Universität Ulm

Institut für Angewandte Physiologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Frank Lehmann-Horn

BAPTA-induzierte Schädigung und Regeneration kochleärer Haarbündel in der frühen postnatalen und adulten Säuger-Kochlea; eine vergleichende morphologische und funktionelle Studie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

vorgelegt von

Jürgen Ebert

aus Schwabmünchen

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Frank Lehmann-Horn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Dietl
Tag der Promotion: 15.07.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis II
Physikalische Einheiten II
Chemikalien und Lösungen III
1 Einleitung 1
1.1 Morphologie und Entwicklung des Cortischen Organs beim Säugetier 3
1.2 Funktionsweise des Cortischen Organs 7
1.3 Entwicklung der Haarbündel 9
1.4 Schwerhörigkeit 12
1.5 Verlust der Haarbündellinks und Haarbündelregeneration 15
1.6 Modellsystem und Methodenauswahl 16
1.7 Zielsetzung 18
2 Material und Methoden 19
2.1 Rasterelektronenmikroskopie 19
2.2 Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie – eine Steifigkeitsmessung ohne mechanische Einflussnahme 20
2.3 Messung der Funktion des mechanoelektrischen Transduktionsapparats mittels Einstrom von FM 1-43FX 38
2.4 Lösungen und Inkubation 40
2.5 Tiere und Haltung 41
2.6 Herstellung organotypischer Kulturen 41
3 Ergebnisse 43
3.1 Entwicklung kochleärer Haarbündel der Wistar Ratte 43
3.2 Morphologische Veränderungen der Haarbündel äußerer Haarsinneszellen nach Zugabe von BAPTA 50
3.3 Regeneration der durch BAPTA zerstörten Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen 56
4 Diskussion 76
4.1 Entwicklung der Haarbündelmorphologie und Haarbündellinks der Wistar Ratte 76
4.2 Regenerationsfähigkeit der postnatalen und adulten Haarsinneszellen 80
4.3 Induktion von Regeneration adulter Haarsinneszellen beim Säuger 85
4.4 Perspektive 86
5 Zusammenfassung 87
6 Literaturverzeichnis 89
7 Danksagung 96
8 Lebenslauf 97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.D.	Außendurchmesser
AFM	Atomic-force-microscopy
BM	Basalmembran
ca.	circa
CCD-Kamera	Charge-coupled device Kamera
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DZ	Deiterszellen
IHC/IHZ	"inner hair cell" (innere Haarsinneszelle)
Kc	Kinozilium
MET	Mechanoelektrischer Transduktionskanal
Mic	Mikrovilli
OHC/ÄHZ	"outer hair cell" (äußere Haarsinneszelle)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RPX	Wistar Ratten am Tag X nach Geburt
SD	Standardabweichung
St	Stereozilium
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TM	Tektorialmembran
TTS	temporary threshold shift (vorübergehende Hörminderung)
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization

Physikalische Einheiten

°C	Grad Celsius
eV	Elektronenvolt
h	Stunde
H	Energie
Hz	Hertz
k	Steifigkeit [N/m]
K_B	Boltzmann Konstante
kHz	Kilohertz
l	Liter
m	Meter
M	Masse

min	Minute
mM	Millimolar
mOsmol	Milliosmolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
N	Newton
nm	Nanometer
pH	"pondus hydrogenii" (Maßeinheit für die Wasserstoffionenkonzentration in einer Lösung)
T	absolute Temperatur
v	Resonanzfrequenz
V	Volt
x	mittlere Auslenkung von der Ruhelage
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

Chemikalien und Lösungen

BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
Ca^{2+}	Kalzium
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DHSM	Dihydrostreptomycin
Ex0	Extrazellulärlösung
FKS	Fetales Kälberserum
HEPES	N-(2-hydroxyethyl) 1-Piperazino-N-2-Ethansulfonsäure
K^+	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
MEM	Minimal essential medium
Mg^{2+}	Magnesium
Na^+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OsO_4	Osmiumtetroxid
PBS	Phosphate Buffered Saline

1 Einleitung

Von vielen Menschen wird das Hören als die wichtigste Sinnesfunktion und der Verlust des Gehörs als schwerwiegender Einschnitt im Leben empfunden. Dadurch ist das Ohr schon seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung, die momentan weder die Physiologie des Hörvorgangs noch die Pathophysiologie der Schwerhörigkeit befriedigend erklären kann.

Der Hörvorgang lässt sich in mehrere Komponenten unterteilen: die Schallleitung im Mittelohr, die Schallverstärkung und Schalldetektion sowie die neuronale Kodierung im Innenohr (siehe Abb. 1.1). Bekannt ist der Aufbau des Mittelohres und seine Funktion bei der Schallleitung über die Gehörknöchelchen mit der Impedanzanpassung. Die Grundlagen unseres Verständnisses von der Schallverstärkung und Schalldetektion, die im Cortischen Organ des Innenohres stattfinden, wurden in Helmholtz' Resonanztheorie von 1863 gelegt. In dieser wird die tonotopische Gliederung des Cortischen Organs und der Prozess der Schallverstärkung dadurch erklärt, dass die Basilarmembran des menschlichen Innenohres aus einer Vielzahl querverlaufender, unterschiedlich stark gespannter Fasern bestehe, von denen jede eine ihr eigene Resonanzfrequenz besitze und nur dann in passive Schwingungen geräte, wenn der eintreffende Schall genau ihrem jeweiligen Spektrum entspräche. Die tonotopische Gliederung gilt heute als gesichert, jedoch werden die Resonanzschwingungen inzwischen als aktiver Prozess der äußeren Haarsinneszellen angesehen. Diesem Zelltyp wird insgesamt eine tragende Rolle im Hörvorgang zugeschrieben, obwohl ihre exakte Funktionsweise ebensowenig bekannt ist wie ihr molekularer Aufbau. Vermutlich ist ihre Schädigung auch ursächlich oder mitverantwortlich für chronische Erkrankungen wie M. Menière, Tinnitus, Alters- oder Lärmschwerhörigkeit.

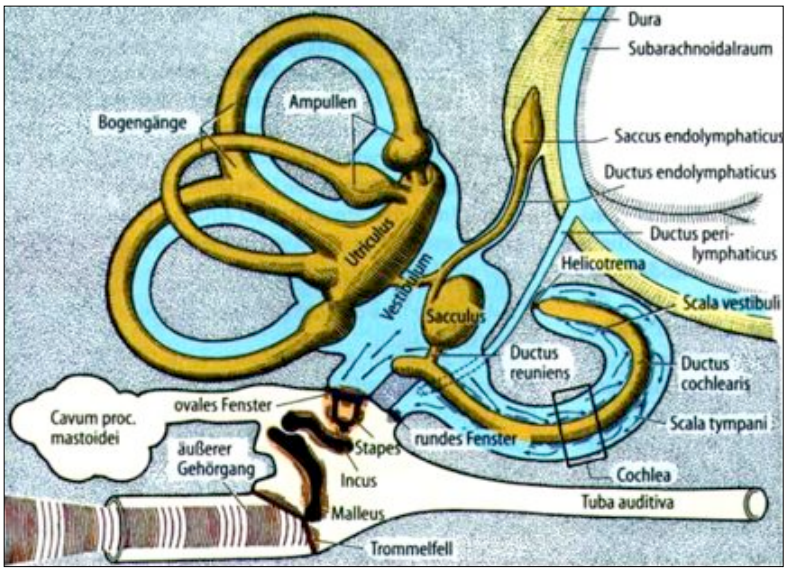

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Gehörs mit Teilen des äußeren Ohres, dem Mittelohr und dem Innenohr Über das Trommelfell und die Gehörknöchelchen gelangt die Schallwelle in das Innenohr zu den sensorischen Zellen der Kochlea, den Haarsinneszellen, die sich im Cortischen Organ befinden. Das Gleichgewichtsorgan bestehend aus den Bogengängen, den Ampullen, sowie Utriculus und Sacculus ist für die Detektion von Dreh- und Linearbeschleunigung verantwortlich. (aus: [Junqueira L. C. et al (2002), Abb. 23.30])

Schädigungen der Haarsinneszellen der Säugetiere gelten bisher als irreversibel, ebenso wie die daraus folgende Dysfunktion des Innenohres. Dies zeigen in-vivo-Experimente bei adulten Ratten, bei denen nach Injektion eines Kalziumchelators in die Scala media keine Besserung der Hörfähigkeit nachzuweisen ist [Sellick P. M. (2007)]. Jedoch gibt es in der Literatur einen Hinweis darauf, dass auch bei Säugern die Haarsinneszellen nach Schädigung durch einen Kalziumchelator innerhalb von 24 Stunden regenerieren können [Gale J. E. et al (2001)]. Wenn sich diese Hinweise erhärten sollten, würde das ein neues Licht auf die Therapiemöglichkeiten der bisher als irreversibel angesehenen Erkrankungen des Innenohres werfen.

In dieser Arbeit soll eine systematische Analyse durchgeführt werden, die erstmalig beim Säuger anhand von morphologischen, mechanischen und funktionellen Parametern die Regenerationsfähigkeit von äußeren Haarsinneszellen an einem Modellorganismus untersucht. Die folgenden Kapitel sollen eine Übersicht über den Aufbau und die Funktionsweise des Cortischen Organs, die Vor- und Nachteile des Modellorganismus, sowie die verwendeten Methoden geben.

1.1 Morphologie und Entwicklung des Cortischen Organs beim Säugetier

Das Cortische Organ liegt in der Schnecke des Innenohres und stellt den Ort der Schallverstärkung und -empfindung dar. Es befindet sich innerhalb des Endolymphschlauchs (Ductus cochlearis), der zwischen der Scala vestibuli und Scala tympani eingebettet ist. Der Querschnitt das Cortische Organ (siehe Abb. 1.2 und Abb. 1.3) zeigt die Basilarmembran als untere Begrenzung. Auf ihr liegen insgesamt vier Reihen sensorischer Haarsinneszellen, die von Stützzellen, zu denen die Deiterszellen, innere und äußere Pfeilerzellen, Hensenzellen und Claudiuszellen gehören, umschlossen werden. Die drei Reihen äußerer Haarsinneszellen (OHC) sind für die aktive Verstärkung des Schalls sowie für die Frequenzselektivität des Hörprozesses verantwortlich; die Reihe der inneren Haarsinneszellen (IHC) für die Transduktion der Endolymphströmung in elektrische und chemische Signale.

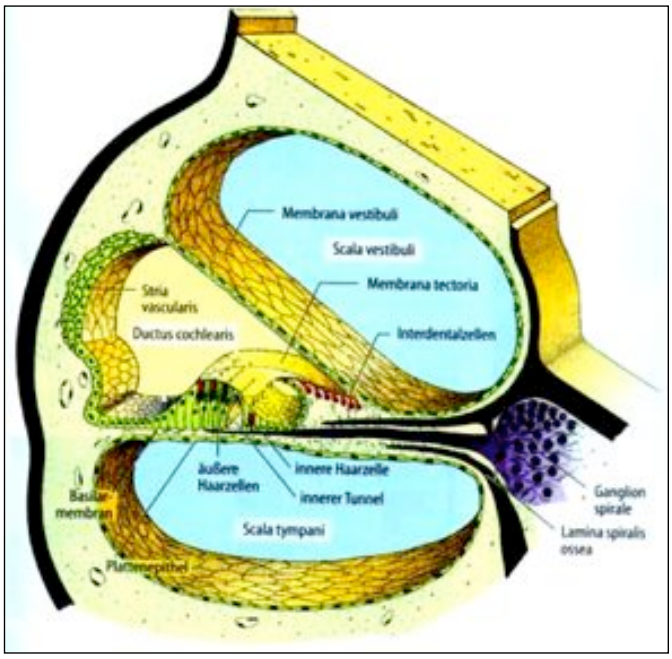

Abb. 1.2 Querschnitt durch das intakte Cortische Organ
(aus: [Junqueira L. C. et al (2002), Abb. 23.31])

Die menschliche Kochlea besitzt circa 3 500 innere und 12 000 äußere Haarsinneszellen [Yamasoba T., Kondo K. (2006)], an deren apikaler Spitze sich jeweils bis zu 100 Stereozilien befinden, die beim Menschen in bis zu fünf Reihen V-förmig angeordnet sind. Bei der Wistar Ratte bestehen die Haarbündel lediglich aus drei Stereozilienreihen (siehe Abb. 1.4). Innerhalb eines Bündels werden die Stereozilien von Reihe zu Reihe länger, wobei jeweils ein kurzes mit einem längeren Stereozilium durch ein Filament (Tip-Link) verbunden ist (siehe Abb. 1.5). Die Stereozilien sind beim nicht voll entwickelten Haarbündel durch Lateral-Links (siehe Abb. 1.5) und bei erwachsenen Säugern durch Top-Connectors untereinander vernetzt. Über den Haarsinneszellen liegt als gallertige Masse die Tektorialmembran (TM). Sie steht beim Menschen ab der Geburt in Kontakt mit der langen Reihe der Stereozilien der äußeren Haarsinneszellen. Kein Kontakt besteht zwischen der Tektorialmembran und den inneren Haarsinneszellen.

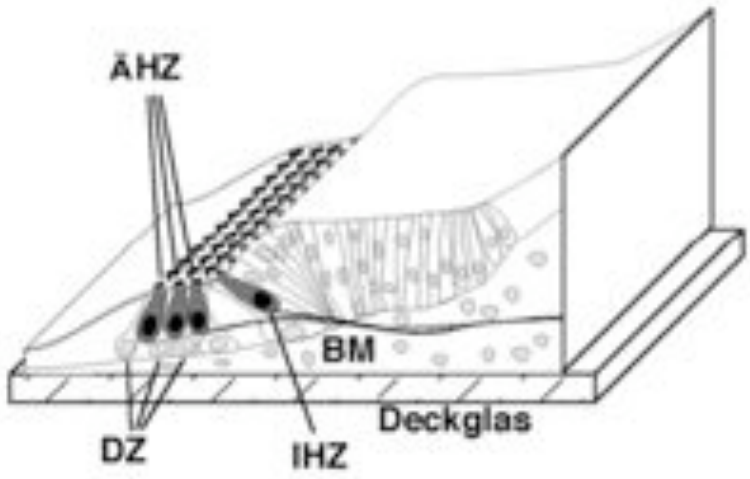

Abb. 1.3 Ausschnitt aus dem Cortischen Organ, wie es sich durch Präparationstechnik nach Sobkowicz H. M. et al (1975), sowie Russell I. J. und Richardson G. P. (1987) darstellt ÄHZ: äußere Haarsinneszellen mit den Haarbündeln, IHZ: innere Haarsinneszellen, DZ: Deiterszellen, BM: Basilarmembran, Die Tektorialmembran ist nicht gezeigt. Sie liegt als gallertige Masse über den äußeren und inneren Haarsinneszellen und steht in Kontakt mit den Stereozilien der äußeren Haarsinneszellen. (aus: [McPhee J. R., Van De Water T. R. (2001)] und [Glowatzki E. et al (1995)])

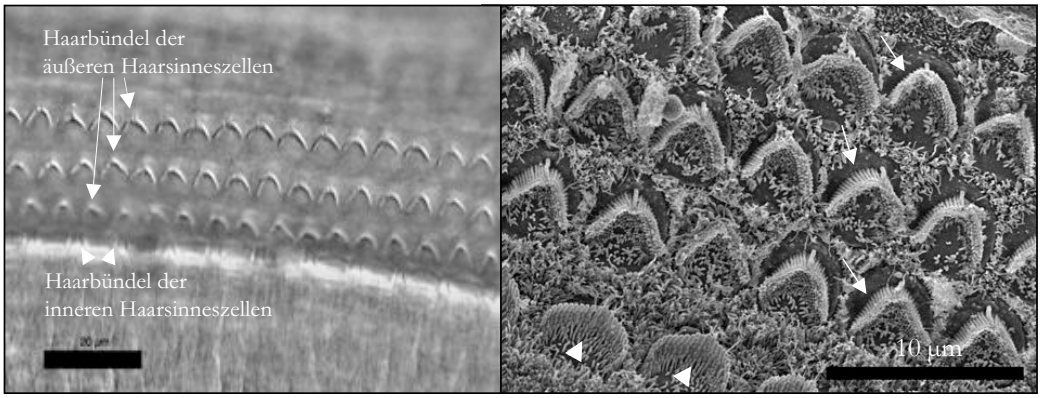

Abb. 1.4 Lichtmikroskopische (links) und rasterelektronenmikroskopische (rechts) Aufnahme des Cortischen Organs der Wistar Ratte am dritten Tag nach Geburt Zu sehen ist jeweils der apikale Abschnitt des Cortischen Organs mit den drei Reihen äußerer Haarsinneszellen mit ihren V-förmigen Haarbündeln (→). Jedes dieser Haarbündel besteht aus circa 100 Stereozilien, die in drei Reihen mit aufsteigender Länge angeordnet sind. Die zylinderförmigen Zellkörper der inneren Haarsinneszellen liegen um etwa 60° gedreht, so dass die Stereozilien der ebenfalls V-förmigen Haarbündel der inneren Haarsinneszellen (Δ) nahezu parallel zur Bildebene liegen. Die Tektorialmembran ist entfernt.
(µm: Mikrometer)

Die Entwicklung des äußeren und inneren Ohres und des Gleichgewichtsorgans ist sehr komplex. So geht das äußere Ohr und das Epithel des Trommelfells aus einer ektodermalen Ausstülpung hervor, die Tuba auditiva entwickelt sich aus Entoderm der ersten Schlundtasche, Hammer, Amboss und Steigbügel entstammen unterschiedlichen embryonalen Knorpelanlagen des ersten und zweiten Kiemenbogens.

Das komplette Innenohr entwickelt sich aus zwei ektodermalen Verdichtungen, den Ohrplakoden [Barald K. F., Kelley M. W. (2004)], die schon früh in ihrer Entwicklung von der ursprünglichen äußeren Schicht in die Pars petrosa des Os temporale absteigen [Kelley M. W. (2006)]. Dort differenzieren sich Neuroblasten, die in der weiteren Entwicklung das Ganglion spirale cochleae und das Ganglion vestibulare bilden [Rubel E. W., Fritzsch B. (2002)]. Otozysten der Ohrplakoden wandern aus, um die Endolymphschläuche des Cortischen Organs und des Gleichgewichtsorgans zu bilden. Die Differenzierung der Vorläuferzellen ist von vielen Genen reguliert. Entscheidend für die Entwicklung der Haarsinneszellen scheint Atoh1 (= Math1) zu sein [Izumikawa M. et al (2005)], [Bermingham N. A. et al (1999)]. Aber auch andere Gene, die für die korrekte Entwicklung des Innenohres verantwortlich sind, sind bekannt. Knockoutmäuse mit Deletion des Gens, das für Hes1 kodiert, bilden vermehrt innere Haarsinneszellen, Mäuse mit defektem Hes5-Gen mehr äußere Haarsinneszellen [Zine A. et al (2001)]. $p27^{Kip1}$ –defiziente Tiere bilden vermehrt Haarsinneszellen und Stützzellen. Obwohl diese Zellen morphologisch normal erscheinen, zeigen die Tiere allerdings patholo-

gische evozierte Potentiale und pathologische otoakustische Emissionen [Chen P., Segil N. (1999)], [Lowenheim H. et al (1999)]. Die Transkription von $p27^{Kip1}$ erfolgt bei einer bestimmten Anzahl an Vorläuferzellen. Erst nach der Proliferationsphase erfolgt die Differenzierung [Lee Y. S. et al (2006)]. Haarsinneszellen sind die ersten Zelltypen, die in dem werdenden Organ zu erkennen sind. Bei Säugetieren ist die Mitte des basalen Abschnitts des Cortischen Organs stereotyp am weitesten entwickelt. Je weiter apikal die Haarsinneszellen liegen, desto weniger ist die Entwicklung fortgeschritten [Ruben R. J. (1967)], [Lanford P. J. et al (1999)]. Sowohl die Stützzellen, als auch die sensorischen Haarsinneszellen entwickeln sich aus den gleichen Vorläuferzellen, den Otozysten. Der Transkriptionsfaktor Prox1, dessen Expression in äußeren Haarsinneszellen zu deren Degeneration führt, ist vermutlich für die Entwicklung der Stützzellen verantwortlich [Kirjavainen A. et al (2008)].

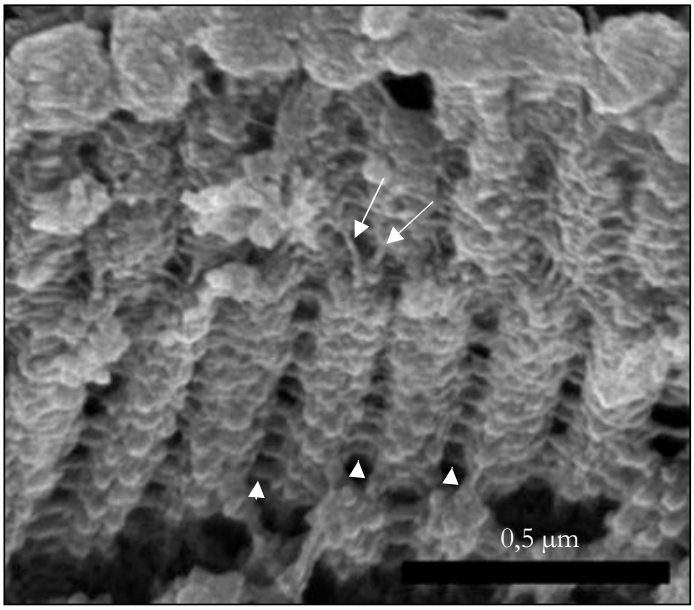

Abb. 1.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer äußeren Haarsinneszelle im medialen Abschnitt des Cortischen Organs Gezeigt ist das Haarbündel einer Wistar Ratte am dritten bis vierten Tag nach der Geburt. Tip-Links (→) verbinden die Spitze der kürzeren Stereozilien mit dem jeweiligen Schaft des benachbarten, längeren Stereoziliums. Sie werden bei Auslenkung des Haarbündels gespannt oder entspannt und öffnen oder schließen dadurch die Kanäle des mechanoelektrischen Transduktionsapparates. Lateral-Links (Δ) vernetzen Stereozilien untereinander und sorgen für eine erhöhte Steifigkeit des Verbundes.
(μm: Mikrometer)

1.2 Funktionsweise des Cortischen Organs

Aufgabe des Cortischen Organs ist es, die mechanischen Schwingungen des Schalls in elektrische und chemische Signale umzuwandeln, die von der primären Hörrinde und nachgeschalteten Zentren des Gehirns interpretiert werden können. Diese Transduktionsleistung wird von hochspezialisierten Zellen des Innenohres übernommen, den Haarsinneszellen.

Charakteristisch für das Cortische Organ der Säugetiere ist die Differenzierung der Haarsinneszellen in innere und äußere, die jeweils unterschiedliche Funktionen im Hörprozess einnehmen. Die äußeren Haarsinneszellen sind für die tausendfache Verstärkung des eintreffenden Schalls verantwortlich, der zu einer Wanderwelle auf der Basilarmembran führt. Sie sind bereits tonotopisch angeordnet und verstärken nur Schall ihrer spezifischen Resonanzfrequenz. An der Basis der Basilarmembran werden die hohen Töne verstärkt, an der Schneckenspitze die tiefen. Das Frequenzband des Menschen erstreckt sich von 20 Hz bis maximal 20 kHz. Durch die aktive Verstärkung der äußeren Haarsinneszellen nimmt die Flüssigkeitsströmung der Endolymphe unter der Tektorialmembran massiv zu. Bei hohem Schalldruck können die äußeren Haarsinneszellen dämpfend wirken. Unklar ist bislang noch, ob die tragende Rolle bei der Verstärkung bzw. Dämpfung von dem Haarbündel ausgeht [Crawford A. C., Fettiplace R. (1985)] oder von den Haarzellkörpern [Mellado Lagarde M. M. et al (2008)]. Die inneren Haarsinneszellen detektieren die Flüssigkeitsströmung durch Haarbündelauslenkung, depolarisieren und leiten diese Information an das Gehirn weiter.

Diese Leistung der Haarsinneszellen wird durch eine Vielzahl an Stereozilien ermöglicht, die durch feine Filamente ("Links") untereinander vernetzt sind. Diese Links sind ein entscheidender Teil des komplexen Aufbaus, der die erstaunlich hohe Sensitivität der Haarsinneszellen gegenüber mechanischen Reizen sicherstellt. So nehmen die äußeren Haarsinneszellen des menschlichen Gehörs bereits Schwingungen der Basilarmembran mit einer Amplitude von 10^{-10} m wahr und verstärken diese [Schmidt R. F., Thews G., Lang F. (2000)]. Die Tip-Links verbinden die Spitze eines Stereoziliums mit einem benachbarten, längeren Stereozilium. Bei Deflektion der Haarbündel in Richtung der längeren Stereozilien werden die Tip-Links gespannt, es kommt zu einem nichtselektiven Einstrom von Kationen und zu einer Depolarisation der äußeren Haarsinneszellen. Gegenläufige Bewegungen führen zum Verschluss der Kanäle und zu einer Hyperpolarisation der Zellen. Die Tip-Links stellen in diesem Prozess entweder selbst die nötigen elastischen Elemente dar, die bei Auslenkung der Haarbündel gespannt werden, oder sie sind an andere elastische Elemente gekoppelt [Assad J. A. et al (1991)]. Ihre molekulare Struktur ist bis heute unbekannt.

Die Funktion der übrigen Links wie Lateral-Links und Top-Connectors ist bis heute noch nicht eindeutig beschrieben. Vermutlich spielen sie keine direkte Rolle in dem beschriebenen Transduktionprozess, sondern sind für die Stabilität und die Entwicklung der Haarbündel verantwortlich (siehe Kapitel 1.3).

