**, 743-761.

Marcotti W & Kros CJ (1999). Developmental expression of the potassium current $I_{K,n}$ contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* **520 Pt 3**, 653-660.

Martini M, Rossi ML, Rubbini G, & Rispoli G (2000). Calcium currents in hair cells isolated from semicircular canals of the frog. *Biophys J* **78**, 1240-1254.

McEnery MW, Vance CL, Begg CM, Lee WL, Choi Y, & Dubel SJ (1998). Differential expression and association of calcium channel subunits in development and disease. *J Bioenerg Biomembr* **30**, 409-418.

Michna M, Knirsch M, Hoda JC, Muenkner S, Langer P, Platzer J, Striessnig J, & Engel J (2003). Cav1.3 (α_1D) Ca^{2+} currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol* **553**, 747-758.

Murakami M, Fleischmann B, De FC, Freichel M, Trost C, Ludwig A, Wissenbach U, Schwegler H, Hofmann F, Hescheler J, Flockerzi V, & Cavalie A (2002). Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* **277**, 40342-40351.

Murakami M, Yamamura H, Suzuki T, Kang MG, Ohya S, Murakami A, Miyoshi I, Sasano H, Muraki K, Hano T, Kasai N, Nakayama S, Campbell KP, Flockerzi V, Imaizumi Y, Yanagisawa T, & Iijima T (2003). Modified cardiovascular L-type channels in mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel beta3 subunit. *J Biol Chem* **278**, 43261-43267.

Nadol JB, Jr. (1988). Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals. *Hear Res* **34**, 253-266.

Nakagawa T, Kakehata S, Akaike N, Komune S, Takasaka T, & Uemura T (1991). Calcium channel in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *Neurosci Lett* **125**, 81-84.

Namkung Y, Smith SM, Lee SB, Skrypnik NV, Kim HL, Chin H, Scheller RH, Tsien RW, & Shin HS (1998). Targeted disruption of the Ca²⁺ channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca²⁺ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca²⁺ channels in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12010-12015.

Neher E (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* **207**, 123-131.

Nilsen KE & Russell IJ (2000). The spatial and temporal representation of a tone on the guinea pig basilar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11751-11758.

Noebels JL & Sidman RL (1979). Inherited epilepsy: spike-wave and focal motor seizures in the mutant mouse tottering. *Science* **204**, 1334-1336.

Oliver D & Fakler B (1999). Expression density and functional characteristics of the outer hair cell motor protein are regulated during postnatal development in rat. *J Physiol* **519 Pt 3**, 791-800.

Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukrowitz T, Ruppersberg JP, & Fakler B (2000). Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* **26**, 595-601.

Oliver D, Plinkert P, Zenner HP, & Ruppersberg JP (1997). Sodium current expression during postnatal development of rat outer hair cells. *Pflugers Arch* **434**, 772-778.

Park SH, Suh YS, Kim H, Rhyu IJ, & Kim HL (1997). Chromosomal localization and neural distribution of voltage dependent calcium channel beta 3 subunit gene. *Mol Cells* **7**, 200-203.

Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei XY, & Birnbaumer L (1992). Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* **267**, 1792-1797.

Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei XY, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, & Birnbaumer L (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* **340**, 233-236.

Pichler M, Cassidy TN, Reimer D, Haase H, Kraus R, Ostler D, & Striessnig J (1997). Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **272**, 13877-13882.

Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, & Striessnig J (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* **102**, 89-97.

Pujol R, Lavigne-Rebillard M, & Lenoir M (1997). Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea. In *Development of the Auditory System, Springer Handbook of Auditory Research*, eds. Rubel EW, Popper AN, & Fay RR, pp. 156-192. Springer, New York.

Reid MA, Flores-Otero J, & Davis RL (2004). Firing patterns of type II spiral ganglion neurons in vitro. *J Neurosci* **24**, 733-742.

Richards MW, Butcher AJ, & Dolphin AC (2004). Ca²⁺ channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 626-632.

Robertson D (1984). Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* **15**, 113-121.

Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, & Puel JL (2006). Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res*.

Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, & Hofmann F (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **245**, 1115-1118.

Ruttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Muller M, Kopschall I, Pfister M, Munkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rusch A, Ruth P, & Knipper M (2004). Deletion of the Ca²⁺-activated

potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12922-12927.

Santos-Sacchi J (1991). Reversible inhibition of voltage-dependent outer hair cell motility and capacitance. *J Neurosci* **11**, 3096-3110.

Schnee ME & Ricci AJ (2003). Biophysical and pharmacological characterization of voltage-gated calcium currents in turtle auditory hair cells. *J Physiol* **549**, 697-717.

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

Scott VE, De WM, Liu H, Gurnett CA, Venzke DP, Lennon VA, & Campbell KP (1996). Beta subunit heterogeneity in N-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **271**, 3207-3212.

Siegel JH & Zeddes DG (2001). Intact explanted adult gerbil cochleae maintained at body temperature. *Abstracts Assoc Res Otolaryngol* **24**, 858.