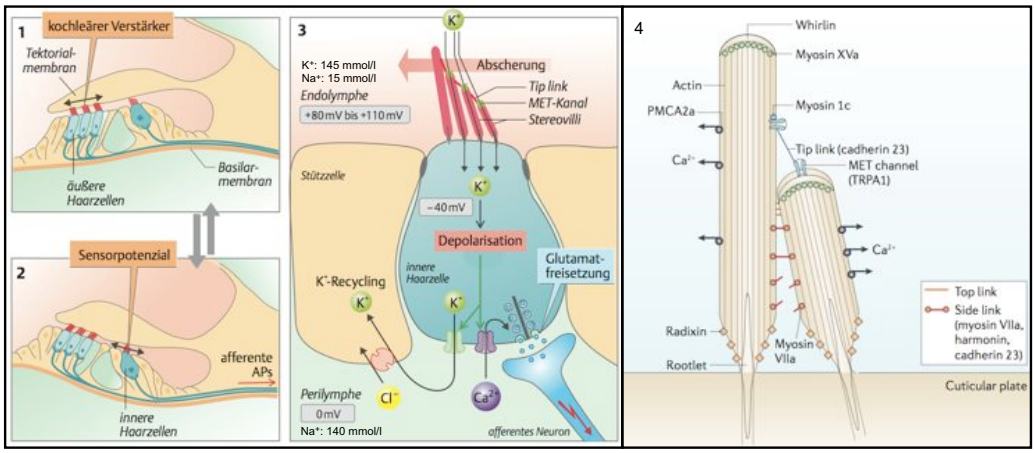

Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Funktionsweise des Cortischen Organs 1 und 2) Die äußeren Haarsinneszellen wirken als Verstärker der Wanderwelle der Basilarmembran. Dies führt zu einer Flüssigkeitsströmung unter der Tektorialmembran und zur Auslenkung der inneren Haarsinneszellen. 3) Darstellung des Transduktionsprozesses; Bei exzitatorischer Abscherung des Haarbündels werden die Tip-Links gespannt, was zur Öffnung des mechanoelektrischen Transduktionskanals und aufgrund der Potentialdifferenz zwischen Endo- und Perilymphe zum nichtselektiven Einstrom von Kationen führt. Die sensorische Haarsinneszelle depolarisiert. 4) Darstellung der Verbindung zweier Stereozilien über einen mechanoelektrischen Transduktionsapparat. Das Tip-Link ist mit mechanoelektrischen Transduktionskanälen verbunden, die über Myosin-Moleküle an dem Aktinzytoskelett der Stereozilien verschieblich befestigt sind. Bekannte Komponenten des Tip-Links sind Cadherin 23 und Protocadherin 15.
(APs: Aktionspotentiale; MET-Kanal: mechanoelektrischer Transduktionskanal; Ca^{2+} : Kalzium; Cl^- : Chlorid; K^+ : Kalium; Na^+ : Natrium; mV: Millivolt; PMCA2a: plasma membrane CaATPase pump; TRPA1: transient receptor potential channel A1; Bild 1,2,3: aus [Silbernagl S., Despopoulos A. (2007), Table 12.31]; Bild 4: aus [Fettiplace R., Hackney C. M. (2006)])

1.3 Entwicklung der Haarbündel

1.3.1 Entwicklung und Struktur der Haarbündellinks

Wie in Kapitel 1.2 bereist angedeuted wurde, spielen die Haarbündel mit den vernetzenden Links eine herausragende Rolle im Transduktionsprozess. Unterschiedliche Links vernetzen die Stereozilien der äußeren Haarsinneszellen, von denen manche nur während bestimmter Phasen der Entwicklung und andere dauerhaft vorhanden sind. Einige Studien zeigen, dass sie bereits zu einem frühen Zeitpunkt für die korrekte Haarbündelstruktur und Entwicklung entscheidend sind [Ahmed Z. M. et al (2003)], [Hampton L. L. et al (2003)]. Es ist aber nur wenig über den genauen Aufbau und die exakte Funktion der einzelnen Link-Typen bekannt.
Bei jungen Tieren zeigen sich bis zum Alter von fünf Tagen Tip-Links und Lateral-Links. Die Lateral-Links verbinden die benachbarten Stereozilien entlang des gesamten Schafts. Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl der Lateral-Links ab. Des Weiteren besitzen Mäuse vom zweiten bis zum neunten Tag die sogenannten Ankle-Links, die die Stereozilien an deren Basis verbinden [Goodyear R. J. et al (2005)]. Bei der erwachsenen Säugerkochlea finden sich direkt unter den Tip-Links horizontale Verbindungen, die Top-Connectors, die vermutlich für die Stabilität verantwortlich sind [Goodyear R. J. et al (2005)]. Die Autoren beschreiben bei erwachsenen Mäusen ab dem 19. Tag nach ihrer Geburt keine weiteren Links neben den Tip-Links und den Top-Connectors.
Tip-Links haben eine Länge von 150 nm bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration von 2 mM. Mit abnehmender Kalziumkonzentration werden die Tip-Links länger. Bei 1 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration sind sie bereits 164 nm lang [Furness D. N. et al (2008)]. Tip-Links sind während der gesamten postnatalen Entwicklung der Haarsinneszellen vorhanden. Vermutlich sind sie aus Glykoproteinen zusammengesetzt. Bekannt sind inzwischen zwei Komponenten: Cadherin 23 und Protocadherin-15. Das Molekül Cadherin 23 ist an dem Stereozilienschaft in der Tip-Link Region und am oberen Abschnitt des Tip-Links lokalisiert [Siemens J. et al (2004)], [Söller C. et al (2004)], [Kazmierczak P. et al (2007]. Cadherin 23 ist zu Beginn der Entwicklung an der gesamten Oberfläche der Haarbündel nachzuweisen. Mit zunehmender Entwicklung ist die Ausbreitung des Moleküls auf die Stereozilienspitzen beschränkt. Dies gilt als Hinweis darauf, dass während der Entwicklung Tip-Links oder Tip-Link-Komponenten in großer Anzahl produziert und regeneriert werden können. Möglicherweise kommt dieser Erneuerungsprozess mit fortschreitender Entwicklung zum Erliegen, da die einzelnen Komponenten der Tip-Links zu weit voneinander entfernt sind [Pickles J. O. et al (1991)], [Michel V. et al (2005)]. Das Molekül Protocadherin-15 konnte in der unteren Tip-

Link-Region nachgewiesen werden [Ahmed Z. M. et al (2006)], [Kazmierczak P. et al (2007)]. Detailansichten zeigen, dass das Tip-Link im unteren Abschnitt aus zwei umeinandergewundenen Filamenten besteht. Im oberen Abschnitt teilt sich das Tip-Link in zwei Äste auf [Furness D. N. et al (2008)]. Die Filamente sind wahrscheinlich durch das Protein Harmonin miteinander verbunden [Boeda B. et al (2002)]. Wichtig für die Funktion der Tip-Links im Transduktionsprozess sind Myosin-Moleküle. Myosin XVa wurde an der Stereozilienspitze nachgewiesen, Myosin VI und Myosin VIIa befinden sich zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Membran an den Stereozilienschäften [Rzadzinska A. K. et al (2004)]. Obwohl sich Myosin VIIa nicht in der MET-Region befindet, hat es einen großen Einfluss auf die Sensitivität des MET-Apparates [Rhodes C. R. et al (2004)]. Vermutlich erzeugt Myosin VIIa über Lateral-Links die nötige Spannung des gesamten Haarbündels [Henn A., De La Cruz E. M. (2005)]. Bislang ist nicht exakt bekannt, welches Myosin-Molekül das Tip-Link mit dem MET-Kanal im Cortischen Organ des Säugers verbindet. Einzelne Kandidaten wurden im Vestibularorgan identifiziert, konnten aber nicht im Cortischen Organ nachgewiesen werden [Fettiplace R., Hackney C. M. (2006)].

1.3.2 Entwicklung des Aktin-Zytoskeletts der Stereozilien

Parallel zu der Entwicklung der Links durchläuft auch das Zytoskelett einen Entwicklungsprozess. Der Mikrovillirasen, der sich anfangs noch innerhalb des V-förmigen Stereozilienverbundes befindet, bildet sich zurück (siehe Abb. 1.7). Die Dichte der Aktinfilamente innerhalb der Stereozilien nimmt während der ersten Lebenswochen rasant zu (siehe Abb. 1.7). Aus dem lockeren Netz einzelner Filamente entwickelt sich ein dichtgepacktes Netzwerk, das sich an der Stereozilienbasis zu einem Kern verdichtet (siehe Abb. 1.7 d). Demzufolge ist zu erwarten, dass die Steifigkeit eines einzelnen Stereoziliums während der Entwicklung zunimmt. Es ist allerdings unklar, ob auch die Gesamtsteifigkeit des Haarbündels zunimmt, da sich mit der Entwicklung auch die Anzahl der Links verringert und sich deren Lage verändert. Es war bisher nicht möglich, den Anteil der Links an der Gesamtsteifigkeit abzuschätzen.

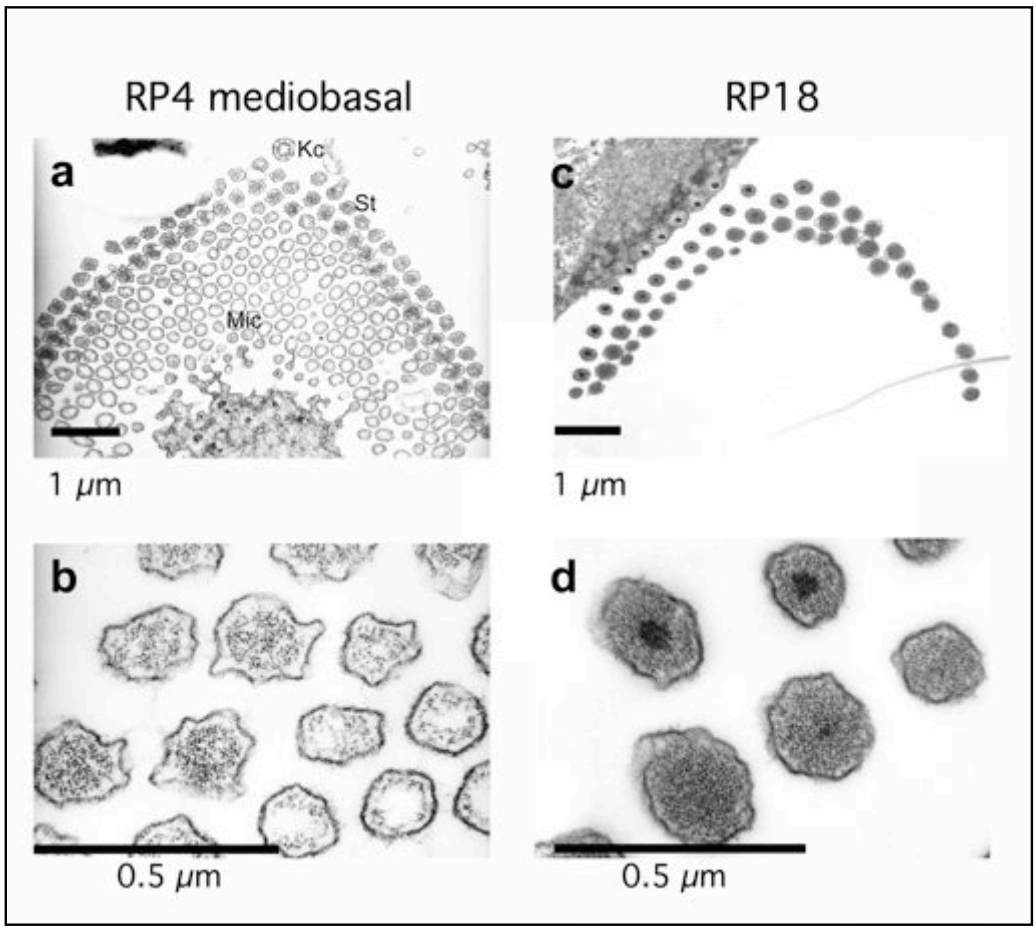

Abb. 1.7 Transmissionselektronenmikroskopische Querschnittsaufnahmen der Stereozilienbasis äußerer Haarsinneszellen des Cortischen Organs a) Bei Wistar Ratten am vierten Tag nach Geburt findet sich am mediobasalen Übergang des Cortischen Organs bereits die V-förmige Struktur der Stereozilien (St). Ein Mikrovillirasen (Mic) liegt noch innerhalb des Stereozilienverbundes. An der Spitze des V befindet sich ein Kinozilium (Kc). b) Unter stärkerer Vergrößerung zeigt sich ein lockeres Netz an Aktinfilamenten an dem gesamten Querschnitt der Stereozilienbasis. Im Gegensatz dazu wird bei den Mikrovilli nur der äußere Rand von Aktin gestützt. c) Die Aufnahmen der adulten Wistar Ratte zeigen die drei Stereozilienreihen. Die Stereozilien sind mit einem dichten Netzwerk aus Aktinfilamenten gefüllt. d) Unter stärkerer Vergrößerung zeigt sich ein dichtes Netzwerk, das sich an der Basis der Stereozilien zu einem Kern verdichtet. Die gefaltete Struktur der Stereozilienmembran entsteht präparationsbedingt durch Lösen von Proteinkomplexen zwischen Aktinfilamenten und Stereozilienmembran mit destilliertem Wasser.
Mit freundlicher Genehmigung von Assen Koitschev und Matthias Langer.
(RP 4: Ratte im Alter von vier Tagen, RP 18: Ratte im Alter von 18 Tagen; µm: Mikrometer; Kc: Kinozilium; St: Stereozilien; Mic: Mikrovilli)

1.4 Schwerhörigkeit

1.4.1 Übersicht

Grundsätzlich wird die Schwerhörigkeit nach dem Ort der Schädigung in Schallleitungsschwerhörigkeit und Schallempfindungsschwerhörigkeit aufgeteilt. Bei der Schallleitungsschwerhörigkeit sind in der Regel das Trommelfell oder die Gehörknöchelchen des Mittelohres defekt, im Fall der Schallempfindungsschwerhörigkeit sind die Zellen des Innenohres oder der Nervus vestibulocochlearis verantwortlich für die Pathologie. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem weiten Feld der Schallempfindungsschwerhörigkeiten. Sie können hereditär auftreten, z.B. durch fehlerhafte Kodierung der für den Hörprozess entscheidenden Proteine. Zu dieser Gruppe zählen das Alport-Syndrom, das Pendred-Syndrom und das Usher-Syndrom. Eine Infektion des Innenohres mit Bakterien (meist durch Fortleitung aus den Meningen) oder Viren (z.B. Zoster oticus) kann ebenfalls zu einer Schallempfindungsschwerhörigkeit führen. Auch Medikamente, wie das Diuretikum Furosemid oder Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside, können das Innenohr schädigen. Schallempfindungsstörungen können auch als Folge chronischer Schädigungen des Innenohres entstehen. Diese treten z.B. im Rahmen des Morbus Menière auf, dessen rezidivierende Anfälle schließlich zu einer Bass-Schwerhörigkeit führen können.

Lärm kann die Zellen des Innenohres ebenfalls schädigen. Hier lassen sich klinisch zwei Subtypen der lärminduzierten Hörminderung differenzieren: die permanente Hörminderung, die durch einen irreversiblen Verlauf gekennzeichnet ist und die vorübergehende Hörminderung (TTS), die sich innerhalb von Tagen vollständig zurückbildet.

Für viele Schädigungen der Schallempfindung gibt es bis heute keine kurativen Behandlungskonzepte. Häufig bleibt als Therapieoption nur das Hörgerät oder das aufwändige Kochlea-Implantat.

1.4.2 Pathophysiologie der lärminduzierten Hörminderung

Trotz einer Vielzahl von Hypothesen für die Mechanismen der Lärmschädigung ist es momentan nicht möglich, die lärminduzierte Hörminderung in vollem Ausmaß zu erklären. Möglich sind Imbalancen des Ionenhaushaltes der Lymphe [Bohne B. A., Rabbitt K. D. (1983)], sowie metabolisch [Lim D. J., Dunn D. E. (1979)], ischämisch [Hawkins J. E. (1971)], [Yamane H. et al (1995)] und mechanisch [Hawkins J. E. (1971)] verursachte, degenerative Schäden des Cortischen Organs. Schwierigkeiten bereitet zudem die Abgrenzung der chronischen Lärmschwerhörigkeit mit einer permanenten Hörminderung von der innerhalb weniger Tage reversiblen Schwerhörigkeit. Es ist unklar, ob sich hinter diesen beiden Erkrankungen die gleiche Pathophysiologie verbirgt.

1.4.2.1 Chronische Lärmschwerhörigkeit - eine permanente Hörminderung

Nach Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leiden weltweit 278 Millionen Menschen an moderatem bis schwerem Hörverlust beider Ohren [WHO (2006)]. Während der Hörverlust in Entwicklungsländern meist durch Infektionen bedingt ist, ist er in Industrie- und Schwellenländern häufig lärminduziert. Viele Länder der Europäischen Union erkennen die chronische Lärmschwerhörigkeit als Berufskrankheit an. Die WHO schätzt, dass circa 25 bis 35 Millionen Menschen in Europa an gefährlich lauten Arbeitsplätzen arbeiten [WHO (1997)]. In Deutschland ist die Lärmschwerhörigkeit die am häufigsten anerkannte Berufskrankheit überhaupt. 60 % aller lärminduzierten Schwerhörigkeiten gelten als berufsbedingt [Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg (2006)]. Jedoch steigt auch der Anteil der nicht beruflich bedingten Lärmschwerhörigkeit immer weiter an. Insgesamt treten in Deutschland jährlich 10 000 neue Fälle von chronischer Lärmschwerhörigkeit auf. Die Therapie erfolgt derzeit lediglich supportiv durch Hörgeräte, deren Träger von mangelnder Klangqualität durch Resonanzen im Gehörgang, Rückkopplungen, Okklusionseffekten durch Abschirmung der tiefen Frequenzen bis hin zu rezidivierenden Gehörgangsentzündungen berichten.

Klinisch imponiert die chronische Lärmschwerhörigkeit, unabhängig von der Art des schädigenden Lärms, durch eine Senke der Hörschwellenkurve bei etwa 4000 Hz (c5-Senke). Diese Senke wird von den Betroffenen besonders störend empfunden, da sie sich im oberen Bereich des Sprachfeldes befindet [Boenninghaus H. G., Lenarz T. (2004)]. Die umschriebene Beeinträchtigung des Hörvermögens bei 4000 Hz geht in den meisten Fällen frühzeitig in einen unspezifischen Abfall des Hörvermögens aller Frequenzen über. Pathophysiologisch scheint vor allem der Funktionsverlust der äußeren Haarsinneszellen bedeutend, der sich in einem positiven Recruitment widerspiegelt [Berghaus A., Rettinger G., Böhme G. (1996)], [Seifert G.

(1999)]. Die äußeren Haarsinneszellen können den Schall geringer Intensität nicht mehr verstärken und den Schall hoher Intensität nicht mehr dämpfen. Der Funktionsverlust der äußeren Haarsinneszellen zeigt sich zudem durch den Ausfall otoakustischer Emissionen, die vermutlich durch Kontraktionen der äußeren Haarsinneszellen zustande kommen [Berghaus A., Rettinger G. Böhme G.], [Boenninghaus H. G., Lenarz T. (2004)].

Es existiert noch eine Vielzahl unbeantworteter Fragen, die sich hauptsächlich durch die unterschiedlichen Bedingungen erklären lassen, unter denen die Lärmschäden bisher untersucht wurden. Reproduzierbar herstellen lassen sich nur wenige Veränderungen. Einige Autoren begründen die permanente Schwerhörigkeit mit dem Haarzelluntergang insbesondere der inneren Haarsinneszellen mit entsprechender Degeneration der Nervenfasern [Libermann M. C., Beil D. G. (1979)]. Andere Autoren sehen als Grund der lärminduzierten Schwerhörigkeit den Funktionsverlust der äußeren Haarsinneszellen. Dazu passt auch das nachgewiesene positive Recruitment und die verminderten otoakustischen Emissionen bei Lärmschwerhörigen. An den äußeren Haarsinneszellen lassen sich mehrere Veränderungen nachweisen, unter anderem Veränderungen der Haarbündelstruktur, wie die elektronenmikroskopisch nachgewiesene Fusion benachbarter Stereozilien, sowie das Umknicken der Stereozilien. Damit diese Haarbündel abknicken können, bedarf es der Veränderung oder des Verlusts der vernetzenden Haarbündellinks. Zudem kommt es zum Abbruch der Aktinfilamentketten innerhalb der Stereozilien, sowie zum Verlust der Quervernetzung der Aktinfilamente [Zenner H. P. (1994)], [Chen Y. S. et al, (2003)].

1.4.2.2 Temporary threshold shift - eine vorübergehende Hörminderung

Der Temporary threshold shift (TTS) zeigt eine vollständige Reversibilität innerhalb weniger Tage. Jedoch sind auch hier die pathomorphologischen Mechanismen nicht exakt bekannt. Bekannt ist, dass der Schweregrad oder die Häufigkeit der vorübergehenden Hörminderung keine Voraussage zulässt, ob sich im weiteren Verlauf ein permanenter Hörverlust entwickeln wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei den beiden Erkrankungen unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen. Zwei Mechanismen werden gegenwärtig diskutiert: eine vorübergehende Ablösung der Tektorialmembran von den Stereozilienspitzen der äußeren Haarsinneszellen [Nordmann A. S. et al (2000)] oder, wie bei der chronischen Lärmschwerhörigkeit, der Verlust der Tip-Links [Zaho Y. et al (1996)].

1.5 Verlust der Haarbündellinks und Haarbündelregeneration

Lange Zeit wurde die Ausdifferenzierung der Kochlea des adulten Säugetieres als abgeschlossen angesehen; die sensorischen Haarsinneszellen galten als unfähig zur Regeneration. Es schien gesichert, dass nur innerhalb einer begrenzten Spanne der Entwicklung Zellteilung, Differenzierung und Strukturaufbau möglich sei, da es bei einer Schädigung der komplexen Struktur der Haarsinneszelle, sei es durch ein akustisches Trauma, durch ototoxische Medikamente, Infektionen oder Autoimmunprozessen zu keiner Reparation des Schadens kommt [Assad J. A. et al (1991)], [Seifert G. (1999)]. Die sensorischen Zellen des Gleichgewichtsorgans zeigen in vivo beim Säuger eine Tendenz zur Reparation und Regeneration [Forge A. et al (1993)]. Dies geschieht durch Transdifferenzierung von Stützzellen in Haarsinneszellen [Li L., Forge A. (1997)] und Neubildung von Stützzellen [Kuntz A. L., Oesterle E. C. (1998)], [Ladrech S. et al (2007)]. Eine Transdifferenzierung von Stützzellen des Cortischen Organs in Haarsinneszellen scheint prinzipiell auch möglich zu sein, wie in Zellkulturen nachgewiesen werden konnte [White P. M. et al (2006)].

Anders ist dies beispielsweise beim Huhn: Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass experimentell zerstörte Tip-Links nahezu vollständig morphologisch und funktionell regenerieren können [Zaho Y. et al (1996)], [Ipakchi R. et al (2005)]. Dadurch stellt sich erneut die Frage, ob die Regeneration der Haarsinneszellen des Cortischen Organs auch bei Säugetieren möglich ist. Hierauf gibt es in der Literatur wenige Hinweise. Zum Beispiel regenerieren durch BAPTA zerstörte Tip-Links bei jungen Mäusen am ersten und zweiten Tag nach der Geburt innerhalb von 24 Stunden, wobei sich eine Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit vom jeweiligen Entwicklungsstadium der Haarbündel zeigt. Die weniger entwickelten apikalen Abschnitte der postnatalen Mäuse regenerieren nahezu vollständig, wohingegen die weiter entwickelten basalen Abschnitte langsamer und weniger stark regenerieren können [Gale J. E. et al (2001)]. Ein weiterer Hinweis auf einen Erneuerungsprozess der Haarbündel ist der Nachweis des ständigen Umbaus des Aktin-Zytoskeletts im Sinne eines Einbaus von Aktin-Monomeren in die Spitzen der Tip-Links [Rzadzinska A. K. et al (2004)]. Ein Experiment an adulten Meerschweinchen, bei denen BAPTA in vivo in die Scala media appliziert wurde, zeigte keine Besserung der erhöhten Hörschwelle nach 24 bis 240 Stunden Regenerationszeit [Sellick P. M. (2007)].

In dieser Arbeit soll die eventuell stattfindende Regeneration bei Säugetieren während der Entwicklung systematisch untersucht werden, indem bei Ratten ein Lärmtrauma mit Zerstörung der Tip-Links simuliert wird. Hierfür eignet sich der Kalzium-Chelator 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure (BAPTA), für den bereits in systematischen

Experimenten gezeigt wurde, dass er die Tip-Links unabhängig von der untersuchten Tierspezies [Gale J. E. et al (2001)], [Zaho Y. et al (1996)], [Assad J. A. et al (1991)] nahezu vollständig zerstört. BAPTA wirkt dabei sowohl extra- als auch intrazellulär und reduziert die Links besser als andere Kalzium-Chelatoren. Neben den Tip-Links reagieren die Ankle-Links ebenfalls sensibel auf BAPTA. Die horizontalen Top-Connectors werden durch BAPTA nicht geschädigt [Goodyear R. J. et al (2005)].

1.6 Modellsystem und Methodenauswahl

1.6.1 Das Cortische Organ der Wistar Ratte als Modellsystem

In dieser Arbeit soll die Regenerationsfähigkeit von Tip-Links, insbesondere während der Entwicklungsphase des Innenohres, genauer untersucht werden. Für diesen Zweck eignet sich die Wistar Ratte sehr gut, da sich ihr Innenohr erst in den ersten zwei Lebenswochen vollständig entwickelt und die Morphologie ihres Cortischen Organs dem menschlichen sehr genau entspricht. Bereits makroskopisch sind Gemeinsamkeiten zu sehen. So windet sich die Gehörschnecke bei beiden Spezies 2,5 Mal um den Modiolus. Auch mikroskopisch entsprechen sich die beiden Organe. Von den insgesamt vier Reihen sensorischer Haarsinneszellen gibt es eine Reihe für die Detektion und drei Reihen für die Verstärkung. Unterschiede gibt es beim Aufbau der Haarbündel. Während beim Mensch bis zu fünf Stereozilienreihen vorkommen, sind bei der Ratte nur drei Reihen beschrieben. Ansonsten sind die Haarbündel in Struktur und Aufbau identisch, was die Wistar Ratte als Modellorganismus auszeichnet und die Ergebnisse auf das menschliche Innenohr übertragbar machen.
Ratten haben einen deutlich höheren Hörbereich als Menschen. Sie können Frequenzen von 250 Hz bis 80 kHz wahrnehmen. Bei Geburt sind die jungen Ratten jedoch taub und das Cortische Organ ist noch wenig entwickelt. Das Hörvermögen erlangen die Ratten am elften bis zwölften Tag nach der Geburt. Das korreliert zeitlich mit dem Abschluss der Entwicklung des Cortischen Organs und des N. auditorius, was sich in messbaren evozierten Hirnstammpotentialen widerspiegelt [Crowley D. H., Hepp-Reymond M. C. (1966)], [Uziel A. et al (1981)], [Blatchley B. J. et al (1987)]. Bei der Wistar Ratte sind die Haarbündel früh nach der Geburt von Mikrovilli umgeben, die sich in der postnatalen Entwicklungsperiode vollständig zurückbilden. An der späteren Spitze der noch nicht entwickelten V-Form der Haarbündel befindet sich ein Kinozilium, das dort nur innerhalb der ersten Lebenstage vorhanden ist. Die Tektorialmembran bedeckt die äußeren Haarsinneszellen am zweiten Lebenstag noch nicht. An den

apikalen Abschnitten spannen sich lediglich einige Fasern über die sensorischen Haarsinneszellen. Die Tektorialmembran entwickelt sich rasch. Am zehnten Tag bedeckt sie die äußeren Haarsinneszellen komplett [Lenoir M. et al (1987)]. Kontakt zu den äußeren Haarsinneszellen hat sie allerdings bereits früher, so dass sie in der Regel nur innerhalb der ersten vier Lebenstage entfernt werden kann, ohne dass Rückstände auf den Haarbündelspitzen verbleiben.

1.6.2 Methodenauswahl

Die Methodenkombination aus drei verschiedenen Methoden wurde zusammengestellt, um die Regenerationsfähigkeit der äußeren Haarsinneszellen umfassend untersuchen zu können. Es handelt sich zum einen um die Rasterelektronenmikroskopie, mit der die Haarbündelmorphologie hochaufgelöst dargestellt werden kann. Zum zweiten wurde die Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie ausgewählt, mit der feine mechanische Veränderungen der Haarbündel detektiert werden können. Mit dieser Methode wird die Brownsche Eigenbewegung des Haarbündels ohne Kontaktaufnahme aufgezeichnet, die als Maß für die Haarbündelsteifigkeit verwendet werden kann. Als dritte Methode wird eine funktionelle Untersuchung des mechanoelektrischen Transduktionsapparats mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX angewandt, die den selektiven Einstrom dieser Substanz durch geöffnete mechanoelektrische Transduktionskanäle in die Haarsinneszellen ausgenutzt. Anhand der Intensität der intrazelluären Fluoreszenz kann die Offenwahrscheinlichkeit des mechanoelektrischen Transduktionsapparats aufgezeichnet werden. Diese Methodenkombination ist das Endergebnis einer Reihe von Experimenten, die im Vorfeld dieser Arbeit vom Verfasser durchgeführt wurden. Hierbei wurden einige Methoden verglichen und evaluiert und schließlich die vorgestellte Kombination, die in der Literatur noch nicht beschrieben ist, als am besten geeignet ausgewählt.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist, die Regenerationsfähigkeit äußerer Haarsinneszellen des Cortischen Organs beim Säuger präzise zu beschreiben. Hierzu wurde vom Verfasser im Vorfeld eine Methodenkombination zusammengestellt, mit der morphologische, mechanische und funktionelle Haarbündeleigenschaften bewertet und verglichen werden können, und die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig zum Einsatz kommen soll.

Im Einzelnen soll diese Arbeit folgendes leisten:

- Sie soll die physiologische Entwicklung der Haarbündel des Cortischen Organs der Wistar Ratte von der Geburt bis ins adulte Stadium darstellen. Für die Beschreibung der Morphologie soll als etablierte Methode die Rasterelektronenmikroskopie Verwendung finden. Die entwicklungsabhängige Haarbündelsteifigkeit soll mittels Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie untersucht werden.
- Die Schädigung der Haarbündel durch den Kalziumchelator BAPTA zur Simulation eines chronischen Lärmschadens soll rasterelektronenmikroskopisch dokumentiert und mit der physiologischen Entwicklung verglichen werden. Die mechanische Auswirkung von BAPTA auf die Haarbündelsteifigkeit soll mittels laserdifferentialinterferometrischen Steifigkeitsmessungen evaluiert werden.
- Die BAPTA-geschädigten äußeren Haarsinneszellen sollen nach Regenerationszeit von sechs bis 22 Stunden erneut untersucht werden, um das Ausmaß der Regeneration feststellen zu können. Bei den rasterelektronenmikroskopischen Daten soll insbesondere die Dichte und Anordnung der vernetzenden Filamente untersucht werden. Laserdifferentialinterferometrische Messungen der Haarbündelsteifigkeit dienen der Auskunft über die Spannung der regenerierten Links. Von besonderem Interesse ist die Regenerationsfähigkeit und Funktionalität der Tip-Links als wichtiger Bestandteil des mechanoelektrischen Transduktionsapparates, die durch den Einstrom von FM 1-43FX in die äußeren Haarsinneszellen sichtbar gemacht wird. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Übereinstimmung beziehungsweise Diskrepanz der morphologischen, mechanischen und funktionellen Ergebnisse.

Diese Arbeit soll ein tieferes Verständnis über den Ablauf und die Qualität der Regeneration, sowie der Transduktionsfähigkeit der regenerierten Haarsinneszellen ermöglichen. Damit soll die Grundlage für weitere Experimente geschaffen werden, die klären könnten, warum die Regeneration bei adulten Säugetieren zum Erliegen kommt und wie das verhindert bzw. rückgängig gemacht werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird sowohl als eigenständige Methode zur Begutachtung der Morphologie und der Link-Dichte, wie auch zur stichprobenartigen Kontrolle der Steifigkeitsmessungen und der Versuche mit FM 1-43FX herangezogen. Sowohl die laserdifferentialinterferometrischen Steifigkeitsmessungen, als auch die Untersuchung der Wirkung von FM 1-43FX setzen eine intakte Haarzellstruktur voraus. Einige Präparate dieser Versuchsreihen werden direkt nach Versuchsende stichprobenartig für die REM fixiert und aufbereitet.

Zur morphologischen Beurteilung der Tip-Links, Lateral-Links und Top-Connectors werden die organotypischen Kulturen direkt nach der Präparation (siehe Kapitel 2.6) und Behandlung mit 5 mM BAPTA-Lösung bzw. Kontrolllösung (siehe Kapitel 2.4), oder erst nach einer Regenerationszeit von 6-20 Stunden bei 37,2 °C und 5 % CO_2 (siehe Kapitel 2.6) für die Rasterelektronenmikroskopie aufbereitet.

Die Vorfixierung zum Erhalt der Strukturen erfolgt bei Raumtemperatur in N-(2-hydroxyethyl) 1-Piperazino-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES)-gepufferter 2 %-iger Glutaraldehydlösung (300 - 340 mOsm/l, pH 7,2) über mindestens 4 Stunden. Es schließen sich drei 10-minütige Waschschritte in PBS oder 0,25 M HEPES-Lösung (pH 7,2) an. Das Präparat wird in 1 %-iger OsO_4 – Lösung (in PBS) bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss über zwei Stunden nachfixiert und in destilliertem Wasser dreimal jeweils 10 Minuten gewaschen. Es folgen schrittweise Dehydrierungen in 30, 50, 70, 80, 96, 100 und 100 %-igem Ethanol und eine Kritische-Punkt-Trocknung unter CO_2 und finalem "besputtern" des Präparats mit einer 2-5 nm dicken Platin-Schicht.

Bei dem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S 5200, Japan) handelt es sich um ein Inlense-Mikroskop mit kalter Feldemissionselektrode. Die Beschleunigung der Elektronen erfolgt mit 3 Kilovolt. Zur guten topographischen Abbildung des Präparats werden nur Sekundärelektronen (< 50 eV) zur Bildgewinnung verwendet.
Die Untersuchungen erfolgten in direkter Zusammenarbeit mit Stefan Fink und Paul Walther.

2.2 Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie - eine Steifigkeitsmessung ohne mechanische Einflussnahme

In dieser Arbeit sollen sehr geringe Steifigkeitsänderungen der Haarbündel nachgewiesen werden, die durch das Vorhandensein oder Fehlen feiner Links zwischen den Stereozilien zustande kommen. Dabei ist es wichtig, nicht durch Berührung der Stereozilien Adaptationsprozesse zu induzieren. Die in dieser Arbeit angewandte Methode der Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie ermöglicht es, sowohl passive mechanische Eigenschaften, wie auch aktive Bewegungen des Haarbündels mit sehr hoher Auflösung (RMS-Noise = 200 nm_{RMS}) und mit sehr hoher Geschwindigkeit (Bandbreite 10 Hz bis 10 kHz) aufzunehmen, ohne durch Kontakt mit dem Präparat die Messergebnisse zu beeinflussen.

2.2.1 Prinzip der Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie - vom Brownschen Rauschen zur Steifigkeit

2.2.1.1 Das Prinzip

Das Detektionsprinzip der Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie beruht auf dem Phasenkontrast, der zwischen zwei polarisierten Lichtstrahlen beim Durchtritt durch zwei optisch unterschiedlich dichte Medien entsteht: Linear polarisiertes Licht wird durch ein Nomarski-Prisma in zwei zirkulär polarisierte Strahlen aufgespaltet. Beim Durchlaufen durch ein Präparat wird abhängig von der Dichte des Mediums die Polarisationsrichtung gedreht. Beim Zusammenführen der beiden Strahlen durch ein weiteres Nomarski-Prisma führt dies zu einer Intensitätsminderung. Bewegungen eines optisch dichten Mediums von einem Strahlengang zum anderen erzeugen so Intensitätsschwankungen, die in einem photosensitiven Detektor zu Spannungsänderungen führen [Denk W. et al (1989)].

2.2.1.2 Kalibrierung der Messung und Berechnung der Steifigkeit

Die Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie wird in dieser Arbeit verwendet, um die Brownsche Eigenbewegung der Stereozilien aufzuzeichnen und um deren Steifigkeit zu berechnen. Bei der Messung werden die Stereozilien als lineare, harmonische Oszillatoren betrachtet (siehe Kapitel 2.2.5). Für die Berechnung ist es nötig, dass die detektierten Brownschen Eigenbewegungen, die als Spannungsänderung in Millivolt vorliegen, kalibriert und in absoluter Bewegung in Nanometern ausgedrückt werden. Das geschieht mit Hilfe einer Kalibrierkurve (siehe Abb. 2.6), bei der der Laserfokus auf die Kante der untersuchten Struktur positioniert wird, so dass eine Bewegung des Präparates zu einer starken Intensitätsänderung auf dem positionsempfindlichen Detektor führt. Die absolute Wegdifferenz wird durch eine Bewegung der Probe mittels eines linearisierten, kalibrierten Piezo-Tisches orthogonal zu der Kante der untersuchten Struktur um eine definierte Strecke bei stationärem Laserstrahl ermittelt. Die Bewegung (x-Auslenkung) des Piezo-Tisches in Nanometern ist bekannt. Gemessen wird nun die Lichtintensität in Abhängigkeit von der Positionierung auf der x-Achse. An der steilsten, linearen Stelle der Kalibrierkurve wird das thermische Brownsche Rauschen aufgezeichnet (siehe Abb. 2.6). Es zeigt sich in Form von Intensitätsschwankungen, die mit Hilfe der Kalibrierkurve in absoluten Bewegungen als Schwingungen um die mittlere Ruhelage ausgedrückt werden.

Von dem zeitabhängigen Rauschen wird das Leistungsspektrum (mittels Fourier Transformation) in Abhängigkeit von der Frequenz berechnet (siehe Abb. 2.8). Die weitere Berechnung fußt auf dem Äquipartitionsprinzip, das besagt, dass jeder Freiheitsgrad im thermischen Gleichgewicht eine mittlere potentielle Energie von $H = \frac{1}{2} \kappa_B T$ besitzt [Maghelli N. (2005)]. Bei einem harmonischen Oszillator, der in einer Ebene schwingt, wie dies bei Haarbündeln (siehe Kapitel 2.2.5) und bei Atomic-force-microscopy-Sensoren (AFM-Sensoren) der Fall ist, gilt für die Energie (H): $H = \frac{1}{2} k x^2 = \frac{1}{2} \kappa_B T$.

Die Steifigkeit (k) wird nach folgender Formel berechnet:

Formel 1: $k = \kappa_B T / x^2$

κ_B steht für die Boltzmann Konstante, T für die absolute Temperatur und x vertritt die mittlere Auslenkung von der Ruhelage. x^2 errechnet sich durch das Integral des Powerspektrums [Denk W. et al (1989)].

2.2.1.3 Korrektur eines systematischen Fehlers - das Hintergrundrauschen

Das gemessene Rauschen setzt sich aus der Summe des gesuchten thermischen Rauschens und aus elektrischen und mechanischen Störungen zusammen. Die Berechnung des Integrals des Powerspektrums soll nur aus der Differenz des Powerspektrums des gemessenen Rauschens und des Hintergrundrauschens erfolgen (siehe Abb. 2.10). Das Hintergrundrauschen setzt sich aus mechanischen Bewegungen des Piezo-Tisches und aus elektrischen Störungen zusammen, die entweder die Intensität des Laserstrahls vor Probendurchtritt beinflussen oder die das Signal nach Durchtritt durch die Probe verändern. Zur Einschätzung des Verhältnisses dieser Komponenten zueinander, wird eine Vergleichsmessung durchgeführt: wie oben beschrieben, wird an dem Hell-Dunkel-Kontrast einer Deckglaskante das Brownsche Rauschen gemessen, kalibriert und das Powerspektrum berechnet. Diese Messung detektiert das gesamte Hintergrundrauschen (siehe Abb. 2.1). Eine zweite Messung nimmt das thermische Rauschen durch die parallele Ober- und Unterfläche des Deckglases hindurch auf. Mechanische Bewegungen des Piezo-Tisches sind somit nicht in der Messung enthalten. Zum Vergleich mit der oben beschriebenen Messung an der Deckglaskante wird das Rauschen mit dem Kalibrierfaktor der vorherigen Messung multipliziert und das Powerspektrum berechnet (siehe Abb. 2.1). Abbildung 2.1 zeigt, dass beide Graphen nahezu deckungsgleich sind, was den Schluss zulässt, dass der größte Teil des gesamten Hintergrundrauschens aus Intensitätsschwankungen des Lasers, des positionsempfindlichen Detektors, der Verstärkerelektronik und des Datenerfassungssystems besteht.

In den folgenden Messungen wurde das Powerspektrum des Hintergrundrauschen nur noch auf die zuletzt beschriebene Art berechnet und von dem Spektrum des gemessenen Haarbündelrauschens abgezogen.

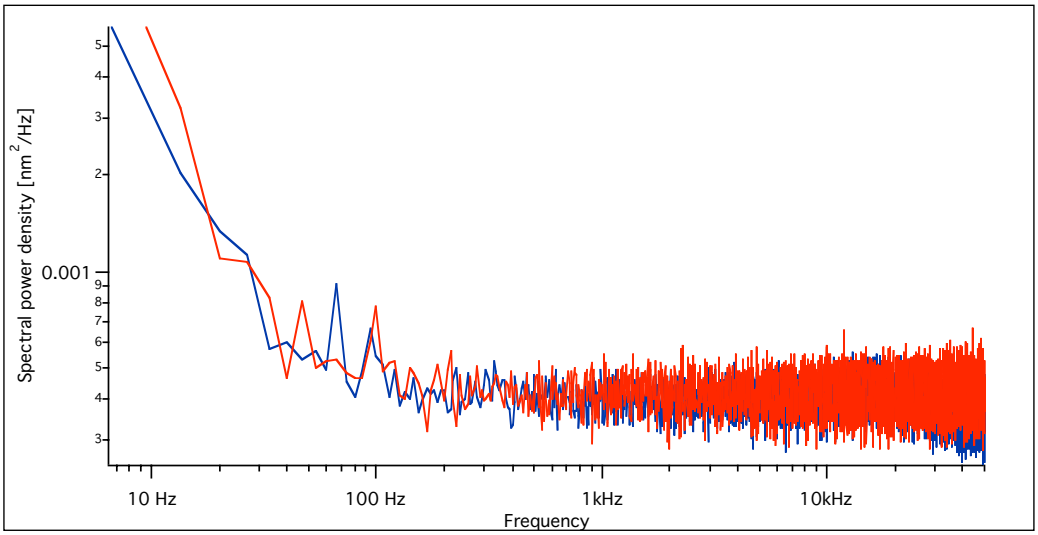

Abb. 2.1 Vergleich der Powerspektren des elektrischen Hintergrundrauschens (rot), bestehend aus Intensitätsschwankungen des Lasers, des positionsempfindlichen Detektors, der Verstärkerelektronik und des Datenerfassungssystems mit dem Gesamtrauschen (blau), bestehend aus der Summe des elektrischen und mechanischen Rauschens des Piezo-Tisches

(Hz: Hertz; kHz: Kilohertz; nm: Nanometer)

2.2.2 Aufbau des Nomarski-Laserdifferentialinterferenz-Mikroskops

Da es sich bei dem verwendeten Mikroskop um eine eigene Konstruktion der Arbeitsgruppe Langer handelt, bei der auch der Autor dieser Arbeit mitgewirkt hat (siehe Abb. 2.2), sollen einige Eigenschaften des Gerätes im folgenden näher erläutert werden.

Als Gerüst für die optischen Komponenten der Laserdifferentialinterferometrie und zur optischen Kontrolle der Experimente dient ein aufrechtes Differentialinterferenzkontrast (DIC) Durchlichtmikroskop (Axioskop 2 FS Plus, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit aufgesetzter Kamera (CCD-Kamera Spot Insight Monochrome, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA).

Als Lichtquelle für die Interferenzmessungen wird ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 632,8 nm mit Monomodefaser verwendet (Helium-Neon-Laser 15mW, Schäfter und Kirchhoff, Hamburg). Um Schwankungen der Netzspannung zu umgehen, wurde der Laser mit fünf Nickel Metall-Hydrid Batterien (AKKU NIMH-3000 SC-Zelle, Panasonic, Japan) zu je 1,2 Volt betrieben. Die Monomodefaser besitzt am Ende eine oberflächenvergütete Kollimationsoptik (F810FC-635 FC/PC Collimation Pkg/ 420-650nm AR Coated, ThorLabs GmbH, Dachau, Deutschland). Der kollimierte Laserstrahl wird über einen dichroitischen Spiegel in den Strahlengang des Durchlichts gelenkt, polarisiert und durch ein Differentialinterferenzkontrast-Prisma (DIC-Prisma; zugehörig zu Wasserimmersionsobjektiv Achroplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in zwei parallele Strahlen aufgespalten (siehe Kapitel 2.2.1) und von einem 40x/0,80 Wasserimmersionsobjektiv (Achroplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) auf einen Lichtfleck von ca. 1 μm Durchmesser gebündelt. Der Kondensor des Axioskops bündelt die divergenten Laserstrahlen wieder. Durch ein weiteres DIC-Prisma entsteht aus den beiden parallelen Strahlen wieder ein einziger Strahl, der von einem Polarisator gefiltert, auf einen Vierquadrantendetektor (SD 085-23-21-021, Advanced Photonix, CA, USA) auftrifft. Die hochfrequenten Signale werden herausgefiltert (Eigenbau UFM10; Einstellungen: LowPass2, Response: Bessel, 4th Order bei 10 kHz) und von einem Softwareprogramm (ScanClamp 0.89, Eigenprogrammierung) verarbeitet und gespeichtert. Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgt mit Igor Pro 4.09A Carbon (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Die horizontale Positionierung der Objektkammer erfolgt manuell mittels Mikromanipulatoren (Zwei-Achsen-Verschiebetisch M-406, Firma Newport, Irvine, CA, USA) und softwaregesteuert (ScanClamp 0.89, Eigenprogrammierung) mittels xy-Piezo-Positioniersystem (P-733, 100μm x 100μm, Firma PI, Auburn, MA, USA). Das gesamte Mikroskop ist auf einem schwingungsminimierenden Tisch (TS-150, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Deutschland)

aufgebaut, um mechanische Schwingungen des Fußbodens auf die Versuchsvorrichtung zu minimieren.

Die Temperatur in der Probenkammer wird mit einem Tauchfühler gemessen (Aquariumthermometer 2120, Conrad, Hirschau, Deutschland).

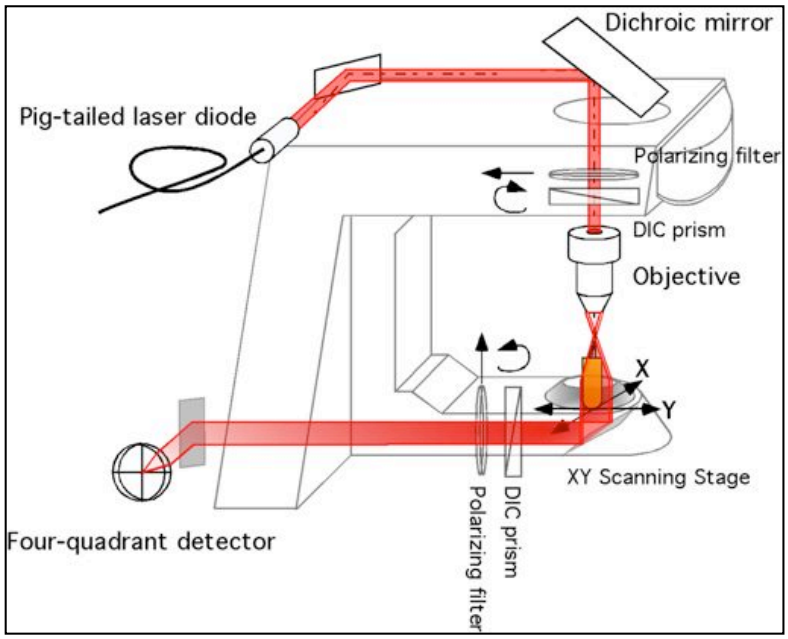

Abb. 2.2 Prinzip des Strahlengangs des verwendeten Nomarski-Laserdifferentialinterferenz-Mikroskops Ein kollimierter Laserstrahl wird durch den dichroitischen Spiegel in den Strahlengang des Durchlichts gelenkt, polarisiert und durch das Differentialinterferenzkontrast-Prisma (DIC-Prisma) in zwei parallele Strahlen aufgeteilt, die von einem 40-fach Wasserimmersions-Objektiv auf einen Lichtfleck mit 1 μm Durchmesser fokussiert werden und mit der Probe unterschiedlich stark interferieren (siehe Kapitel 2.2.1). Durch den mikroskopeigenen Kondensor werden die divergenten Strahlen gesammelt, durch ein zweites DIC-Prisma zu einem einzigen Strahl zusammengeführt und durch den Polarisator gefiltert. Detektiert werden die Intensitätsänderungen des Laserstrahls mittels eines Vierquadranten-Detektors.

2.2.3 Messeinstellung

Alle in dieser Arbeit genannten laserinterferometrischen Messungen wurden mit den gleichen Einstellungen durchgeführt. Eine Kalibrierkurve wird über 1200 Millisekunden (ms) aufgezeichnet. Alle 0,3 ms wird ein Spannungswert detektiert und gespeichert. Daraus resultiert eine Punktsumme von 4000 pro Kalibrierkurve. Es werden jeweils 30 Kalibrierkurven an derselben Stelle durchgeführt, die ersten drei werden verworfen, da das Piezo-Positioniersystem zu Beginn die zu untersuchende Position einstellt, was zu geringen Bewegungen der Stereozilien führen kann, die schnell wieder abflachen. Von den verbleibenden 27 Kalibrierkurven wird bei groben mechanischen Störungen die jeweilige Kurve entfernt und die verbleibenden Kurven gemittelt (siehe Abb. 2.6). Das Ansteuersignal für die x-Amplitude des Piezo-Tisches beträgt zwischen 150 und 500 Millivolt je nach Breite des Hell-Dunkel-Kontrasts.
Das Brownsche Rauschen wird mit einer Frequenz von 200 Punkten pro Millisekunde aufgenommen. Es werden 100 Messungen zu je 20 000 Punkten durchgeführt (siehe Abb. 2.6; zu sehen sind 100 zusammengesetzte Einzelmessungen). Alle eingehenden Detektorsignale werden oberhalb von 10 kHz gefiltert (eigene Konstruktion: UFM10; Einstellungen: Low-Pass2, Response: Bessel, 4th Order bei 10 kHz). Der stärkste Kontrast entsteht bei Detektion des x-Differenzsignals, ein Verfahren, das bei allen Rauschmessungen angewandt wird. Bei der Messung des x-Differenzsignals werden die Signale, die auf die linke Steite des Detektors fallen, von den Signalen abgezogen, die rechts einfallen. Alle Präparate werden deshalb so ausgerichtet, dass die zu messenden Brownschen Eigenbewegungen in x-Richtung schwingen (siehe Abb. 2.5 und Abb. 2.9).

2.2.4 Atomic-Force-Microscopy-Sensor als Modell: eine exemplarische Berechnung der Federkonstanten

Zur Kontrolle und Bestimmung der Genauigkeit dieser Methodik wurde eine Steifigkeitsmessung an Atomic-Force-Microscopy-Sensoren in Luft durchgeführt. Es besteht derselbe Aufbau wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Die einzige Änderung stellt ein 50x/0,50 Luftobjektiv mit den zugehörigen DIC-Prismen (Epiplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) anstelle des Wasserimmersionsobjektivs dar. Die hier verwendeten Kraftsensoren (Microlever, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA, USA) bestehen aus einem Pyrex-Glassubstrat, an dem mehrere feine, V-förmige oder rechteckige Kraftsensorbalken befestigt sind (Balkendicke 0,6 μm). An der Spitze der Sensoren befindet sich eine Kristallpyramide mit einer Kantenlänge von ca. 5 μm (siehe Abb. 2.3, Abb. 2.4 und Abb. 2.5). Die Kraftsensorbalken sind mit Gold

beschichtet (Schichtdicke zwischen 2 und 5 nm) und bilden somit an der Kante einen nahezu idealen Hell-Dunkel-Kontrast für die Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie.