Simmons DD (2002). Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* **53**, 228-250.

Sobkowicz HM, Rose JE, Scott GE, & Slapnick SM (1982). Ribbon synapses in the developing intact and cultured organ of Corti in the mouse. *J Neurosci* **2**, 942-957.

Sobkowicz HM, Rose JE, Scott GL, & Levenick CV (1986). Distribution of synaptic ribbons in the developing organ of Corti. *J Neurocytol* **15**, 693-714.

Sokolov S, Weiss RG, Timin EN, & Hering S (2000). Modulation of slow inactivation in class A Ca²⁺ channels by beta-subunits. *J Physiol* **527 Pt 3**, 445-454.

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

Takasaka T & Shinkawa H (1987). Serial section reconstruction of the guinea pig outer hair cells as studied with a high-voltage electron microscope and a computer-graphic display. *Acta Otolaryngol Suppl* **435**, 7-20.

Takimoto K, Li D, Nerbonne JM, & Levitan ES (1997). Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac alpha 1C and alpha 1D voltage-gated Ca²⁺ channel mRNAs. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 3035-3042.

Tanaka O, Sakagami H, & Kondo H (1995). Localization of mRNAs of voltage-dependent Ca(2+)-channels: four subtypes of alpha 1- and beta-subunits in developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 1-16.

Taviaux S, Williams ME, Harpold MM, Nargeot J, & Lory P (1997). Assignment of human genes for beta 2 and beta 4 subunits of voltage-dependent Ca²⁺ channels to chromosomes 10p12 and 2q22-q23. *Hum Genet* **100**, 151-154.

Vance CL, Begg CM, Lee WL, Haase H, Copeland TD, & McEnery MW (1998). Differential expression and association of calcium channel alpha1B and beta subunits during rat brain ontogeny. *J Biol Chem* **273**, 14495-14502.

Weber T, Zimmermann U, Winter H, Mack A, Kopschall I, Rohbock K, Zenner HP, & Knipper M (2002). Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2901-2906.

Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien KR, Fleischmann BK, Lipp P, Flockerzi V, & Freichel M (2006). Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Ca(V)beta2^{-/-} embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res* **99**, 749-757.

Welling A, Kwan YW, Bosse E, Flockerzi V, Hofmann F, & Kass RS (1993). Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels. Molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ Res* **73**, 974-980.

Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, & Harpold MM (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8**, 71-84.

Witcher DR, De WM, Sakamoto J, Franzini-Armstrong C, Pragnell M, Kahl SD, & Campbell KP (1993). Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca²⁺ channel complex purified from brain. *Science* **261**, 486-489.

Xu W & Lipscombe D (2001). Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* **21**, 5944-5951.

Yamada Y, Nagashima M, Tsutsuura M, Kobayashi T, Seki S, Makita N, Horio Y, & Tohse N (2001). Cloning of a functional splice variant of L-type calcium channel beta 2 subunit from rat heart. *J Biol Chem* **276**, 47163-47170.

Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, & Dallos P (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* **405**, 149-155.

Zhou W & Jones SW (1995). Surface charge and calcium channel saturation in bullfrog sympathetic neurons. *J Gen Physiol* **105**, 441-462.

Zidanic M & Fuchs PA (1995). Kinetic analysis of barium currents in chick cochlear hair cells. *Biophys J* **68**, 1323-1336.

Eigene Publikationen

Knirsch M, Kuhn S, Rüttiger L, Winter H, Braig C, Münkner S, Knipper M, Engel J
The auxiliary beta subunits 1-4 of presynaptic Cav1.3 Ca²⁺ channels in cochlear hair cells. In preparation

Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Munkner S, Knipper M, & Engel J
Persistence of Ca(v)1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J Neurosci* 27, 6442-6451, 2007

Geisler R, Rauch GJ, Geiger-Rudolph S, Albrecht A, van Bebber F, Berger A, Busch-Nentwich E, Dahm R, Dekens MP, Dooley C, Elli AF, Gehring I, Geiger H, Geisler M, Glaser S, Holley S, Huber M, Kerr A, Kirn A, Knirsch M, Konantz M, Kuchler AM, Maderspacher F, Neuhauss SC, Nicolson T, Ober EA, Praeg E, Ray R, Rentzsch B, Rick JM, Rief E, Schauerte HE, Schepp CP, Schonberger U, Schonthaler HB, Seiler C, Sidi S, Sollner C, Wehner A, Weiler C, Nusslein-Volhard C. Large-scale mapping of mutations affecting zebrafish development. *BMC Genomics* 9;8:11, 2007

Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Fedorenko O, Baltaev R, Engel J, Knirsch M, Lang F
Functional coassembly of KCNQ4 with KCNE-beta- subunits in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem*. 18(1-3):57-66, 2006