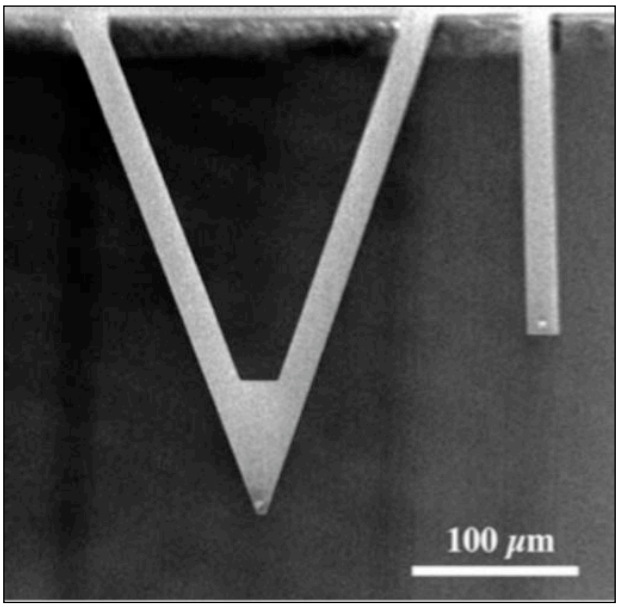

Abb. 2.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des längsten, V-förmigen und des rechteckigen Atomic-Force-Microscopy-Kraftsensorbalkens
(mit freundlicher Genehmigung von Stefan Fink)
(μm: Mikrometer)

Das Pyrex-Glassubstrat, an dem die Sensorbalken befestigt sind, ist mit UHU 2-Komponenten Epoxidharz-Kleber so auf einem Deckglas (∅ 10 mm, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) befestigt, dass die Kraftsensorbalken vertikal stehen und tangential von dem Laserstrahl gestreift werden. Für diese Referenzmessung wurde der längste, V-förmige Kraftsensor gewählt. Er besitzt bei einer Länge von 320 μm eine Federkonstante k nach Herstellerangaben von k = 0,01 ± 0,0045 N/m.

Die Bestimmung der Federkonstante des Kraftsensors erfolgt in dieser Vergleichsmessung mittels zweier unterschiedlicher Methoden: zum einen wird aus dem Brownschen Rauschen das Powerspektrum und dessen Integral berechnet (siehe Kapitel 2.2.1). Dieses Verfahren wird auch zur Bestimmung der Haarbündelsteifigkeit verwendet. Kontrolliert wird diese Methode durch eine zweite Art zur Berechnung der Federkonstanten: es wird die Änderung der Resonanzfrequenz durch Anbringen einer zusätzlichen Masse an der Sensorspitze gemessen. Die Steifigkeit des Sensors errechnet sich aus der zusätzlichen Masse (M) und der Dif-

ferenz der Resonanzfrequenzen vor Anbringung der Masse (v_1) und danach (v_2) mit Formel 2 [Cleveland J. P. et al (1993)], [Gibson C. T. et al (2005)].

$$\text{Formel 2:} \qquad k = (2\pi)^2 \frac{M}{v_1^2 - v_2^2}$$

Es wird das Brownsche Rauschen mit zugehöriger Kalibrierkurve (siehe Abb. 2.7) des längsten AFM-Sensors ohne zusätzliche Masse, anschließend mit einer Borsilikat-Kugel (mittlerer Durchmesser 9,6 μm $\pm$ 1 μm, Dichte: 2,5 g/cm^3, Microgenics Corporation, CA , USA) und mit zwei Borsilikat-Kugeln laserinterferometrisch gemessen (siehe Abb. 2.4 und Abb. 2.5). Zur Auswahl werden die Kugeln mit der Charge-coupled device Kamera (CCD-Kamera; Spot Insight Monochrome, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) aufgenommen und mit Objekten bekannter Größe verglichen. So ist sichergestellt, dass zwei Kugeln mit 9,6 μm Durchmesser an die Sensorspitze angebracht werden.
Mittels der Kalibrierkurve (siehe Abb. 2.6) werden von jeder Rauschmessung die absoluten Bewegungen des Sensors um seine Ruhelage bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1) und das Powerspektrum berechnet (siehe Abb. 2.7).

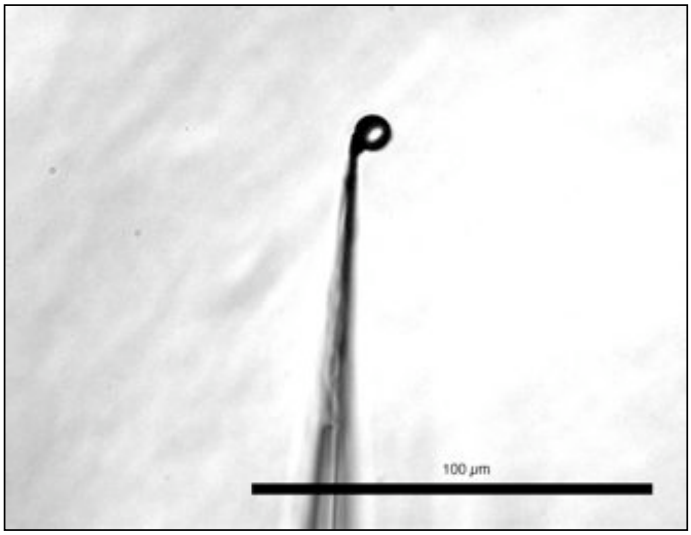

Abb. 2.4 Parallel zum Strahlengang stehender Atomic-Force-Microscopy-Sensor mit einer 9,6 μm Borsilikat-Kugel im Durchlicht des Laserdifferentialinterferenz-Mikroskops
(μm: Mikrometer)

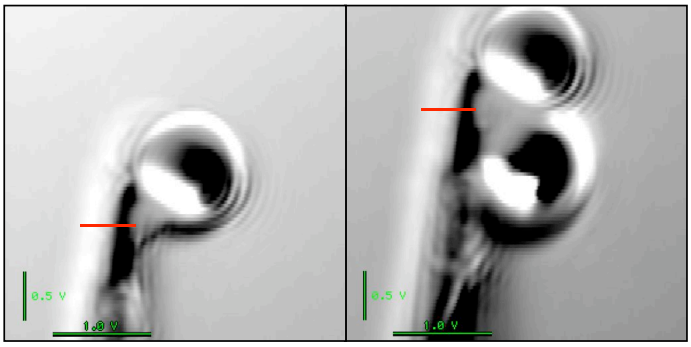

Abb. 2.5 Laserdifferentialinterferometrische Bilder des Atomic-Force-Microscopy-Sensors mit einer bzw. zwei 9,6 μm Borsilikat-Kugeln Die Bilder entstehen durch zeilenförmiges Rastern der Präparate und Darstellung der Intensität des Nomarski-Laserdifferentialinterferometer in Graustufen. Die roten Balken zeigen den Verlauf des Laserstrahls zur Kalibrierung an.
(1,0 Volt (V) ≅ 9,15 μm; μm: Mikrometer)

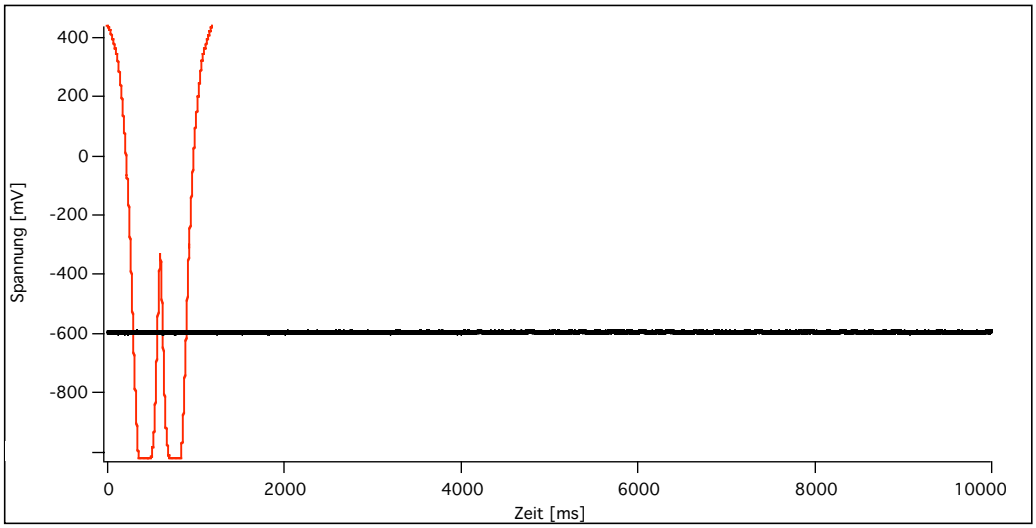

Abb. 2.6 Gemittelte Kalibrierkurve (rot) und Brownsches Rauschen (schwarz) des längsten Atomic-Force-Microscopy-Sensors (AFM-Sensors) in Luft, Messung mit einer 9,6 μm Borsilikat-Kugel an der Sensorspitze rot: langsamer Linescan orthogonal zu der Kante des AFM-Sensors (siehe Abb. 2.5), abgebildet ist die symmetrische Hin- und Rückbewegung; schwarz: Brownsches Rauschen an der Kante des AFM-Sensors an der Stelle der steilsten, linearen Intensitätsänderung des Laserstrahls, die Gesamtmessung hier ist aus 100 Einzelmessungen zusammengesetzt
(ms: Millisekunden; mV: Millivolt; μm: Mikrometer)

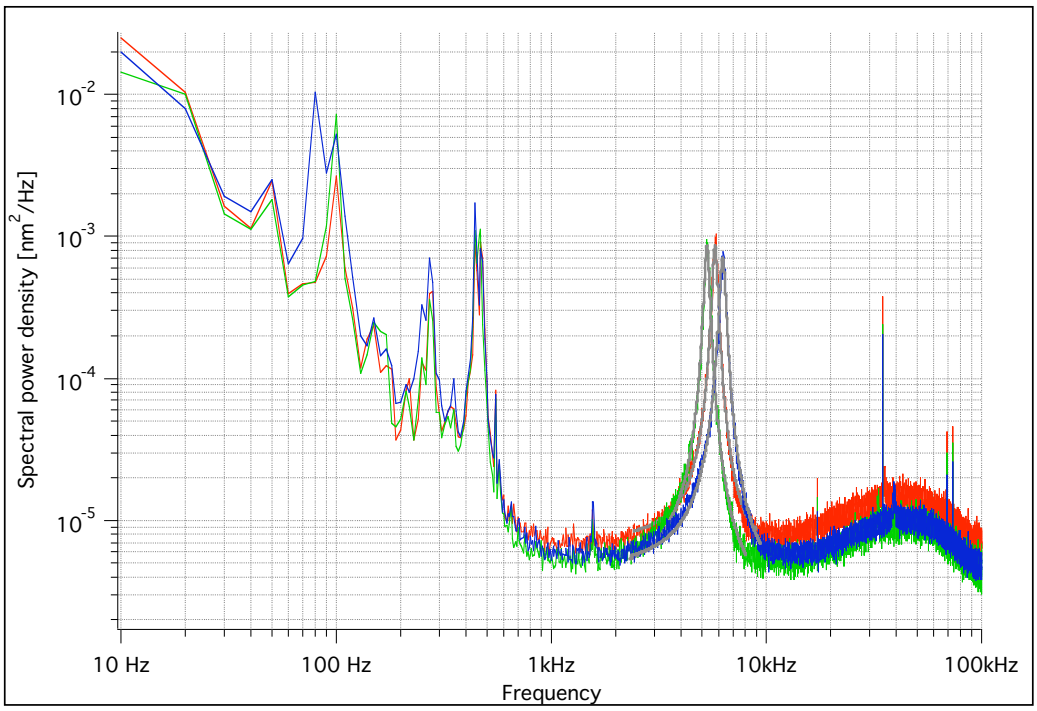

Abb. 2.7 Powerspektren des Brownschen Rauschens des längsten Atomic-Force-Microscopy-Sensors mit unterschiedlichen Massen an der Spitze blau: Messung ohne Borsilikat-Kugel, rot: Spektrum des Sensors mit einer Borsilikat-Kugel, grün: thermisches Rauschen gemessen mit zwei Kugeln, grau: Näherung an den Resonanzpeak mittels Lorentz-Verteilung nach: $f(x) = y_0 \frac{A}{(x - x_0) + B}$, Kurvenparameter der Lorentz-Verteilung siehe Abb. 2.8
(Hz: Hertz; kHz: Kilohertz; nm: Nanometer)

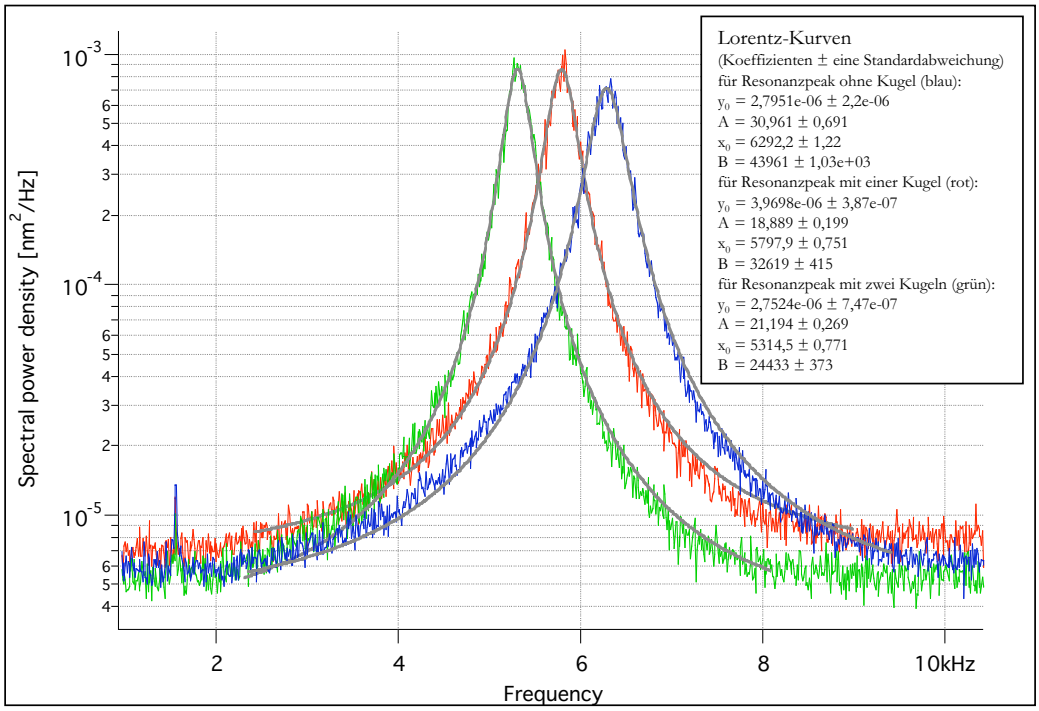

Abb. 2.8 Ausschnitt des Powerspektrums aus Abb. 2.7 des thermischen Rauschens des längsten Atomic-Force-Microscopy-Sensors mit unterschiedlichen zusätzlichen Massen an der Spitze blau: Messung ohne Borsilikat-Kugel, Resonanzfrequenz: 6292,2 Hz; rot: Spektrum des Sensors mit einer Borsilikat-Kugel, Resonanzfrequenz: 5797,9 Hz; grün: Spektrum mit zwei Kugeln, Resonanzfrequenz: 5314,5 Hz; grau: Lorentz-Kurven als Näherung nach:

$$f(x) = y_0 \frac{A}{(x - x_0) + B}$$

(Hz: Hertz; kHz: Kilohertz; nm: Nanometer)

Da sich die Steifigkeit des AFM-Sensors mit der zusätzlichen Masse nicht verändert, sollte der Resonanzpeak bei jeder der drei Messungen im Powerspektrum die gleiche Fläche einnehmen. Je höher die Masse an der Sensorspitze ist, desto höher und schmaler wird der Resonanzpeak. Zusätzlich verschiebt sich die Resonanzfrequenz mit zunehmender Masse hin zu niedrigeren Frequenzen (siehe Abb. 2.8). Der Resonanzpeak wird durch eine Lorentz-Verteilung näherungsweise beschrieben. Berechnet wird die Fläche, die durch den Resonanzpeak zusätzlich entsteht. Aus diesem Integral wird die Steifigkeit berechnet (siehe Kapitel 2.2.1). In Tabelle 1 sind die so errechneten Steifigkeiten angegeben. Der Mittelwert beträgt 0,0094029 N/m.
In Tabelle 2 sind die Steifigkeiten angegeben, die durch die Verschiebung der Resonanzfrequenz mit oben genannter Formel 2 bestimmt werden. Als bester Wert wird hier die Verschiebung der Frequenzen von null auf zwei Kugeln mit k = 0,00901068 N/m angesehen, da hier geringe, herstellerbedingte Massenabweichungen der einzelnen Kugeln die geringste Auswirkung haben. Von diesem Wert weicht der Mittelwert von Tabelle 1 mit 0,0094029 N/m um 4,64 % ab.

Tabelle 1. Steifigkeitsberechnung mittels Integral des Resonanzpeaks

Kugelanzahl	*Steifigkeit [N/m]*
0	0,0091091
1	0,0089998
2	0,0100180
Mittelwert:	0,0094029

(N: Newton; m: Meter)

Tabelle 2. Steifigkeitsberechnung mittels Verschiebung der Resonanzfrequenz

Zusätzliche Masse durch	Resonanzfrequenz vor zusätzlicher Kugel [Hz]	Resonanzfrequenz mit zusätzlicher Kugel [Hz]	*Steifigkeit [N/m]*
1. Kugel	6292,2	5797,9	0,01018210
2. Kugel	5797,9	5314,5	0,00808098
1. Kugel und 2. Kugel	6292,2	5314,5	0,00901068

(N: Newton; m: Meter; Hz: Hertz)

2.2.5 Informationsgewinn durch Laserinterferometrie bei Stereozilien - das Haarbündel als ein gedämpfter harmonischer Oszillator

Das einzelne Stereozilium kann modellhaft als ein Stab betrachtet werden, an dessen Basis ein Kugelgelenk mit zwei Freiheitsgraden und konstanter Rückstellkraft für die Verbindung zwischen Stereozilium und Kutikularplatte sorgt. Die V-förmigen Haarbündel der Säuger-Kochlea können vereinfacht als ein Verbund von jeweils drei, an Länge zunehmenden Stereozilienreihen angesehen werden. Innerhalb der einzelnen Reihen sind die Stereozilien durch elastische, horizontale Elemente (Lateral-Links) vernetzt. Zwischen den Reihen werden die Stereozilien zum einen durch schräg angeordnete, elastische Elemente (Tip-Links) und duch horizontal angeordnete Elemente (Top Connectors) verbunden. In dem vorgestellten Modell wird davon ausgegangen, dass sich alle Links des Haarbündels wie harmonische Federn mit konstanter Rückstellkraft verhalten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich das gesamte Haarbündel bei geringer Auslenkung in Flüssigkeit näherungsweise wie ein gedämpfter harmonischer Oszillator verhält, bei dem die Rückstellkraft proportional zur Auslenkung ist. Bei größerer Auslenkung steigt die Rückstellkraft allerdings überproportional stark an. Bei der in dieser Arbeit vorgestellen Steifigkeitsuntersuchung werden die mechanischen Eigenschaften des Haarbündels um die Ruhelage mit Auslenkungen von circa 0,01 % der Stereozilienlänge betrachtet. Das Haarbündelmodell als ein gedämpfter harmonischer Oszillator sollte eine gute Näherung bieten [Svrcek-Seiler W. A. et al (1998)], [Langer M. G. (1998)].

2.2.6 Steifigkeitsmessung an den Haarbündeln von Säugetieren

Nachdem in den vorherigen Abschnitten die allgemeinen Versuchsgrundlagen erläutert wurden, werden im folgenden die speziellen Bedingungen der Steifigkeitsmessung an den Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen der Rattenkochlea beschrieben.
Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Experimente ist die Integrität der Haarbündelstruktur und des Zellkörpers. Dies wird vor Versuchsbeginn lichtmikroskopisch überprüft. In dieser Arbeit wird für die Steifigkeitsmessungen mittels Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie ein Hell-Dunkel-Kontrast an der Haarbündelspitze von mindestens 600 mV verlangt. Dies ist ein willkürlich hoch festgelegter Wert, der eine hohe Aussagekraft der Steifigkeitsmessungen sicherstellen soll.
Die elastischen Tip-Links verbinden die drei Reihen der Stereozilien entlang einer Achse (siehe Kapitel 2.2.5). Durch die Zerstörung der Tip-Links sollte die Schwingungsfähigkeit der

Stereozilien insbesondere entlang dieser Achse erhöht sein. Die Haarbündel werden deshalb so ausgerichtet, dass die Spitze des V nach rechts zeigt (siehe Abb. 2.9). Es wird so die Bedingung für die Detektion des x-Differenzsignals (siehe Kapitel 2.2.3) geschaffen.

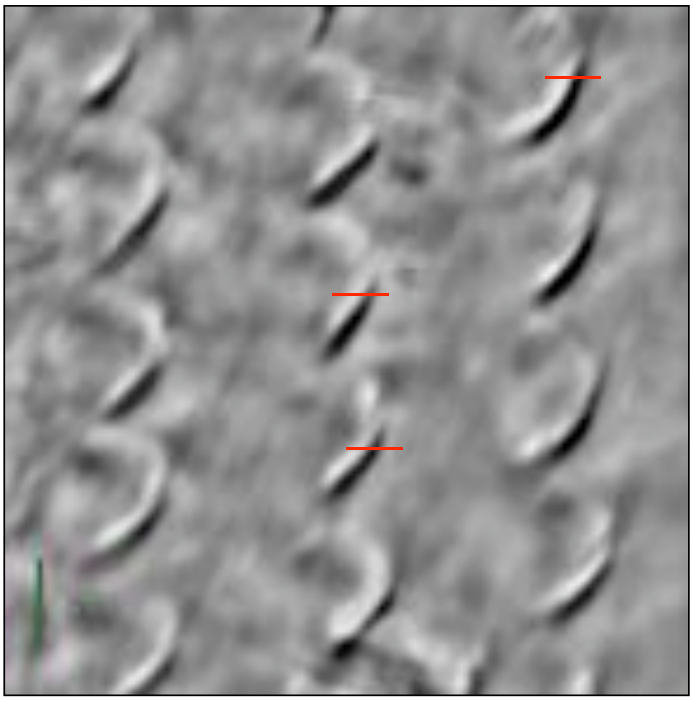

Abb. 2.9 Laserdifferentialinterferometrische Aufnahme der Haarbündel der Wistar Ratte am achten bis neunten Tag nach Geburt das Bild entsteht durch zeilenförmiges Rastern des Präparats in x-Richtung und Darstellung der Laserintensität in Graustufen. Die roten Linien stellen den Verlauf des Lasersignals für die Kalibrierkurven dar. In der Mitte der Linien erfolgt die Rauschmessung.
(0,5 Volt ≅ 4,57 Mikrometer)

Die Amplitude des Brownschen Rauschens sollte sich vergrößern, je weiter sich die Messstelle der Stereozilienspitze nähert. Um bei jeder Rauschmessung das Stereozilium an der Spitze zu betrachten, wird die Stelle des besten Kontrasts ausgewählt und während der Bewegungen des Piezo-Tisches für die Kalibrierkurven langsam in Richtung Stereozilienspitze fokussiert, bis der Kontrast beim Überschreiten der Stereozilienspitze plötzlich geringer wird. Knapp unterhalb dieser Stelle erfolgt die Messung.

Die organotypischen Kulturen befinden sich maximal eine Stunde in der Messkammer. In diesem Zeitraum sind lichtmikroskopisch keine Veränderungen der Zellen oder Haarbündel zu erkennen. Auch die Steifigkeitsmessungen zeigen keine Auffälligkeiten bei zunehmender Messdauer. Unter guten Bedingungen kann das Brownsche Rauschen an zwölf Haarbündeln eines Präparates gemessen werden.

Bei den Haarbündeln handelt es sich um gedämpfte harmonische Oszillatoren (siehe Kapitel 2.2.5). Im Gegensatz zu dem AFM-Sensor, der in Luft kaum gedämpft wird, zeigt sich keine Resonanzfrequenz, sondern ab einer bestimmten Frequenz (Eckfrequenz) eine Abnahme der Schwingungsamplitude. Es wird das Integral aus der Differenz des Powerspektrums des Haarbündels und des Hintergrundrauschens zwischen 30 Hz und 10 kHz errechnet. Typische Graphen des Powerspektrums von Haarbündeln zeigt Abb. 2.10.

Die Zusammenfassung der einzelnen Messungen erfolgt durch Medianbildung der Steifigkeitsdaten und Darstellung der ersten und dritten Quantile. Eine Signifikanzprüfung wird mittels Student-T-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wird auf $p = 0{,}05$ festgelegt.

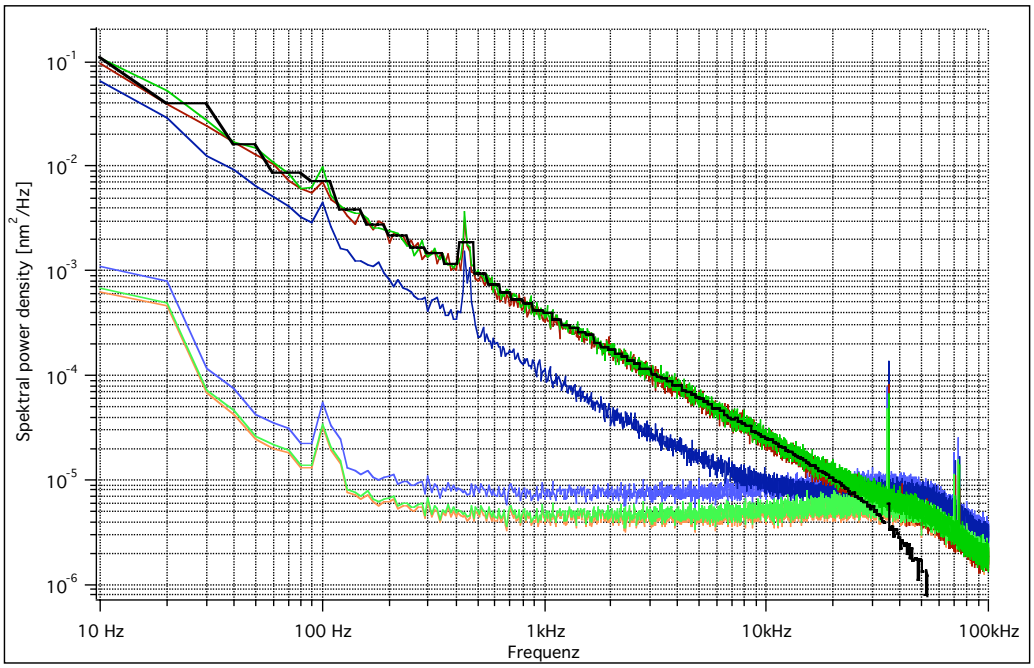

Abb. 2.10 Powerspektren des Brownschen Rauschens dreier Haarbündel (Ratte am dritten bis vierten Tag nach der Geburt) mit dem jeweiligen Hintergrundrauschen nach 5 mM BAPTA-Behandlung und 17 Stunden und 30 Minuten Regenerationszeit dunkelgrün: Brownsches Rauschen des Haarbündels von Zelle 1, hellgrün: Hintergrundrauschen der Messung an Zelle 1, schwarz: Differenz aus Brownschem Rauschen der Haarbündel und Hintergrundrauschen von Zelle 1, Steifigkeit k_1 = 0,0012124 N/m; dunkelrot: Haarbündel von Zelle 2, hellrot: zugehöriges Hintergrundrauschen, Steifigkeit k_2 = 0,0013376 N/m; dunkelblau: Haarbündel von Zelle 3, hellblau: zugehöriges Hintergrundrauschen, Steifigkeit k_3 = 0,0030472 N/m.
(mM: Millimolar, BAPTA: 1,2-Bis(2-amino-phenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; Hz: Hertz; kHz: Kilohertz; nm: Nanometer; k: Steifigkeit; N: Newton; m: Meter)

2.3 Messungen der Funktion des mechanoelektrischen Transduktionsapparats mittels Einstrom von FM 1-43FX

In dieser Arbeit wird die spezielle Eigenschaft von FM 1-43FX genutzt, selektiv durch geöffnete MET-Kanäle in das Zellinnere zu gelangen und diese Kanäle zu verschließen. Intrazellulär fluoresziert FM 1-43FX (siehe Kapitel 1.6). Bei dieser Methode fluoreszieren somit selektiv die Haarsinneszellen, bei denen die mechanoelektrischen Transduktionskanäle eine hohe Offenwahrscheinlichkeit zeigen.

Um auszuschließen, dass FM 1-43FX durch Lecks in der Zellmembran in das Zellinnere eindringt, werden die MET-Kanäle mit 100 μM Dihydrostreptomycin (DHSM, siehe Kapitel 2.4) blockiert. Insbesondere nach einer Regenerationszeit des Cortischen Organs von 17 bis 19 Stunden ist zu befürchten, dass die Integrität der Zellmembran zerstört sein könnte. FM 1-43FX-Experimente mit Block des MET durch DHSM werden deshalb bei organotypischen Kulturen mit Regenerationszeiten von 17 bis 19 Stunden durchgeführt. Bei DHSM handelt sich um einen permanenten Offenkanalblocker, der unter exzitatorischer Auslenkung der Haarbündel bei einer Konzentration von 100 μM und einem Zellpotential von -80 mV einen schnellen, nahezu vollständigen Block der mechanoelektrischen Transduktionskanäle eines Säugers bewirkt [Marcotti W. et al (2005)]. In der vorliegenden Arbeit findet der Block allerdings passiv, ohne exzitatorische Auslenkung statt. Um die Wahrscheinlichkeit eines Kanalverschlusses zu erhöhen, findet die Inkubation in 100 μM DHSM über 20 Minuten statt.

2.3.1 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Nach Herstellerangaben absorbiert FM 1-43FX Licht mit 473 nm Wellenlänge und emittiert Licht der Wellenlänge um 600 nm. Angeregt wird der Farbstoff in diesen Versuchen mit einer Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 100 W/2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Gefiltert wird der Lichtstrahl dieser Quelle durch einen Bandpassfilter für Licht der Wellenlänge um 470 nm (Filter set 13/Bandpass 470/20, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Detektiert wird das Licht mit der Wellenlänge größer als 590 nm (Filter set 15/Longpass 590, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Als Strahlteiler dient der Spiegel aus dem Filter set 15 (FT 580, Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Die organotypischen Präparate werden entweder direkt nach Präparation und 30 minütiger Behandlung mit 5 mM BAPTA bzw. Extrazellulärlösung (t = 0) oder erst nach 6 Stunden (t = 6 h) bzw. 17-19 Stunden (t = 18 h) Regenerationszeit bei 37,2 °C und 5 % CO_2 für 10 Sekunden in 3 μM FM 1-43FX-Lösung inkubiert [Gale J. E. et al (2001)]. Die Präparate wer-

den anschließend in die Mikroskopkammer in Extrazellulärlösung überführt, wo sie für 20 Minuten ohne Mikroskopbeleuchtung und bei abgedunkeltem Raum ruhen, bevor die Fluoreszenz aufgezeichnet wird. Die Wartezeit erhöht die Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten und zeigt somit besser die veränderte Funktionsfähigkeit des MET auf.
Zur Kontrolle der Integrität der Zellmembran werden Präparate mit Regenerationszeit von 17 bis 20 Stunden für 20 Minuten mit 100 μM DHSM-Lösung behandelt. Diese Präparate werden ebenfalls für 10 Sekunden in 3 μM FM 1-43FX-Lösung inkubiert. In Extrazellulärlösung ruhen diese Präparate anschließend für 20 Minuten in der Mikroskopkammer.

2.3.2 Datengewinnung und Verarbeitung

Aufgenommen wird die Fluoreszenz mit einer CCD-Kamera (Spot Insight Monochrome, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) bei immer gleichen Einstellungen (Gain: 1, Gamma: 0,38, 800 x 600 Pixel) mit der Software Spot MacVersion 4.1.1 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). Die Belichtungszeit aller gezeigten Bilder beträgt 996,528 Millisekunden.
Die Verarbeitung erfolgt mit Adobe Photoshop 7.0 für alle Bilder identisch: Es wird ein Bildausschnitt einer definierten Größe gewählt und eine Tonwertkorrektur mit einer Tonwertspreizung von 0 bis 130 durchgeführt. Aufgenommen werden die Bilder in Graustufen. Zur Einfärbung wird die Farbbalance für die "Tiefen", "Mitteltöne" und "Lichter" auf jeweils +100 bei rot eingestellt. Die Helligkeit wird auf +30, der Kontrast auf +40 erhöht. Es findet eine selektive Farbkorrektur mit +10 (absolut) für schwarz statt.

2.4 Lösungen und Inkubation

Die perilymphähnliche Extrazellulärlösung (Ex0) besteht aus (Angaben in mM): KCl 5,8; NaCl 144; $MgCl_2$ 0,9; $CaCl_2$ 1,3; NaH_2PO_4 0,7; D-Glukose 5,6; HEPES-Puffer 10,0; NaOH (für pH 7,4) 3,0 bis 5,0 ml [Kros C. J. et al (1992)]. Die Osmolarität wird kontrolliert und mit NaCl zwischen 307 und 315 mosm eingestellt.

Zur Zerstörung der Tip-Links wird eine 5 mM Lösung des Ca^{2+}-Chelators 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure (BAPTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) hergestellt [Zaho Y. et al (1996)]. 50 mg BAPTA werden zuerst in 1 ml 0,3 M $NaHCO_3$ gelöst und mit Ex0 auf die geforderte Konzentration an BAPTA verdünnt. Die Kochlea-Präparate werden für 30 Minuten in der 5 mM BAPTA-Lösung inkubiert.

Für die Aufnahmen mit dem fluoreszierenden Farbstoff FM 1-43FX (Invitrogen Molecular Probe, Karlsruhe, Deutschland) wird der Ex0-Lösung 3 μM FM 1-43FX zugesetzt. Die Präparate werden direkt vor Einbringen in das Mikroskop für zehn Sekunden inkubiert [Gale J. E. et al (2001)]. Die Lösung wird lichtgeschützt, in Aluminiumfolie eingewickelt, gelagert.

Als Blocker des mechanosensitiven Transduktionskanals wird der Ex0-Lösung 100 μM Dihydrostreptomycin (DHSM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zugesetzt.

Alle Lösungen werden steril filtriert (Sterivex-GS^{TM} 0,22 μm Filterunit with filling bell, Millipore, Bedford, MA, USA) und bei +3 °C gelagert.

Die Inkubation wird durch Perfusion der gesamten Präparate durchgeführt.

2.5 Tiere und Haltung

Das Cortische Organ wird dem Innenohr junger Wistar Ratten entnommen. Das trächtige Muttertier wird wenige Tage vor der Geburt der Jungtiere von Charles River (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland) an das Tierforschungszentrum der Universität Ulm, Bereichstierhaltung M24 geliefert. Die Organentnahme der Jungtiere erfolgt vom Tag der Geburt bis zum Tag 21 nach Geburt. Bis zum Zeitpunkt der Organentnahme werden die Jungtiere bei dem Muttertier belassen.
Unter der Registriernummer 0.128, Kurzbezeichnung: "Transduktion am Innenohr" ist das Projekt angezeigt. Die Tiere werden vor der Dekapitation nicht behandelt.

2.6 Herstellung organotypischer Kulturen

Die Möglichkeiten der bei dieser Arbeit angewandten Methoden, insbesondere die der laserdifferentialinterferometrischen Steifigkeitsmessungen, sind durch die Geometrie des Cortischen Organs limitiert. Es muss sichergestellt sein, dass die drei Reihen der äußeren Haarsinneszellen horizontal in einer Ebene liegen, um die volle Amplitude der Eigenbewegungen detektieren zu können. Daher ist die gewählte Präparationsweise entscheidend für die Aussagekraft der Ergebnisse. Die im folgenden beschriebene Präparation basiert auf der Methode von Sobkowicz et al. [Sobkowicz H. M. et al (1975)], sowie Russell und Richardson [Russel I. J., Richardson G. P. (1987)] Sie erlaubt es, das Cortische Organ im Gesamten auf einem Deckglas zu befestigen, so dass die Kutikularplatte horizontal zu liegen kommt.
Die Präparation erfolgt nach Dekapitation der Wistar Ratte und Entfernung des Fells in Gewebekulturschalen (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) unter sterilen Bedingungen in Hepes-Hanks-Lösung (Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) bei Zimmertemperatur (22°C). Die Hepes-Hanks-Lösung wird während der Präparation mehrfach gewechselt, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Der Schädel wird in der Medianebene gespalten und das Gehirn mit der Dura cerebri entfernt. Das Herauslösen der Kochlea aus dem Schädel wird unter einem Stereomikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland; Vergrößerung 6,5x bis 40x) durchgeführt. Anschließend wird die knorpelige bzw. knöcherne Kapsel der Kochlea sorgfältig entfernt und der Endolymphschlauch vom Modiolus abgezogen. Das Cortische Organ wird von der Stria vascularis abgetrennt und in einen apikalen, medialen und basalen Abschnitt unterteilt. Nach Möglichkeit wird die Tektorialmembran gleich entfernt. Erweist sich dies als schwierig, so wird die Tektorialmembran erst

unter dem Versuchsmikroskop mit Hilfe einer Borsilikat-Pipette (Borsilikatglas A.D. 2 mm, GB 100T-8P ohne Filament, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland; Mikropipette Puller Model P-2000, Sutter Instruments Co., Novato CA, USA) entfernt. Das Entfernen der Tektorialmembran ist bei jungen Tieren ohne Schädigung der Haarbündel möglich, da zu diesem Zeitpunkt noch kein fester Kontakt zwischen den Stereozilien und der Tektorialmembran besteht. Bei Wistar Ratten ist es bis zum Alter vom vierten postnatalen Tag in den apikalen und medialen Abschnitten nicht nötig die Tektorialmembran zu entfernen, da diese die äußeren Haarsinneszellen noch nicht bedeckt.

Für Aufnahmen mit dem fluoreszierenden Farbstoff FM 1-43FX werden die organotypischen Kulturen von einer fein ausgezogenen Glaskapillare (Borsilikatglas A.D. 1 mm, GB 100T-8P ohne Filament, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland; Micropipette Puller Model P-2000, Sutter Instruments Co., Novato CA, USA) auf Deckgläsern (∅ 10 mm, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) festgeklemmt. Die feine Glaskapillare wird mittels UHU 2-Komponenten Epoxidharz-Kleber auf dem Deckglas fixiert.

Für die laserdifferentialinterferometrischen Messungen werden die Präparate mit 1 μl Cell-Tak (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) auf Deckgläser (∅ 10 mm, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) geklebt, damit keine Interaktionen zwischen der Glaskapillare und dem Laserstrahl auftreten können.

Auch die Präparate, die für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet werden, werden mit Cell-Tak auf Deckgläsern (∅5 mm, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) fixiert. Ausnahmen bilden die Kontrollen der Aufnahmen mit FM 1-43FX.

Die auf dem Deckglas fixierten Präparate werden nun für 30 Minuten in 5 mM BAPTA-Lösung (siehe Kapitel 2.4) belassen. Die Kontrollpräparate verbleiben die gleiche Zeit in Extrazellulärlösung (siehe Kapitel 2.4). Die Versuchsdurchführung zum Zeitpunkt t = 0 findet im direkten Anschluss statt.

Die organotypischen Kulturen, die Zeit zur Regeneration erhalten, werden in Polymerschalen (Cellstar® 35/10 mm) in 3 ml Kulturmedium (MEM D-Val, Gibco BRL Life Technologies LTD, Paisley, Schottland) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,2) bei 37,2 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Versuchsdurchführung findet entweder 6 Stunden (t = 6 h) oder 17 bis 20 Stunden (t = 18 h) nach Inkubationsbeginn statt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung kochleärer Haarbündel der Wistar Ratte

3.1.1 Morphologie kochleärer Haarsinneszellen während und nach der Entwicklungsphase

Die Morphologie des Cortischen Organs der voll entwickelten Säugerkochlea ist gut bekannt. Auch die Entwicklung der Haarbündellinks ist beschrieben. Über die morphologische Entwicklung des gesamten Haarbündels beim Säuger sind aber kaum Daten verfügbar. Der Entwicklungsablauf soll in diesem Kapitel anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen einzelner Stadien verdeutlicht werden. Es werden Aufnahmen von den Haarbündeln äußerer Haarsinneszellen von Ratten im Alter von bis zu vier Tagen gezeigt und mit Haarbündeln verglichen, die vom entwickelten Innenohr der Wistar Ratte im Alter von 21 Tagen entnommen wurden. Bei Ratten im Alter von null bis zu zwei Tagen wurde die normale Morphologie an 22 Präparaten rasterelektronenmikroskopisch untersucht., bei Ratten im Alter von drei bis fünf Tagen an 21 Präparaten und bei Ratten älter als zehn Tagen an 33 Präparaten. Alle Präparate zeigten die in diesem Kapitel beschriebene Morphologie.

Abbildung 3.1 zeigt die Haarbündel von Ratten am Tag ihrer Geburt. Im apikalen Abschnitt (Abb. 3.1; a) zeigen die Haarbündel auffällige Unterschiede zu den adulten Stadien. Die Haarbündel stellen sich als ein kreisförmiger Verbund gleich langer Stereozilien dar. Es ist noch nicht die V-Form der adulten Haarbündel oder die Differenzierung der Stereozilien in drei Reihen erkennbar. Manche Haarbündel besitzen noch an der Spitze des späteren Vs ein Kinozilium, das sich mit der weiteren Entwicklung zurückbildet.

Weiter basal ist die Entwicklung fortgeschrittener. Im medialen und basalen Abschnitt des Cortischen Organs (siehe Abb. 3.1; b und c) zeigen die äußeren Haarsinneszellen beginnend die V-Form mit einer Längendifferenzierung der Stereozilien. Allerdings befinden sich innerhalb des Vs immer noch Stereozilien gleicher Länge.

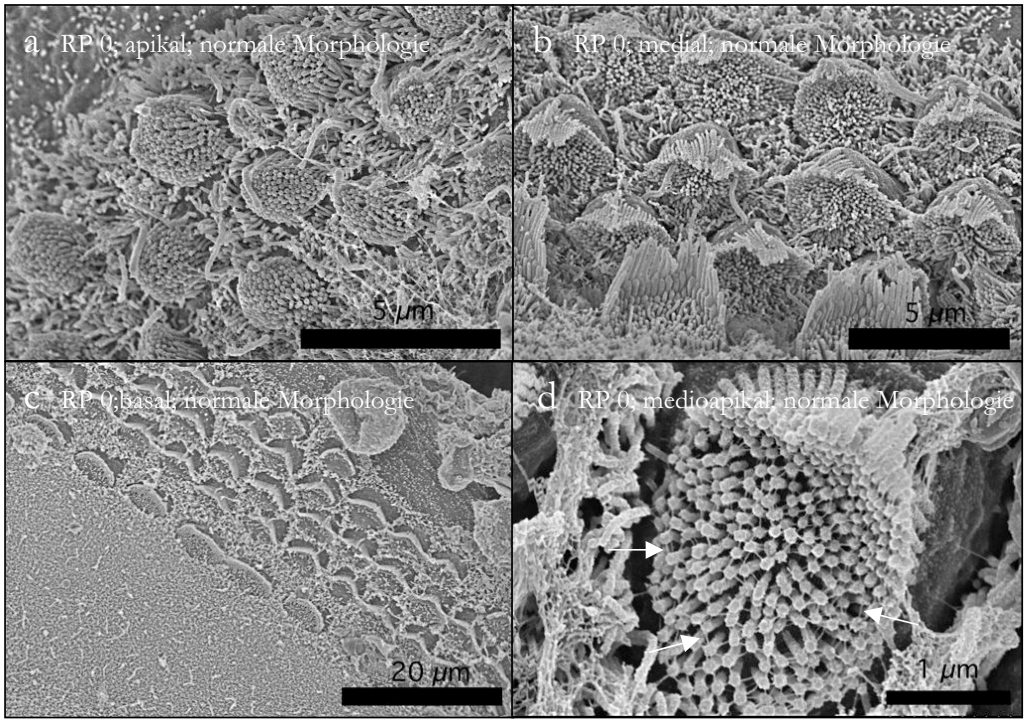

Abb. 3.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Cortischen Organs der Wistar Ratte am Tag der Geburt a) äußere Haarsinneszellen des apikalen Abschnitts: Die Haarbündel sind noch sehr wenig entwickelt. Es ist noch keine Längendifferenzierung und auch keine V-förmige Organisation der Stereozilien zu erkennen. Manche Haarbündel besitzen noch ein Kinozilium, das im medialen Abschnitt nicht mehr vorhanden ist. b) äußere und innere Haarsinneszellen des medialen Abschnitts: Es bilden sind unterschiedlich lange Stereozilien aus, die im Begriff sind, ihre typische V-Form zu bilden. c) äußere und innere Haarsinneszellen des basalen Abschnitts: Die Entwicklung ist am weitesten fortgeschritten. Zwischen den Haarbündeln befindet sich noch ein Mikrovilli-Rasen. d) einzelnes Haarbündel am Übergang zwischen apikalem und medialem Abschnitt: Undifferenzierte Links (→) vernetzen die Stereozilien. Eine beginnende Längendifferenzierung ist zu erkennen.
(RP 0: Ratte am Tag der Geburt; μm: Mikrometer)

Zwischen den Stereozilien befindet sich ein dichtes Netz an Links (siehe Abb 3.1; d). Rasterelektronenmikroskopisch können diese Links nicht in Tip-Links, die eine Verbindung mit dem MET-Kanal besitzen, und in Lateral-Links, die für die Steifigkeit des Verbundes sorgen, differenziert werden.

Bei älteren Ratten bildet sich auch an den apikalen Abschnitten die typische V-Form der Haarbündel aus. Sie ist bei der Wistar Ratte im Alter von drei bis vier Tagen in allen Abschnitten gut zu erkennen (siehe Abb. 3.2; a, b und c). Die Stereozilien innerhalb dieses Vs bilden sich immer weiter zurück, je näher sich die Haarsinneszellen der Schneckenbasis annähern und treten im basalen Teil nur noch vereinzelt auf. Die Mikrovilli zwischen den Haarbündeln sind in allen Abschnitten vorhanden.

Mit der fortschreitenden Längendifferenzierung der Stereozilien sind auch unterschiedliche Links bereits in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen (siehe Abb. 3.2; d). Tip-Links verbinden die Stereozilienspitze mit einem benachbarten, längeren Stereozilium. Lateral-Links vernetzen gleich lange Stereozilien auf Höhe der Schäfte. Weitere Links sind noch nicht zu differenzieren.

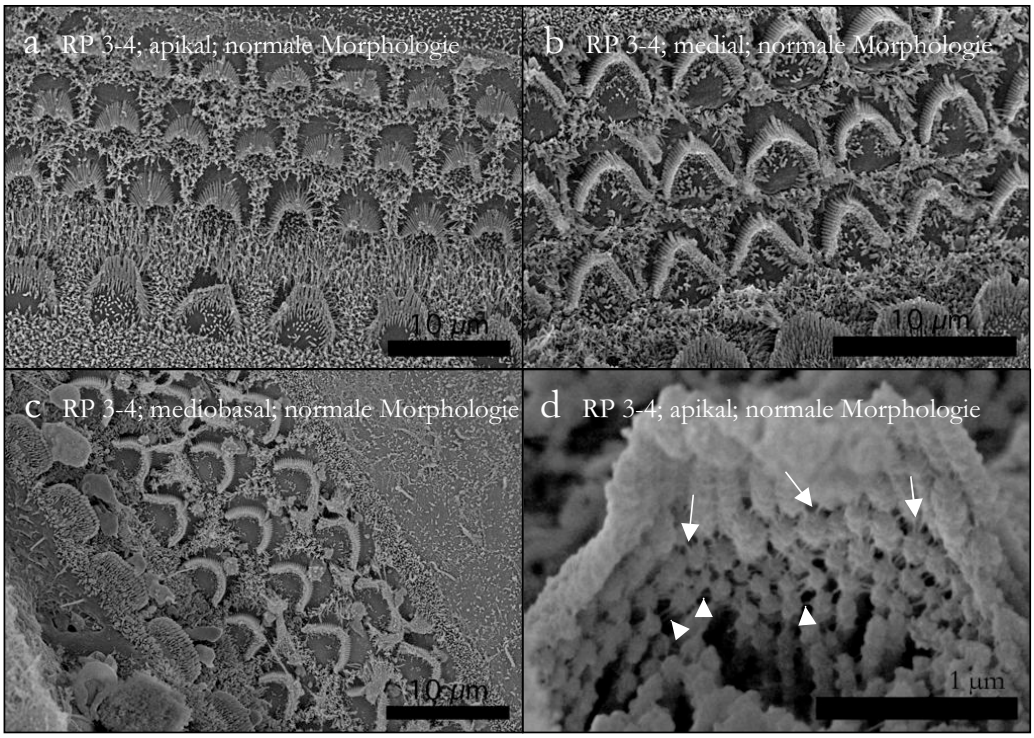

Abb. 3.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Cortischen Organs der Wistar Ratte am dritten bis vierten Tag nach Geburt a) Haarbündelübersicht mit äußeren und inneren Haarsinneszellen des apikalen Abschnitts der Kochlea: Die Stereozilien haben inzwischen die typische V-Form eingenommen und zeigen eine Längendifferenzierung. b) Übersicht über den medialen Abschnitt mit äußeren und inneren Haarsinneszellen c) Übersicht über äußere und innere Haarsinneszellen des mediobasalen Kochleaabschnitts: Die Stereozilien innerhalb des Vs der Haarbündel haben sich nahezu vollständig zurückgebildet. d) einzelnes Haarbündel aus dem apikalen Abschnitt mit unterschiedlich langen Stereozilien und differenzierten Tip-Links (→) und Lateral-Links (△).
(RP 3-4: Ratte im Alter vom dritten bis vierten postnatalen Tag; μm: Mikrometer)

Bei der adulten Säugerkochlea (siehe Abb. 3.3; a, b und c) einer Ratte im Alter von 21 Tagen sind keine Unterschiede mehr zwischen den apikalen, medialen und mediobasalen Abschnitten des Cortischen Organs erkennbar. Die Haarbündel sind V-förmig angeordnet. Die Stereozilien innerhalb des Vs haben sich vollständig zurückgebildet. Der Mikrovilli-Rasen auf der Kutikularplatte ist komplett verschwunden. In Abbildung 3.3; d sind Tip-Links, Lateral-Links und auch Top-Connectors erkennbar.

Mit der Entwicklung nimmt die Dichte der Links um ein Vielfaches ab (siehe Abb. 3.1; d, 3.2; d und 3.3; d). Zeitgleich nimmt aber die Organisation der Links zu. Im Alter von wenigen Stunden liegt ein weitgehend ungeordnetes Netz vor, bei adulten Haarbündeln vernetzen die Lateral-Links alle Stereozilien gleicher Länge, senkrecht dazu verlaufen die Tip-Links und die Top-Connectors.