Winter H, Braig C, Zimmermann U, Geisler HS, Fränzer JT, Weber T, Ley M, Engel J, Knirsch M, Bauer K, Christ S, Walsh EJ, McGee JA, Köpschall I, Rohbock K, Knipper M
Thyroid hormone receptors TR α 1 and TR β differentially regulate gene expression of *Kcnq4* and *prestin* during final differentiation of outer hair cells. *J Cell Sci*. Jul 15;119(Pt 14):2975-84, 2006

Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Baltaev R, Korniyuchuk G, Knirsch M, Engel J, Lang F
Regulation of KCNQ4 Potassium Channel Prepulse Dependence and Current Amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem*, 16(4-6):255-62, 2005

Rüttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Müller M, Köpschall I, Pfister M, Münkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rüscher A, Ruth P, Knipper M
Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK)-subunit but not the BK β 1-subunit leads to progressive hearing loss. *PNAS*, vol. 101, no. 35, pp.12922–12927, 2004

Engel J, Michna M, Knirsch M, Waka N, Münkner S
Voltage- activated Ca²⁺ Channels (Cav1.3) in Cochlear Hair Cells. *Nova Acta Leopoldina* NF 89, Nr. 336, 159-164, 2004

Michna M, Knirsch M, Hoda JC, Muenkner S, Langer P, Platzer J, Striessnig J, Engel J Cav1.3 (α1D) Ca²⁺ currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol*, 553.3, pp. 747–758, 2003

Tagungsbeiträge

Knirsch M, Kuhn S, Rüttiger L, Kaspersek S, Münkner S, Freichel M, Flockerzi V, Knipper M, Engel J Analyzing the Ca²⁺ currents in inner and outer hair cells of mice lacking the beta3- or beta4 auxiliary Ca²⁺ channel beta subunit. Tagung der Neurowissenschaftliche Gesellschaft 2007, Göttingen

Knirsch M, Kuhn S, Münkner S, Freichel M, Flockerzi V, Engel J Searching for the b subunits coassembled with the Cav1.3 alpha1 subunit in Ca²⁺ channels of mouse inner and outer hair cells. Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2006, München

Engel J, Knirsch M, Brandt N, Braig C, Schug N, Kuhn S, Münkner S, Knipper M Persistence of Cav1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells suggests afferent role of OHCs in hearing. Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2006, München

Knirsch M, Braig C, Winter H, Knipper M, Engel J Voltage-activated calcium channel β subunits in cochlear hair cells. *Inner Ear Biology* 2005, Tübingen

Engel J, Knirsch M, Michna M, Waka N, Münkner S, Braig C, Knipper M Development, characteristics and function of inner and outer hair cell calcium channels. Tagung der Neurowissenschaftliche Gesellschaft 2005, Göttingen

Braig C, Winter H, Knirsch M, Zimmermann U, Rohbock K, Köpschall I, Engel J, Knipper M SK2 in the Cochlea. Tagung der Neurowissenschaftliche Gesellschaft 2005, Göttingen

Braig C, Winter H, Knirsch M, Zimmermann U, Rohbock K, Köpschall I, Engel J, Knipper M SK2 in the Cochlea. Association for Research in Otolaryngology 2005, New Orleans

Knirsch M, Michna M, Münkner S, Engel J Cav1.3-mediated calcium currents in neonatal and mature outer hair cells of mice. Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2004, Leipzig

Literatur

Knirsch M, Michna M, Muenkner S, Engel J CaV1.3-Mediated Ca²⁺ Currents and the Maturation of Mouse Outer Hair Cells. Association for Research in Otolaryngology 2004, Florida

Knirsch M, Engel J, Rüscher A Electrophysiological Characterisation of Hair Cells from the Hearing Organ of the Zebrafish (*Danio rerio*) reveals two different Types of Potassium Currents. Tagung der Neurowissenschaftliche Gesellschaft 2003, Göttingen

Knirsch M, Rüscher M Two Classes of Hair Cells with Different Potassium Currents in the Hearing Organ of the Zebrafish (*Danio Rerio*). Association for Research in Otolaryngology 2003, Florida

Lebenslauf

Name: Martina Knirsch

Geboren am: 22.01.1976 in Stuttgart

Schule/ Studium

| | |
|-------------|---|
| 1982 - 1986 | Grundschule am Fuchsrain, Stuttgart |
| 1986 - 1995 | Evang. Heidehofgymnasium, Stuttgart |
| 1995 - 2001 | Studium der Biologie, Universität Tübingen |
| 1998 | Auslandsstudium, University of Oulu, Finnland |
| 2000 - 2001 | Diplomarbeit „Elektrophysiologische Charakterisierung der K ⁺ -Kanäle im Hörorgan des Zebrafisches“ AG Dr. Alfons Rüsçh |
| 2002 - 2007 | Promotion „Ca ²⁺ -Kanäle in cochleären Haarsinneszellen“ AG Dr. Jutta Engel, Physiologisches Institut II Und Hörforschungszentrum (THRC) der HNO – Universitätsklinik Tübingen |
| 2004 - 2006 | Gastwissenschaftlerin (Promotion) am Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Toxikologie und Genetik, Prof. Dr. Harald Krug und Prof. Dr. Uwe Strähle |