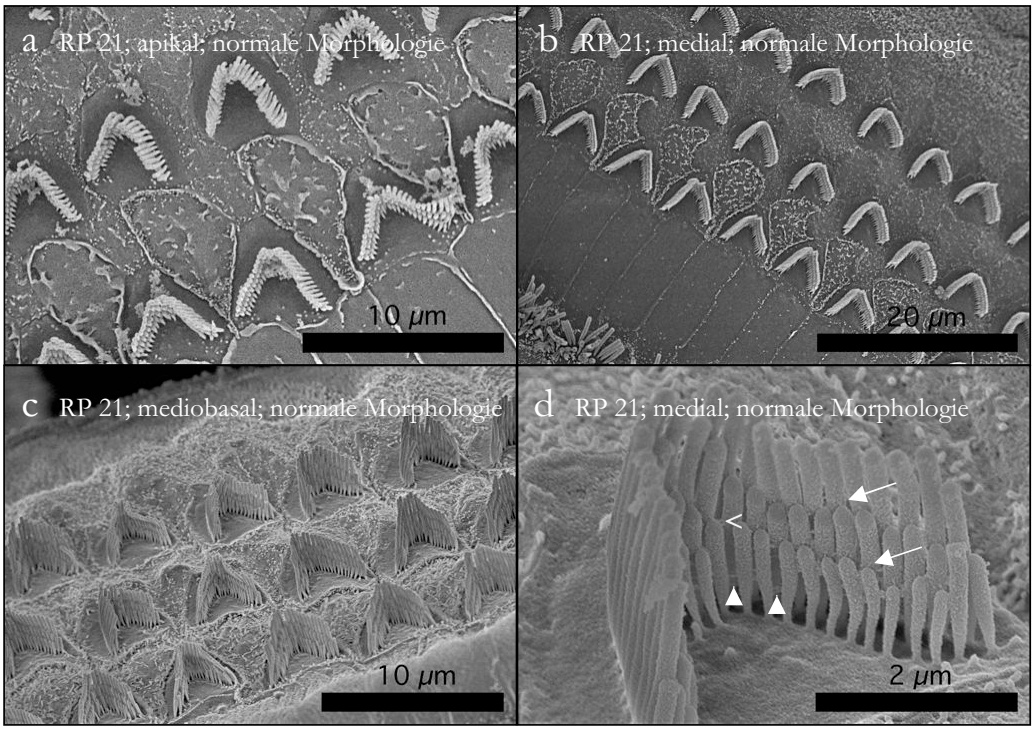

Abb. 3.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des voll entwickelten Cortischen Organs der Wistar Ratte im Alter von 21 Tagen a) Übersicht über die Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen im apikalen Abschnitt b) Übersicht über die äußeren und inneren Haarsinneszellen des medialen Abschnitts c) Übersicht über die äußeren Haarsinneszellen des mediobasalen Übergangs des Cortischen Organs d) äußere Haarsinneszelle aus dem medialen Abschnitt mit eindeutiger Differenzierung zwischen Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) bzw. Top-Connectors (<)

(RP 21: Ratte im Alter von 21 Tagen; µm: Mikrometer)

3.1.2 Entwicklungsabhängige Steifigkeit kochleärer Haarbündel

Während der Entwicklung laufen zwei Prozesse ab, die die Haarbündelsteifigkeit unterschiedlich beeinflussen: die REM-Bilder (siehe Kapitel 3.1.1) demonstrieren den abnehmenden Vernetzungsgrad der Haarbündel mit der Entwicklung. Zeitgleich steigt die intrinsische Steifigkeit der Stereozilien an, da sich das Aktin-Zytoskelett weiter entwickelt (siehe Kapitel 1.3.2). In diesem Abschnitt soll demonstriert werden, wie sich die Haarbündelsteifigkeit während der Entwicklung verändert. Dazu wurde die Steifigkeit apikaler und medialer Haarbündel von Wistar Ratten am Tag der Geburt und am dritten bis vierten Tag gemessen (siehe Abb. 3.4). Bei den jüngeren Ratten wurde die Steifigkeit von drei apikalen Haarbündeln und von zwölf medialen Haarbündeln gemessen. Bei den älteren Ratten wurden 37 apikale und 28 mediale Haarbündel betrachtet.

Es errechnet sich bei den weniger entwickelten apikalen Abschnitten eine geringere Haarbündelsteifigkeit als bei den weiter entwickelten medialen Abschnitten beider Altersstufen. Bei den Ratten am Tag der Geburt wird ein nicht-signifikanter Anstieg mit $p = 0{,}135$ gemessen. Statistisch signifikant mit $p = 0{,}023$ ist der Steifigkeitsanstieg der älteren Ratten. Jeweils signifikant zeigt sich der Steifigkeitsanstieg der apikalen ($p = 0{,}035$) und medialen ($p = 0{,}013$) Haarbündel vom Tag der Geburt bis zum dritten oder vierten Tag.

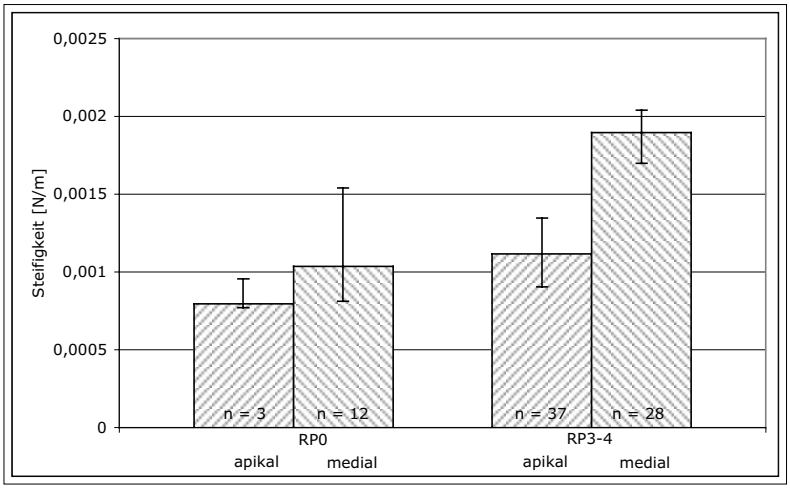

Abb. 3.4 Steifigkeitmessungen an unterschiedlich weit entwickelten äußeren Haarsinneszellen Die Balken zeigen jeweils den Median der Steifigkeiten, die Fehlerbalken die erste und dritte Quartile.
(RP 0: Ratten am Tag der Geburt; RP 3-4 Ratten am dritten bis vierten Tag nach der Geburt; N: Newton; m: Meter; n: Anzahl gemessener Haarbündel)

3.1.3 Zwischenresümee

Bei jungen Tieren ist es rasterelektronenmikroskopisch nicht möglich, zwischen Tip- und Lateral-Links zu unterscheiden. Bei adulten Tieren gibt es eine klare Differenzierung in Tip-Links, Lateral-Links und Top-Connectors. Die gezeigten Ergebnisse lassen unklar, ob die Tip-Links bereits in der frühen Entwicklungsphase molekular determiniert sind, oder ob sich die unterschiedlichen Links aus einer einzigen Vorstufe entwickeln. Dieser Frage wurde in weitergehenden Untersuchungen mittels des Tip-Link zerstörenden Kalziumchelators BAPTA nachgegangen.

3.2 Morphologische Veränderungen der Haarbündel äußerer Haarsinneszellen nach Zugabe von BAPTA

BAPTA wird an dieser Stelle dazu verwendet, um die undifferenzierten Links der frühen postnatalen Säuger-Kochlea weiter zu untersuchen. Differenzieren sich Tip-Links und Lateral-Links aus einer gemeinsamen Vorstufe? In diesem Fall würden alle undifferenzierten Links identisch auf die BAPTA-Behandlung reagieren. Oder sind die Links bereits in der frühen Phase der Entwicklung auf molekularer Ebene verschieden und können somit unterschiedlich auf BAPTA ansprechen? Diese Veränderungen wurden bei Ratten im Alter bis zu zwei Tagen an elf Präparaten untersucht, bei Ratten im Alter von drei bis fünf Tagen an neun Präparaten und bei Ratten älter als zehn Tagen an 28 Präparaten. Bei allen Präparaten zeigten sich die in diesem Kapitel beschriebenen Veränderungen. Eine geringe Anzahl der Haarbündellinks war allerdings bei jeweils zwei Präparaten der Altersgruppen von null bis zwei Tagen und von drei bis fünf Tagen nach BAPTA-induzierter Schädigung vorhanden.

In den apikalen und medialen Abschnitten des Cortischen Organs der frühen postnatalen Phase der Säuger-Kochlea von Ratten bis zu zwei Tagen nach der Geburt konnten nicht nur eine Zerstörung aller vernetzenden Links, sondern auch ein Auseinanderfallen der Haarbündelstruktur mit gelegentlich gekrümmten Stereozilien beobachtet werden (siehe Abb. 3.5; a und b). Die apikalen Haarbündel wölben sich mitsamt der Kutikularplatte kugelig auf, so dass die Stereozilien nicht mehr parallel angeordnet sind, sondern radial von der Kugeloberfläche abstehen (siehe Abb. 3.5; a und b). Im medialen Abschnitt bleibt die Haarbündelstruktur trotz der Zerstörung aller Haarbündellinks im Wesentlichen intakt (siehe Abb. 3.5; c und d). Die Kutikularplatte bleibt unverändert flach. Die einzelnen Stereozilien erscheinen noch sehr weich, so dass sie teilweise gebogen oder umgeknickt sind.

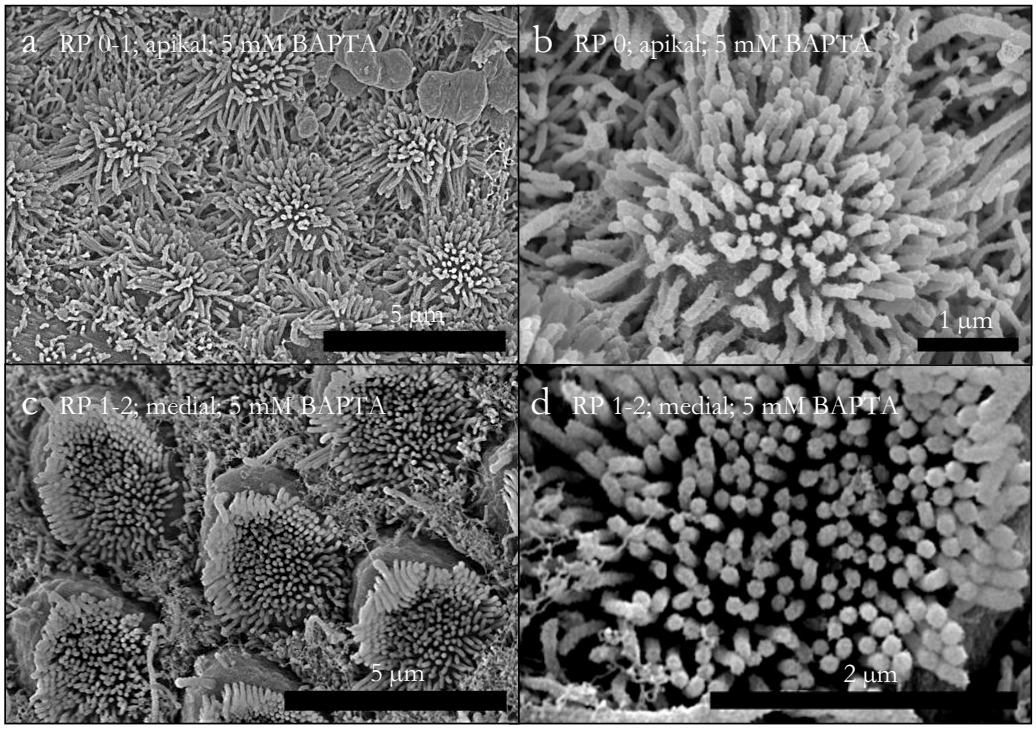

Abb 3.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Cortischen Organs der Wistar Ratte im Alter von null bis zwei Tagen nach 30-minütiger Behandlung in BAPTA a) Übersicht über die geschädigten Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen des apikalen Abschnitts der Kochlea (RP 0-1). b) Einzelnes Haarbündel einer äußeren Haarsinneszelle im apikalen Abschnitt: Die vernetzenden Links fehlen vollständig. Die Haarbündelstruktur ist zerstört, einzelne Stereozilien sind gekrümmt. Die Kutikularplatte wölbt sich mitsamt den Stereozilien kugelig auf (RP 0). c) Übersicht über die Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen im medialen Abschnitt der Kochlea: Bereits in der Übersicht ist das Fehlen der Links zu erkennen (RP 1-2). Es kommt nicht zur kugeligen Aufwölbung der Kutikularplatte. Die Stereozilien erscheinen aber noch sehr weich, so dass sie teilweise gebogen sind. d) Ausschnitt einer äußeren Haarsinneszelle im medialen Abschnitt (RP 1-2): Die Links sind nahezu vollständig verschwunden.
(RP 0-2: Ratte am Tag der Geburt bis zum Alter von zwei Tagen; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer)

Mit fortschreitender Entwicklung bleibt die Kutikularplatte der apikalen Haarsinneszellen der Ratte im Alter von drei bis vier Tagen nach der Geburt nach BAPTA-Behandlung unverändert flach (siehe Abb. 3.6; a und b). Gelegentlich sind trotzdem noch einzelne Stereozilien gekrümmt. Die grobe Haarbündelstruktur mit der V-Form bleibt erhalten. BAPTA zerstört auch bei Haarbündeln dieser Entwicklungsstufe sowohl die Tip-Links wie auch die Lateral-Links vollständig.

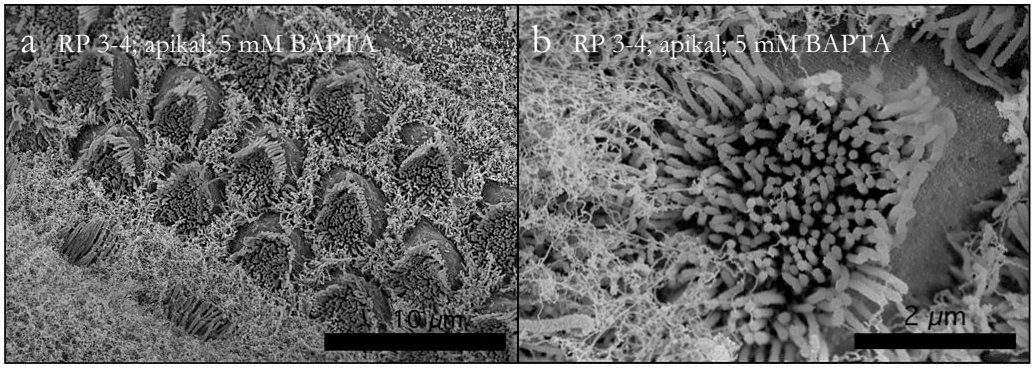

Abb. 3.6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des apikalen Abschnitts des Cortischen Organs der Wistar Ratte am dritten bis vierten Tag nach der Geburt nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA a) Übersicht über die Haarbündelstruktur der äußeren und inneren Haarsinneszellen b) Haarbündel einer äußeren Haarsinneszelle mit BAPTA-induziertem, kompletten Tip-Link- und Lateral-Link-Verlust: Einzelne Stereozilien sind umgeknickt. Die V-förmige Haarbündelstruktur ist jedoch erhalten. Die Kutikularplatte stellt sich flach dar.
(RP 3-4: Ratte im Alter vom dritten bis vierten postnatalen Tag; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer)

Die Stereozilien voll entwickelter Ratten im Alter von 22 bis 24 Tagen stehen in den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen nach BAPTA-Behandlung parallel zueinander unverändert in der V-Form (siehe Abb. 3.7). Die Längendifferenzierung ist erhalten. Der BAPTA-Effekt ist bei adulten Stadien im Wesentlichen auf die Zerstörung oder Verminderung der Tip-Links beschränkt. Im Gegensatz zu den postnatalen Stadien widerstehen bei den adulten Präparaten die Lateral-Links und die Top-Connectors der BAPTA-Behandlung.

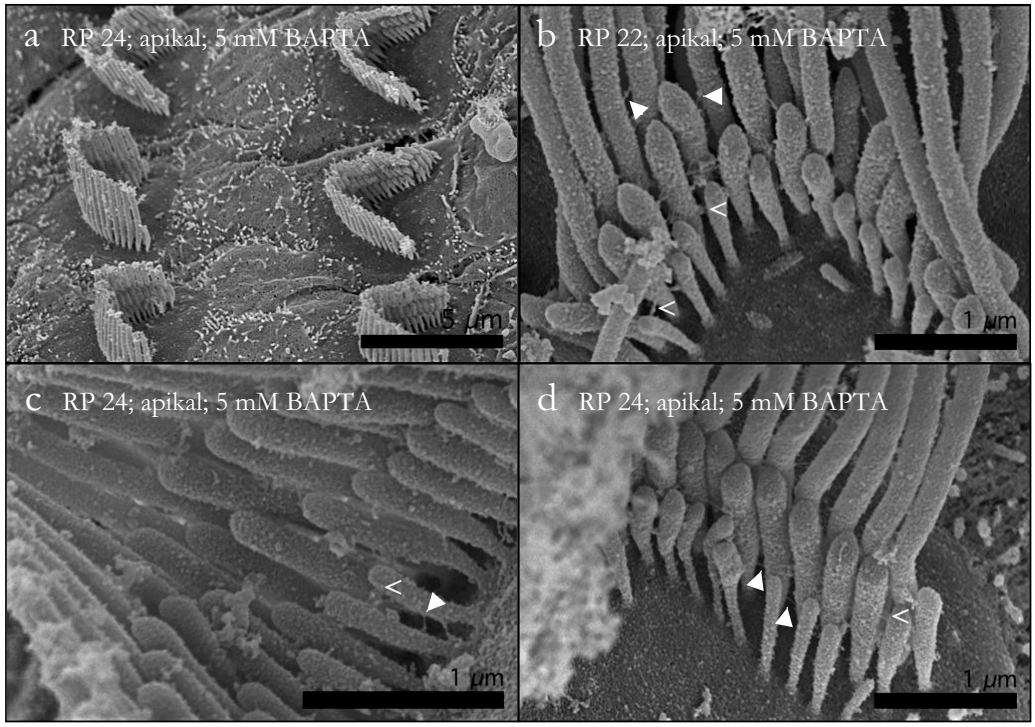

Abb. 3.7 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen apikaler Abschnitte des Cortischen Organs der Wistar Ratte am 22. bis 24. Tag nach ihrer Geburt nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA a) Übersicht über zwei Reihen der äußeren Haarsinneszellen: Die Haarbündelstruktur ist intakt und zeigt im Überblick keine Unterschiede zu den Kontrollen (RP 24). b) einzelnes Haarbündel einer äußeren Haarsinneszelle: BAPTA-induziert sind die Tip-Links vollständig zerstört, Lateral-Links (△) und Top-Connectors (<) vernetzen die Stereozilien (RP 22). c) einzelnes Haarbündel einer äußeren Haarsinneszelle: Auch hier sind die Tip-Links vollständig zerstört, Lateral-Links (△) und Top-Connectors (<) sind intakt (RP 24). d) Ausschnitt aus dem Haarbündel einer äußeren Haarsinneszelle: Auch bei diesem Haarbündel sind die Tip-Links durch BAPTA zerstört, Lateral-Links (△) und Top-Connectors (<) sind nicht betroffen (RP 24).
(RP 22-24: Ratte im Alter vom 22. bis 24. postnatalen Tag; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer)

Zur Kontrolle werden Präparate aller untersuchten Altersstufen anstatt in BAPTA für 30 Minuten in Extrazellulärlösung inkubiert (siehe Abb. 3.8). Es zeigt sich kein Unterschied zu den gleichaltrigen Haarbündeln, die ohne Verzug für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert werden (siehe Abb. 3.1; a, 3.2; a und 3.3; a).

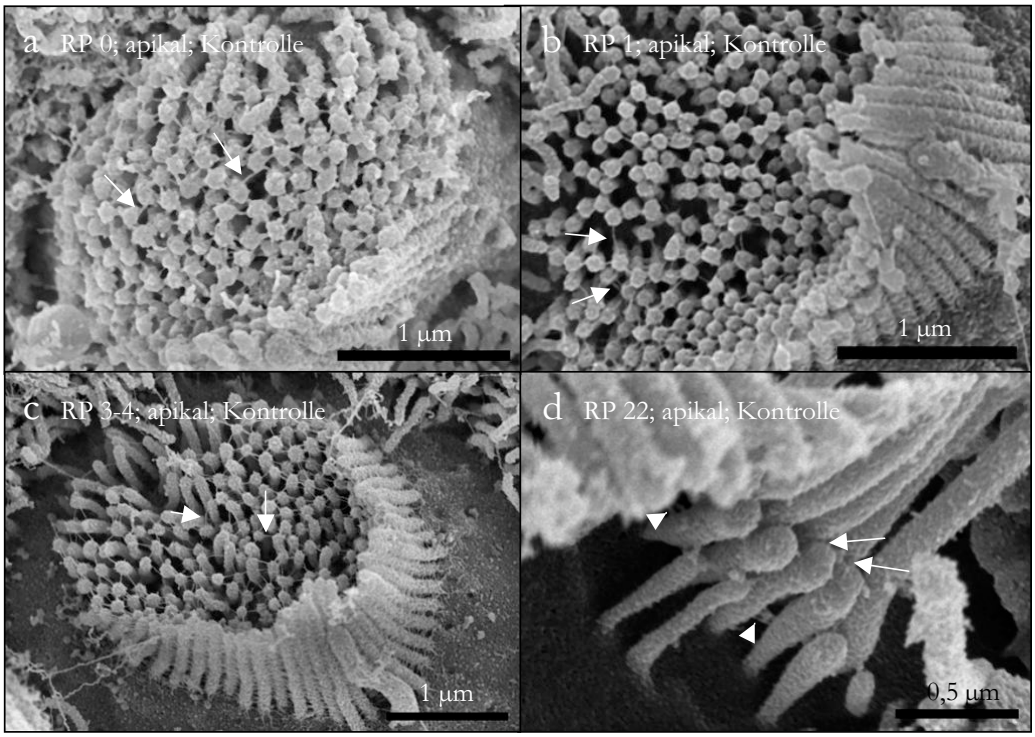

Abb. 3.8 Rasterelektronenmikroskopische Kontrollaufnahmen äußerer Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in Extrazellulärlösung a) apikales Haarbündel der früh-postnatalen Entwicklungsphase: Die Stereozilien sind durch undifferenzierte Links (→) vernetzt (RP 0). b) apikales Haarbündel: Die V-Form ist erkennbar, die Stereozilien sind durch Links (→) vernetzt (RP 1). c) apikales Haarbündel mit intakten Links (→) (RP 3-4); d) Detailaufnahme eines apikalen Haarbündels mit Tip-Links (→) und Lateral-Links (Δ) (RP 22)
(RP 0: Ratte am Tag der Geburt, RP 1: Ratten am Tag nach der Geburt, RP 3-4 Ratte am dritten bis vierten Tag nach der Geburt, RP22: Ratte am 22. Tag nach der Geburt; μm: Mikrometer)

3.2.1 Zwischenresümee

Zusammenfassend bestehen die Veränderungen bei der Wistar Ratte durch BAPTA zumindest bis zum Alter von drei bis vier Tagen in der Zerstörung aller Links der kochleären Haarbündel. Bei adulten Haarbündeln werden selektiv die Tip-Links durch BAPTA zerstört, die Lateral-Links und Top-Connectors sind nicht BAPTA-sensibel. Das Ergebnis dieser Arbeit bei adulten Ratten ist kongruent zu bereits publizierten Untersuchungen. Die vollständige Zerstörung aller Links bei postnatalen Ratten ist ein neuer Aspekt, der in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.
Bei sehr wenig entwickelten Haarsinneszellen (RP 0, apikal) kommt es zudem zur schweren Zerstörung der Haarbündelstruktur mit kugeliger Aufwölbung der apikalen Zelloberfläche und der Kutikularplatte und zum Teil zur Krümmung einzelner Stereozilien.

3.3 Regeneration der durch BAPTA zerstörten Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen

3.3.1 Morphologische Regeneration der zerstörten Haarbündelstruktur äußerer Haarsinneszellen

Der morphologische Nachweis der Regenerationsfähigkeit der äußeren Haarsinneszellen junger Ratten nach BAPTA-induziertem Verlust der Tip-Links soll mit dem Rasterelektronenmikroskop erbracht werden. Um den Ablauf der Regeneration nachvollziehen zu können, wurden einige der mit BAPTA behandelten Präparate nach einer Regenerationszeit von sechs Stunden unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Andere Präparate wurden erst nach 17 bis 20-stündiger Regeneration für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert. Kontrollpräparate wurden mit Extrazellulärlösung anstatt BAPTA behandelt. Die Morphologie nach BAPTA-induzierter Schädigung und Regeneration wurde bei bis zu zwei Tage alten Ratten an siebzehn Präparaten und bei Ratten im Alter von drei bis fünf Tagen an zehn Präparaten untersucht. Kontrollen nach Inkubation in Extrazellulärlösung und Regeneration wurden bei Ratten bis zum zweiten Lebenstag an 18 und bei Ratten vom dritten bis fünften Lebenstag an zehn Präparaten durchgeführt. Die in diesem Kapitel beschriebenen Veränderungen waren durchweg zu erkennen.

In Abbildung 3.9 ist die Morphologie der Haarbündel von Ratten am Tag ihrer Geburt oder am darauf folgenden Tag nach sechs Stunden Regeneration gezeigt. In den apikalen Abschnitten des Cortischen Organs (siehe Abb. 3.9; b und d) zeigt die Haarbündelstruktur noch einige Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abb. 3.9; a und c), die sich unverändert zu den Haarbündeln ohne Regenerationszeit (vgl. Abb. 3.1; a und d) darstellen. Die ehemals kugelige Kutikularplatte der mit BAPTA behandelten Präparate (vgl. Abb. 3.5; a und b) stellt sich wieder nahezu eben dar. Jedoch stehen die Stereozilien nicht alle parallel zueinander, sondern verlaufen teilweise divergent. An dieser Stelle sind Links zu sehen, welche die Stereozilien an ihren Schäften miteinander verbinden. Bei den BAPTA-behandelten Präparaten aus den medialen Abschnitten des Cortischen Organs (siehe Abb. 3.9; e und f) zeigen sich weniger Links als bei den Kontrollen. Die regenerierten Links können aufgrund der Längendifferenzierung der Stereozilien in Tip- und Lateral-Links differenziert werden.

Nach einer Regenerationszeit von 18 bis 20 Stunden ist kein Unterschied mehr zwischen den BAPTA-behandelten Präparaten und den Kontrollen festzustellen. Die Kutikularplatte stellt sich in den apikalen Abschnitten wieder flach dar und die Stereozilien stehen parallel und sind eng miteinander vernetzt (siehe Abb. 3.10; a und b). Bei den medialen Abschnitten ist eine große Anzahl an regenerierten Tip- und Lateral-Links festzustellen. Sowohl die apikalen als auch die medialen Abschnitte zeigen das Bild einer vollständigen Regeneration der Haarbündelstruktur und der Haarbündellinks. Eine morphologische Schädigung der Kontrollen bei bis zu 20 Stunden Regenerationszeit ist nicht zu erkennen (siehe Abb. 3.1).

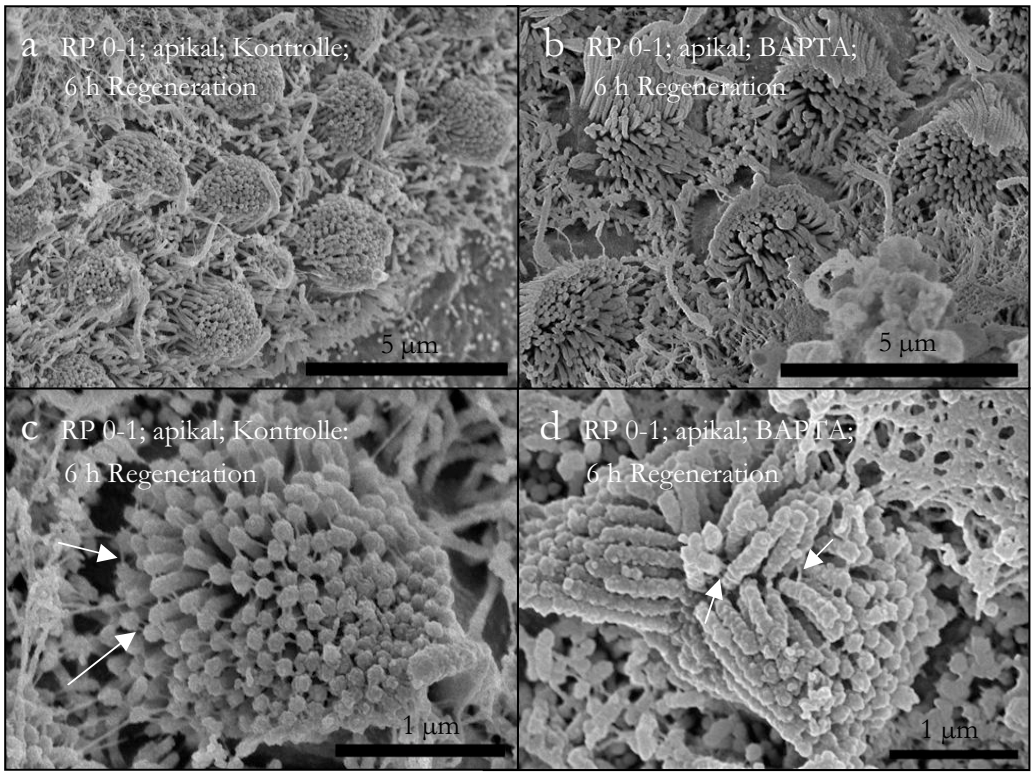

Abb. 3.9 Teil 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen äußerer Haarbündel des Cortischen Organs der Wistar Ratte im Alter von null bis einem Tag nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und sechsstündiger Regeneration a und c) Übersichtsaufnahme und Zielaufnahme einer apikalen Kontrolle nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und sechsstündigem Wachstum: Die Haarbündel sind morphologisch unverändert zu den Kontrollen ohne Regeneration (vgl. Abb. 3.1; a und d). Die Stereozilien stehen aufrecht und sind durch viele undifferenzierte Links vernetzt (→). b und d) Haarbündelübersicht und einzelnes Haarbündel des apikalen Abschnittes des Cortischen Organs nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und sechs Stunden Regeneration: Die Haarbündel sind noch nicht vollständig regeneriert. Zwar ist bereits eine deutliche Zunahme undifferenzierter Links (→) im Vergleich zu den Präparaten nach BAPTA-Behandlung ohne Regenerationszeit (vgl. Abb. 3.5; a und b) zu erkennen, die Haarbündelstruktur ist aber noch nicht vollständig wiederhergestellt. Einige Stereozilien sind noch abgeknickt. Die regenerierten Links, die weit voneinander entfernte Stereozilien vernetzen (→), befinden sich nicht an der Stereozilienspitze wie bei den Kontrollen, sondern verbinden die Stereozilienschäfte.
(RP 0-1: Ratte im Alter vom Tag der Geburt bis zum ersten postnatalen Tag; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer; h: Stunden)

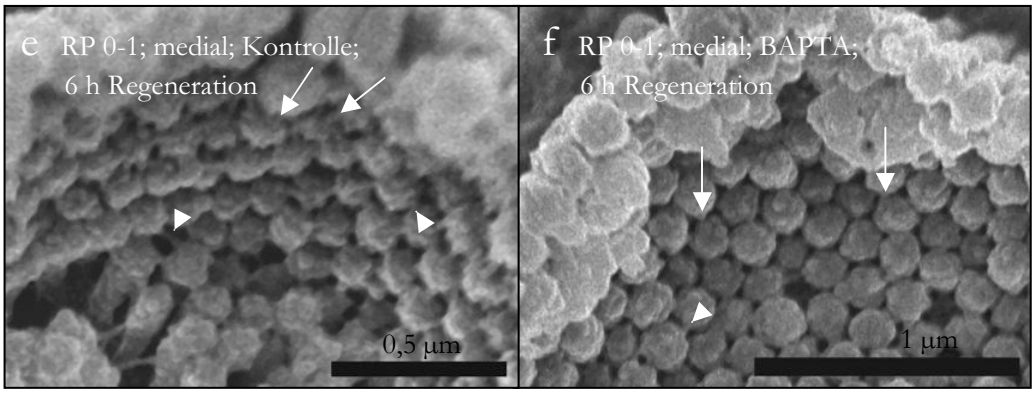

Abb. 3.9 Teil 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen äußerer Haarbündel des Cortischen Organs der Wistar Ratte im Alter von null bis einem Tag nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und sechsstündiger Regenerationszeit e) Ausschnitte eines medialen Haarbündels mit intakter Struktur und differenzierten Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und sechsstündiger Regeneration f) Ausschnitt eines medialen Haarbündels nach 30 Minuten Inkubationszeit in BAPTA und sechsstündiger Regeneration: Es sind regenerierte Links zu erkennen (vgl. Abb. 3.5; c und d). Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) können differenziert werden.
(RP 0-1: Ratte im Alter vom Tag der Geburt bis zum ersten postnatalen Tag; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer; h: Stunden)

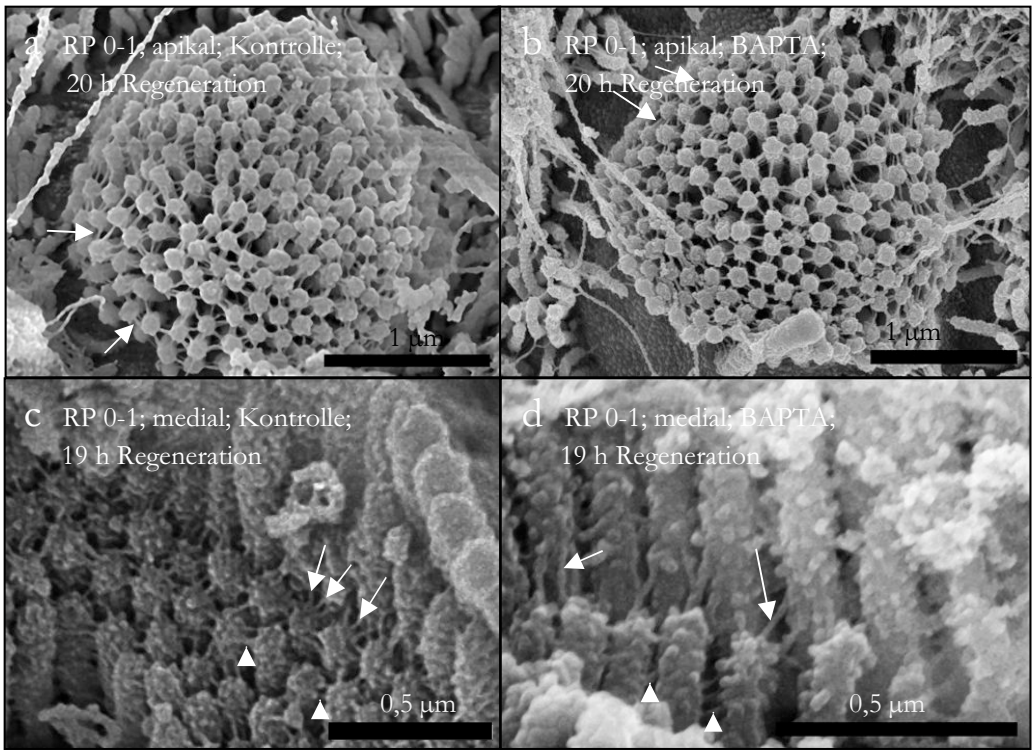

Abb. 3.10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen äußerer Haarbündel des Cortischen Organs der Wistar Ratte am Tag der Geburt oder einen Tag nach der Geburt nach 18- bis 20-stündiger Regenerationszeit a) Kontrollaufnahme eines apikalen Haarbündels nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und 20-stündigem Wachstum: Die Haarbündelstruktur ist intakt. Es sind keine morphologischen Unterschiede zu den Kontrollen ohne Wachstumszeit (vgl. Abb. 3.1; a) zu erkennen. Undifferenzierte Links (→) vernetzen die Stereozilien (RP 0-1). b) apikales Haarbündel nach 30-minütiger Behandlung in BAPTA und 20 Stunden Regeneration: Undifferenzierte Links (→) sind in großer Anzahl zu erkennen (vgl. Abb. 3.5; a und b). Ein Unterschied zu den Kontrollhaarbündeln besteht nicht (RP 0-1). c) Kontrolle einer medialen Haarsinneszelle nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und einer Wachstumszeit von 18 Stunden und 30 Minuten: Die Haarbündelstruktur ist intakt (vgl. Abb. 3.1; b) mit differenzierten Tip-Links (→) und Lateral-Links (∆) (RP 0). d) Aufnahme eines medialen Haarbündels nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und 19-stündiger Regeneration: Tip-Links (→) und Lateral-Links (∆) sind in großer Anzahl vorhanden (vgl. Abb. 3.5; c und d) (RP 0).
(RP 0-1: Ratte im Alter vom Tag der Geburt bis zum ersten postnatalen Tag; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer; h: Stunden)

Auch bei dem weiterentwickelten Cortischen Organ der Rattenkochlea am dritten bis vierten Tag nach Geburt zeigen die REM-Aufnahmen nach BAPTA-Behandlung und Regenerationszeit über sechs Stunden wieder differenzierte Tip-Links und Lateral-Links (siehe Abb. 3.11). In diesem Stadium ist es schwer abzuschätzen, ob die Haarbündel bereits nach sechs Stunden eine ähnliche Anzahl an Links besitzen wie die Kontrollen, oder ob eine volle Regeneration erst nach 17 bis 20 Stunden erreicht wird (siehe Abb. 3.12). Sowohl apikal, als auch medial stellen sich regenerierte Tip-Links und Lateral-Links in großer Anzahl dar.

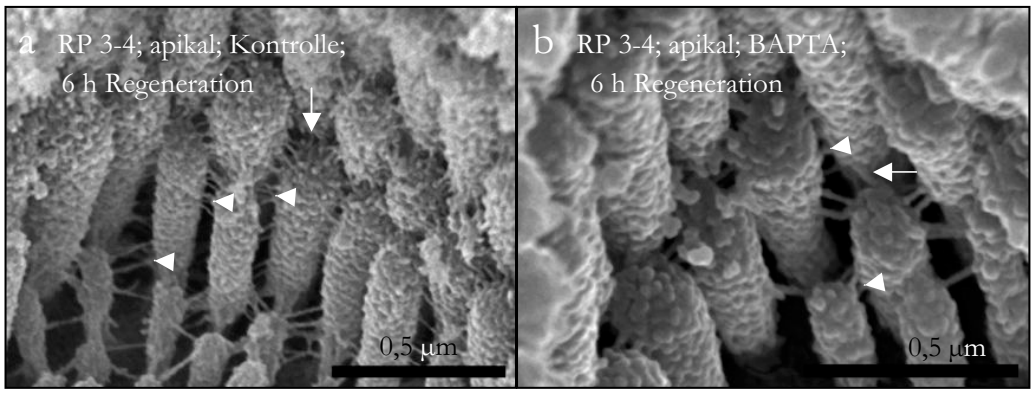

Abb. 3.11 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen äußerer Haarbündel des Cortischen Organs der Wistar Ratte am dritten bis vierten Tag nach Geburt nach Zerstörung aller Links mittels BAPTA und sechs Stunden Regeneration a) Kontrollaufnahme eines apikalen Haarbündels nach 30-minütiger Behandlung mit Extrazellulärlösung und Regeneration über sechs Stunden mit intakten Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) b) apikales Haarbündel nach Zerstörung der Tip-Links mittels 30-minütiger Inkubation in BAPTA und Regeneration über sechs Stunden: Regenerierte, differenzierte Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) sind erkennbar (vgl. Abb. 3.6).
(RP 3-4: Ratte im Alter von drei bis vier Tagen nach der Geburt; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer; h: Stunden)

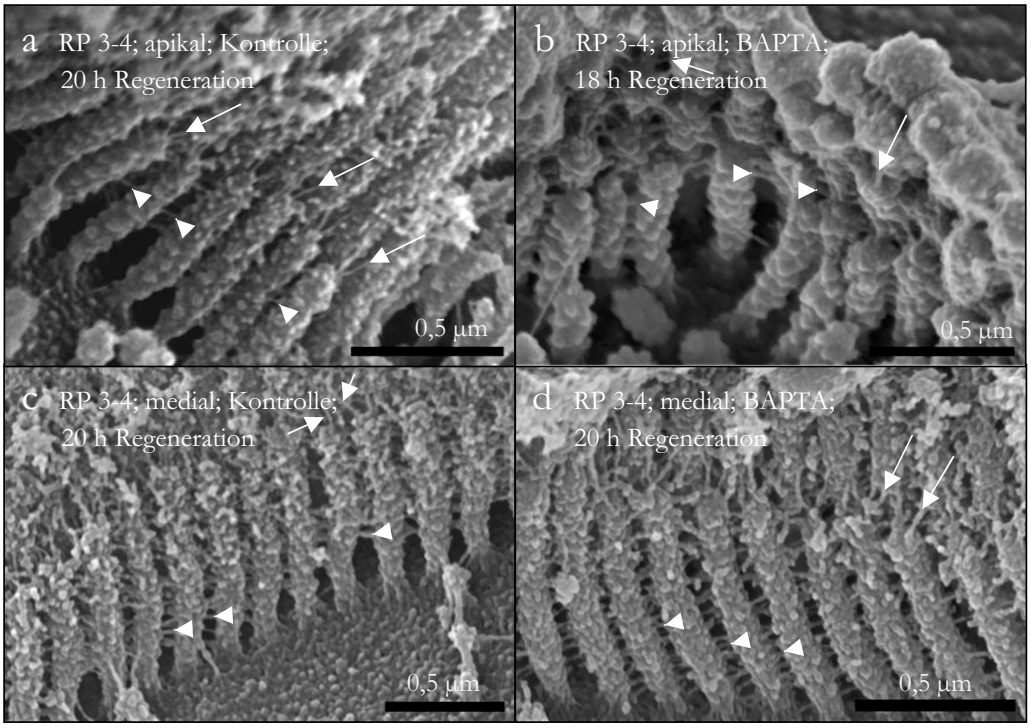

Abb 3.12 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen äußerer Haarbündel des Cortischen Organs der Wistar Ratte am dritten bis vierten Lebenstag nach BAPTA-induzierter Zerstörung der Links und 17 bis 20 Stunden Regeneration a) Kontrollaufnahme eines apikalen Haarbündels nach 30-minütiger Behandlung mit Extrazellulärlösung und Wachstum über 20 Stunden mit intakten Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) (vgl. Abb. 3.2; a und d) b) apikales Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und Regeneration über 17 Stunden und 30 Minuten: Regenerierte Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) sind eindeutig zu differenzieren (vgl. Abb. 3.6). c) Kontrollaufnahme eines medialen Haarbündels nach 30 Minuten in Extrazellulärlösung und 20-stündigem Wachstum mit Tip-Links (→) und Lateral-Links (△) (vgl. Abb. 3.2; b) d) mediales Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und 20 Stunden Regeneration mit einer großen Anzahl an regenerierten Tip-Links (→) und Lateral-Links (△)
(RP 3-4: Ratte im Alter von drei bis vier Tagen; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; μm: Mikrometer)

3.3.2 Zusammenfassung der morphologischen Daten

Die folgende Abbildung (siehe Abb. 3.13) zeigt bei unterschiedlichen Altersstadien der Wistar Ratte die normale Morphologie, die Morphologie nach Schädigung durch BAPTA und die Morphologie nach BAPTA-induzierter Schädigung und 20 Stunden Regeneration.

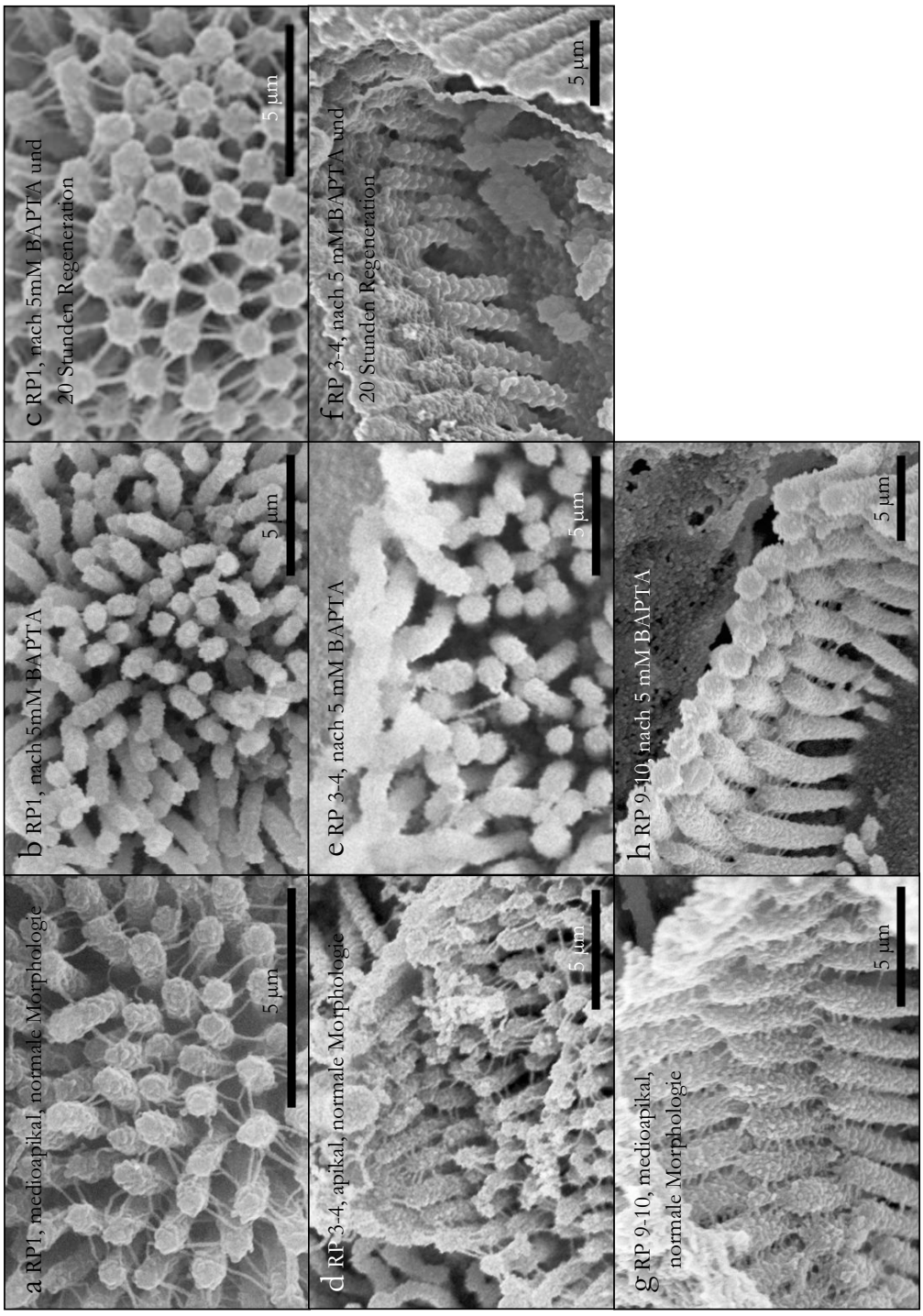

Abb. 3.13 Übersicht über die morphologische Schädigung der Haarbündel äußerer Haarsinneszellen nach Inkubation in 5 mM BAPTA und 20 Stunden Regeneration a, d und g) normale Morphologie apikaler bis medioapikaler Haarsinneszellen der Wistar Ratte im Alter von einem Tag bis zum zehnten Tag mit intakten Tip- und Lateral-Links; b, e und h) Morphologie der Haarbündellinks nach Inkubation in BAPTA; Die Links der Ratten im Alter von einem Tag bis zum vierten Tag werden vollständig zerstört. Bei Ratten im Alter von neun bis zehn Tagen sind rasterelektronenmikroskopisch Tip- und Lateral-Links zu sehen. c und f) Morphologie nach Inkubation in BAPTA und Regenerationzeit über 20 Stunden; bei Ratten bis zum Alter von vier Tagen regenerieren die Links in großer Anzahl. Bei älteren Tieren kann die Regeneration rasterelektronenmikroskopisch nicht kontrolliert werden, da keine vollständige Zerstörung der Links durch BAPTA stattfindet.
(RP 1: Ratte im Alter von einem Tag, RP3-4: Ratte im Alter von drei bis vier Tagen, RP 9-10: Ratte im Alter von neun bis zehn Tagen; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; µm: Mikrometer)

3.3.3 Quantitativer Regenerationsnachweis durch laserdifferentialinterferometrische Steifigkeitsmessungen

Die quantitative Überprüfung der Regenerationsfähigkeit erfolgt an zwei Beispielpopulationen der Wistar Ratte: Die Steifigkeit wird an den medialen Cochleaabschnitten von Ratten im Alter weniger Stunden und an den apikalen Abschnitten des Cortischen Organs bei drei bis vier Tage alten Ratten gemessen. Da nicht klar ist, ob sich die drei Reihen der äußeren Haarsinneszellen gleich verhalten, werden sie getrennt voneinander betrachtet. Für die Analyse der Daten wird eine Normalverteilung angenommen. Bei manchen Gruppen finden sich allerdings vermehrt Ausreißer mit hoher Steifigkeit, was sich in hohen Werten der dritten Quartile wiederspiegelt.

Bei den Ratten im Alter von wenigen Stunden (siehe Abb. 3.14) zeigen die Kontrollmessungen (siehe Abb. 3.14; a) keine signifikanten Steifigkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Reihen. Die Steifigkeit direkt nach Inkubation mit 5 mM BAPTA wurde nicht gemessen, da hier die Stereozilien stark gebogen sind, wie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Haarbündel zeigen (siehe Abb. 3.5). Es ist somit nicht mehr davon auszugehen, dass sich die Stereozilien wie harmonische Oszillatoren verhalten. Nach einer Wachstumsphase im Brutschrank von 18 bis 20 Stunden zeigen die Haarsinneszellen in der Kontrollgruppe bei allen Reihen eine nicht-signifikante Steifigkeitszunahme (innere Reihen: $p = 0{,}140$, mittlere Reihen: $p = 0{,}202$, äußere Reihen: $p = 0{,}158$ siehe Abb. 3.14; c). Von diesen Steifigkeitswerten unterscheiden sich die mit BAPTA vorbehandelten Zellen nach einer Regenerationsdauer von 18 bis 19 Stunden nicht signifikant (innere Reihen: $p = 0{,}704$, mittlere Reihen: $p = 0{,}658$, äußere Reihen: $p = 0{,}604$ siehe Abb. 3.14; d).

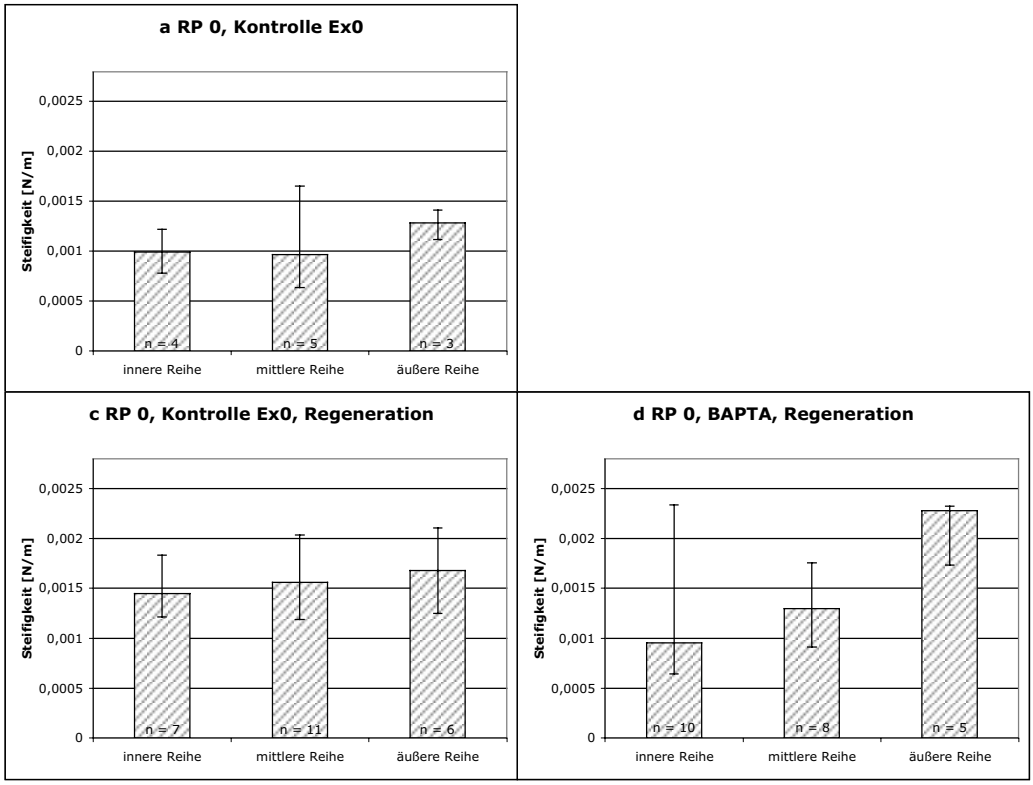

Abb. 3.14 Steifigkeit medialer Haarbündel von Ratten am Tag der Geburt a) Steifigkeit der einzelnen Reihen gemessen in Extrazellulärlösung c) Steifigkeit der Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in Extrazellulärlösung und anschließender Regenerationszeit von 18 bis 20 Stunden d) Steifigkeit nach 30-minütiger Inkubation in 5 mM BAPTA und Regenerationszeit von 18 bis 19 Stunden

Die Säulen zeigen den jeweiligen Median an, die Fehlerbalken markieren die erste und dritte Quartile.

(RP 0: Ratten am Tag der Geburt; Ex0: Extrazellulärlösung; BAPTA: 1,2-Bis(o-amino-phenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; mM: Millimolar; N: Newton; m: Meter; n: Anzahl der durchgeführten Messungen)

Bei den Haarsinneszellen der Kochlea von Ratten im Alter von drei bis vier Tagen (siehe Abb. 3.15; a) zeigt sich, dass bei den mit Extrazellulärlösung behandelten Haarbündeln die inneren Reihen eine höhere Steifigkeit aufweisen, als die mittleren und die äußeren. Diese Tendenz zeigt sich auch nach Inkubation in BAPTA (siehe Abb. 3.15 b). Nach BAPTA-Behandlung und Regeneration von 17 h 30 min bis 21 h 30 min sind allerdings die äußeren Reihen steifer als die mittleren und die inneren (siehe Abb. 3.15 d). Alle Reihen zeigen nach Inkubation in BAPTA eine signifikante Steifigkeitsabnahme (innere Reihe: $p = 0{,}008$, Steifigkeitsabnahme auf 42,77 % der Kontrollgruppe; mittlere Reihe: $p = 0{,}017$, Steifigkeitsabnahme auf 36,52 % der Kontrollgruppe; äußere Reihe: $p = 0{,}001$, Steifigkeitsabnahme auf 34,93 % der Kontrollgruppe). Die Kontrollgruppe mit Inkubation in Extrazellulärlösung und Regenerations-

dauer von 18 h 30 min bis 20 h 45 min (siehe Abb. 3.15 c) unterscheidet sich weder von der Kontrollgruppe ohne Regeneration signifikant (mittlere Reihe: p = 0,836, äußere Reihe: p = 0,302), noch findet sich ein Unterschied zu den Haarbündeln nach Inkubation in BAPTA und Regeneration von 17 h 30 min bis 21 h 30 min (siehe Abb. 3.15 d; mittlere Reihe: p = 0,211, äußere Reihe: p = 0,892). Es zeigt sich aber eine Steifigkeitszunahme nach BAPTA-Behandlung und Regeneration im Vergleich zu den BAPTA-behandelten Zellen ohne Regenerationszeit. Nicht signifikant ist diese Zunahme bei der inneren Reihe mit p = 0,084, signifikant aber bei der mittleren Reihe mit p = 0,003 und bei der äußeren Reihe mit p = 0,002. Die BAPTA-behandelte innere Reihe der Haarbündel nimmt nach der Regenerationszeit um 67,24 % an Steifigkeit zu im Vergleich zu den Präparaten nach BAPTA-Behandlung ohne Regenerationszeit, die mittleren Haarbündel verdreifachen nahezu ihre Steifigkeit durch die Regeneration (298,71 %), die äußeren vervierfachen nahezu ihre Steifigkeit durch die Regeneration (388,84 %).

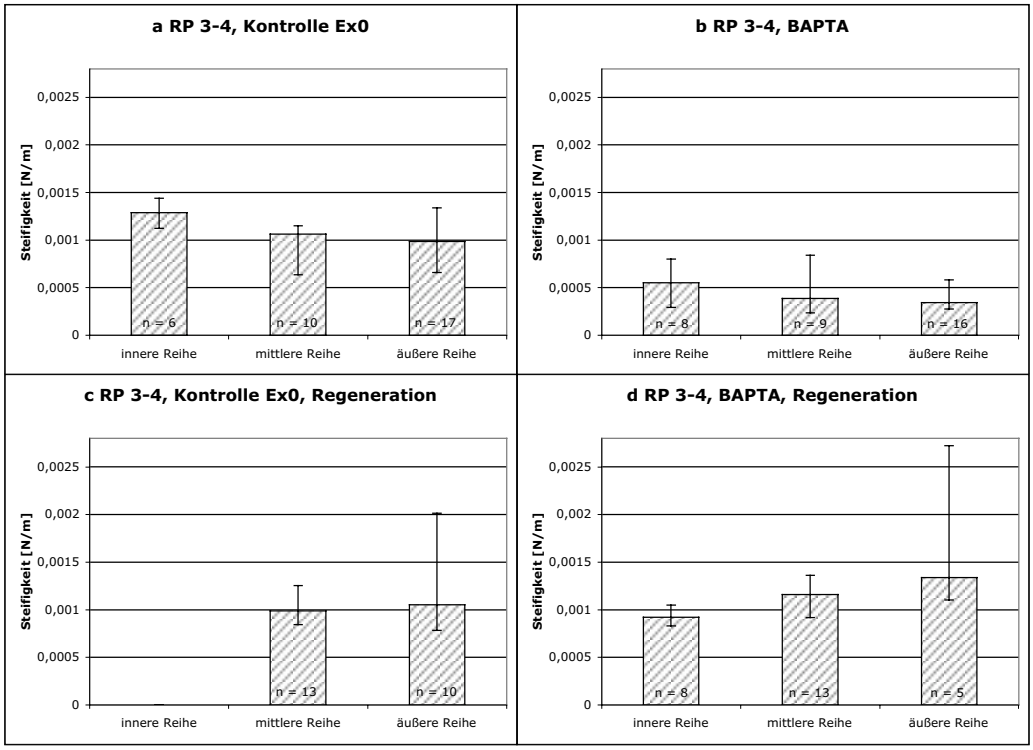

Abb. 3.15 Steifigkeit apikaler Haarbündel von Ratten am dritten bis vierten Tag nach Geburt a) Steifigkeit der einzelnen Reihen gemessen in Extrazellulärlösung b) Haarbündelsteifigkeit nach Inkubation in 5 mM BAPTA c) Haarbündelsteifigkeit nach 30-minütiger Inkubation in Extrazellulärlösung und Regeneration über 18 h 30 min bis 20 h 45 min d) Steifigkeit nach 30-minütiger Inkubation in 5 mM BAPTA und Regenerationsdauer von 17 h 30 min bis 21 h 30 min
Die Säulen zeigen den jeweiligen Median an, die Fehlerbalken markieren die erste und dritte Quartile.
(RP 3-4: Ratten am dritten bis vierten Tag nach Geburt; Ex0: Extrazellulärlösung; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure; mM: Millimolar; N: Newton; m: Meter; n: Anzahl der durchgeführten Messungen; h: Stunden; min: Minuten)

3.3.4 Funktioneller Nachweis der Haarbündelregeneration nach Zerstörung der Tip-Links durch BAPTA

Der entscheidende Punkt zur vollständigen, funktionstauglichen Regeneration ist die Verbindung der gespannten Tip-Links mit den MET-Kanälen. Diese Kontrolle wird mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX durchgeführt, der nur dann in die Haarbündel gelangt, wenn diese Kanäle eine hohe Offenwahrscheinlichkeit zeigen (siehe Kapitel 2.3). Die Offenwahrscheinlichkeit wird durch gespannte Tip-Links erhöht.
Bei den in diesem Kapitel gezeigten Bildern liegen die Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen in der Bildebene und sind somit V-förmig dargestellt. Die Zellkörper der inneren Haarsinneszellen sind häufig in dieser Ebene angeschnitten und erscheinen gelegentlich heller als die Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen, da hier ein größeres Volumen angeschnitten ist. Bei fluoreszierenden Haarbündeln der äußeren Haarsinneszellen fluoreszieren die Zellkörper dieser Zellen ebenfalls durchweg mit vergleichbarer Intensität wie die Zellkörper der inneren Haarsinneszellen. Die Ebene wurde in dieser Arbeit gewählt, um die Intaktheit der Haarbündel der äußeren Haarsinneszellen demonstrieren zu können
FM 1-43FX färbt selektiv die äußeren und inneren Haarsinneszellen des mit Extrazelulärlösung behandelten apikalen Teil des Cortischen Organs an (siehe Abb. 3.16 a). Der apikale Abschnitt des Cortischen Organs von Ratten im Alter von einem Tag nach ihrer Geburt wird direkt nach BAPTA-Behandlung in FM 1-43FX inkubiert (siehe Abb. 3.16 b). Durch die vollständige Zerstörung der Tip-Links sind nahezu alle MET-Kanäle geschlossen. FM 1-43FX gelangt nicht in das Zellinnere. Nach Regenerationszeit von 18 bis 20 Stunden bleibt das Ergebnis bei den mit Extrazellulärlösung behandelten Kontrollen (siehe Abb. 3.16 c) unverändert im Vergleich zu den Kontrollen ohne Regeneration. Bei den mit BAPTA behandelten Präparaten zeigt sich nach Regeneration von 18 Stunden ein Eintritt von FM 1-43FX in das Zellinnere (siehe Abb. 3.16 d). Unklar ist jedoch noch, ob der fluoreszierende Farbstoff wirklich durch den regenerierten Transduktionsapparat in die Zelle gelangt, oder ob FM 1-43FX durch die Zellmembran gelangt, die infolge der Regenerationszeit in ihrer Integrität geschädigt ist. Dies wird mit Hilfe von DHSM untersucht, einem selektiven Blocker des MET-Kanals. Abbildung 3.17 a zeigt die Haarsinneszellen nach BAPTA-Behandlung und 18 Stunden Regenerationszeit. In Abbildung 3.17 b und c werden die Transduktionskanäle nach Inkubation in BAPTA bzw. Ex0 und Regeneration von 18 bzw. 19 Stunden zuerst mit DHSM verschlossen, ehe die Zellen in FM 1-43FX inkubiert werden. DHSM blockiert die mechanoelektrischen Transduktionskanäle bei inneren und äußeren Haarsinneszellen und verhindert so einen Eintritt von FM 1-43FX. In Abbildung 3.17 c sind die Zellkörper der inneren Haarsinneszellen schwach zu sehen.

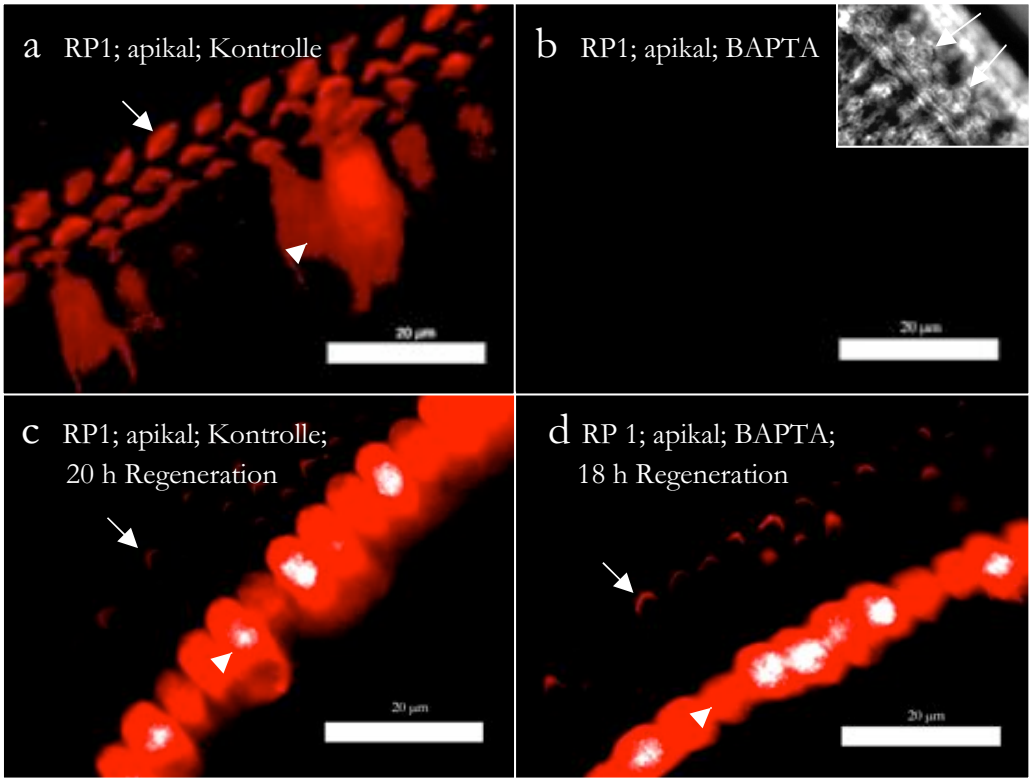

Abb 3.16 Haarbündelaufnahmen der äußeren (→) und inneren (△) Haarsinneszellen der apikalen Kochlea der Wistar Ratte am ersten Tag nach Geburt mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX a) Kontrollaufnahme eines für 30 Minuten mit Extrazellulärlösung behandelten Präparates ohne Regenerationszeit: FM 1-43FX kann durch den geöffneten MET-Kanal in das Zellinnere gelangen. b) Aufnahme der apikalen Haarsinneszellen nach 30-minütiger Behandlung mit BAPTA ohne Regenerationszeit, Inlay: DIC-Aufnahme derselben Stelle des Präparates zur Demonstration der Integrität des Präparats: Die Körper der Haarsinneszellen sind intakt, die Haarbündel (→) stehen noch nicht in der typischen V-Form (vgl. Abb. 3.4) und sind deshalb in der lichtmikroskopischen Aufnahme nur schwer zu erkennen. c) Kontrollaufnahme der apikalen Haarbündel nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und 20-stündiger Regenerationszeit d) Aufnahme der apikalen Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und 18 Stunden Regenerationszeit
(RP 1: Ratte im Alter von einem Tag postnatal; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N´,N´-tetraessigsäure; MET-Kanal: Mechanoelektrischer Transduktionskanal; DIC: Differentialinterferenzkontrast; μm: Mikrometer; h: Stunden)

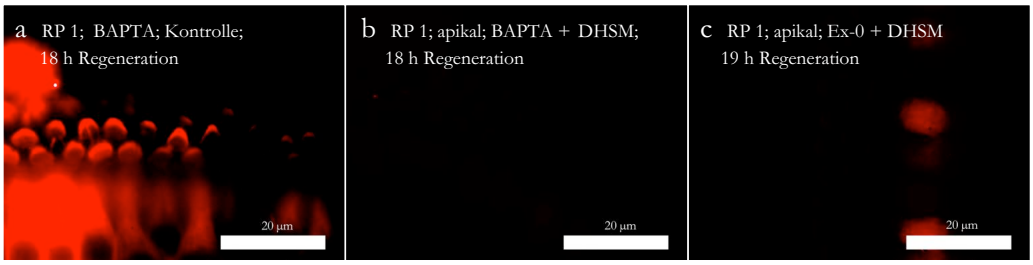

Abb 3.17 Kontrollaufnahmen zum Ausschluss der Membranschädigung nach Regeneration: apikale Abschnitte der Kochlea der Wistar Ratte am ersten Tag nach der Geburt mit FM 1-43FX und DHSM, dem Blocker des mechanosensitiven Transduktionskanals nach 18 bis 19 Stunden Regeneration a) Kontrolle ohne DHSM-Behandlung nach 30-minütiger BAPTA-Behandlung und 18 Stunden Regenerationszeit mit Einstrom von FM 1-43FX durch die geöffneten MET-Kanäle b) Aufnahme nach 30-minütiger Inkubation des Präparats in BAPTA und anschließender Regeneration über 18 Stunden, anschließender Inkubation in DHSM zum Block der MET-Kanäle und Inkubation in FM 1-43FX c) Aufnahme nach Behandlung mit Extrazellulärlösung und 19-stündiger Regeneration, Block der MET-Kanäle mit DHSM und Inkubation in FM 1-43FX
(RP 1: Ratte im Alter von einem Tag postnatal; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N´,N´-tetraessigsäure; DHSM: Dihydrostreptomycin; MET-Kanal: mechanoelektrischer Transduktionskanal; μm: Mikrometer; h: Stunden)

Exakt dieselben Experimente werden an den medialen Abschnitten des Cortischen Organs von Ratten im Alter von einem Tag nach der Geburt durchgeführt. In Abbildung 3.18 a sind die mit Extrazellulärlösung behandelten Kontrollen zu sehen. Abbildung 3.18 b zeigt ein Präparat direkt nach BAPTA-Behandlung. In Abbildung 3.18 c und d sind Kontrollen und mit BAPTA behandelte Präparate nach Regeneration von sechs Stunden zu sehen. Bereits nach dieser kurzen Regeneration sind einige Haarbündellinks wieder zur Teilnahme am Transduktionsprozess fähig. In Abbildung 3.18 e und f ist die Regeneration auf 18 bis 20 Stunden ausgeweitet. Abbildung 3.18 g zeigt die Haarbündel nach Block der MET-Kanäle mit DHSM und anschließender Inkubation in FM 1-43FX.

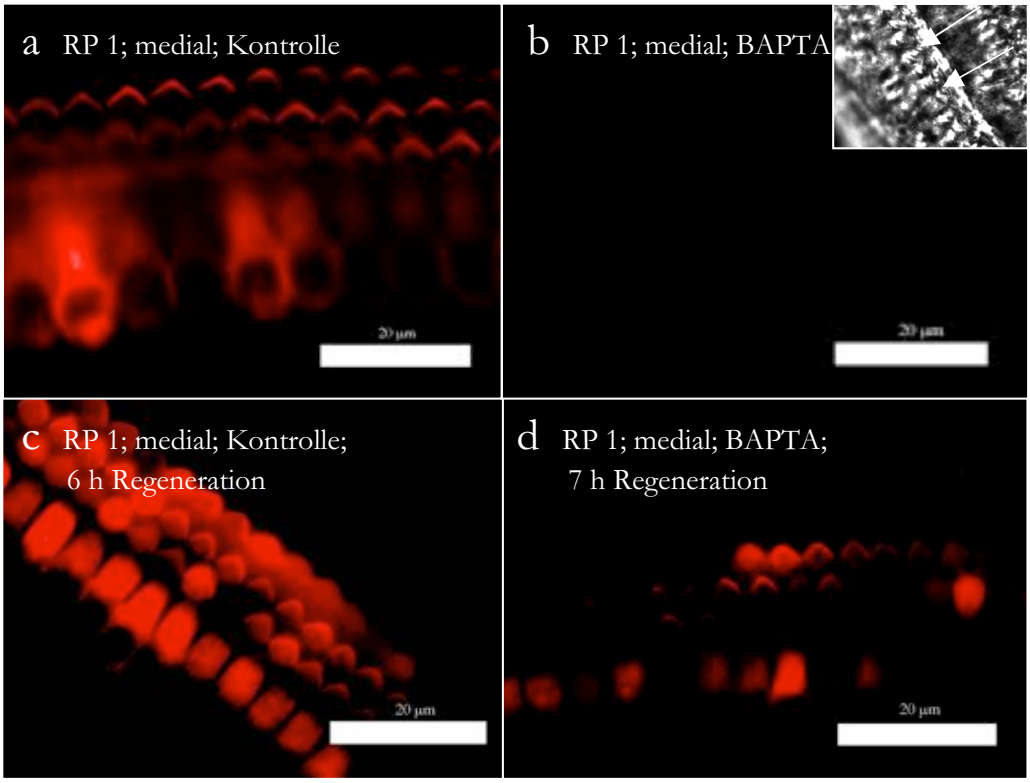

Abb 3.18 Teil 1 der Haarbündelaufnahmen der äußeren und inneren Haarsinneszellen der medialen Kochlea der Wistar Ratte am ersten postnatalen Tag mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX a) Kontrollaufnahme eines für 30 Minuten mit Extrazellulärlösung behandelten Präparats ohne Regenerationszeit b) Aufnahme der medialen Haarsinneszellen nach 30-minütiger Behandlung mit BAPTA ohne Regenerationszeit, Inlay: DIC-Aufnahme des Präparats: Die Körper der Haarsinneszellen sind intakt, die Haarbündel (schwarz) stehen bereits in der typischen V-Form (→). c) Kontrolle der medialen Haarbündel nach 30 Minuten in Extrazellulärlösung und sechs Stunden Regeneration d) Aufnahme nach BAPTA-Behandlung und Regenerationszeit von sechs Stunden und 45 Minuten
(RP 1: Ratte im Alter von einem Tag postnatal; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N´,N´-tetraessigsäure; MET-Kanal: mechanoelektrischer Transduktionskanal; DIC: Differentialiterferenzkontrast; μm: Mikrometer; h: Stunden)

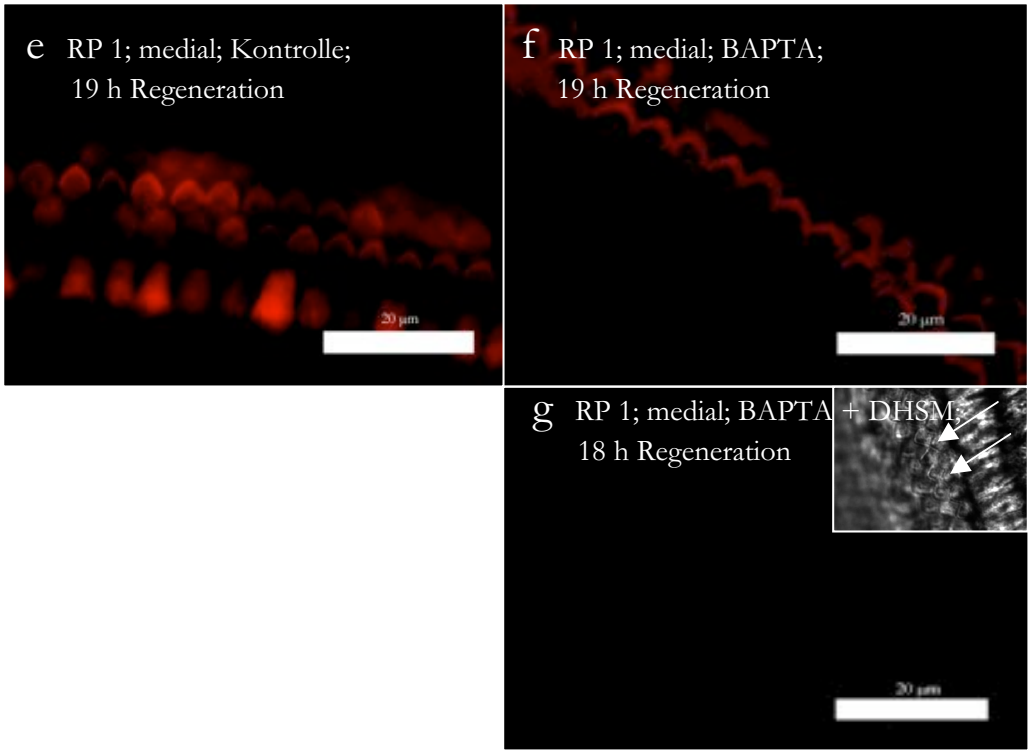

Abb 3.18 Teil 2 der Haarbündelaufnahmen der äußeren und inneren Haarsinneszellen der medialen Kochlea der Wistar Ratte am ersten Tag nach Geburt mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX e) Kontrollaufnahme der medialen Haarbündel nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und 19 Stunden und 20 Minuten Regenerationszeit f) Aufnahme der medialen Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und 18 Stunden und 50 Minuten Regenerationszeit g) Kontrolle der Zellintegrität nach BAPTA-Behandlung und 18 Stunden Regenerationszeit, anschließender Block der MET-Kanäle mit DHSM vor Inkubation in FM 1-43FX, Inlay: DIC-Aufnahme des Präparats. Die Zellkörper und Haarbündel sind intakt (→).

(RP 1: Ratte im Alter von einem Tag postnatal; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N´,N´-tetraessigsäure; DHSM: Dihydrostreptomycin; MET-Kanal: mechanoelektrischer Transduktionskanal; DIC: Differentialinterferenzkontrast; μm: Mikrometer; h: Stunden)

Die Experimente werden bei unterschiedlich alten Ratten durchgeführt. Die Resultate sind in Abbildung 3.19 und 3.20 dargestellt. Abbildung a zeigt jeweils die Kontrollen, Abbildung b zeigt die Haarbündel direkt nach BAPTA-Behandlung. Auch bei den weiter entwickelten Haarbündeln erniedrigt BAPTA die Offenwahrscheinlichkeit des Transduktionskanals drastisch. Abbildung c und d zeigen die Kontrolle bzw. die BAPTA-behandelten Präparate nach 18 bis 19 Stunden Regenerationszeit. Auch hier zeigt sich die Regeneration der Transduktionskanalfunktion. In Abbildung 3.20 ist allerdings eine leichte Reduktion der Intensität der Kontrolle nach 18 Stunden Regeneration (Abb. 3.20 c) im Vergleich zu den Kontrollen ohne Regeneration (3.20 a) zu erkennen. Abbildung e zeigt den Eintritt von FM 1-43FX nach dem Block der MET-Kanäle mit DHSM. Die Zellmembran erscheint auch nach 18 bis 19 Stunden Regeneration noch intakt, da kein FM 1-43FX in die Haarbündel gelangt.

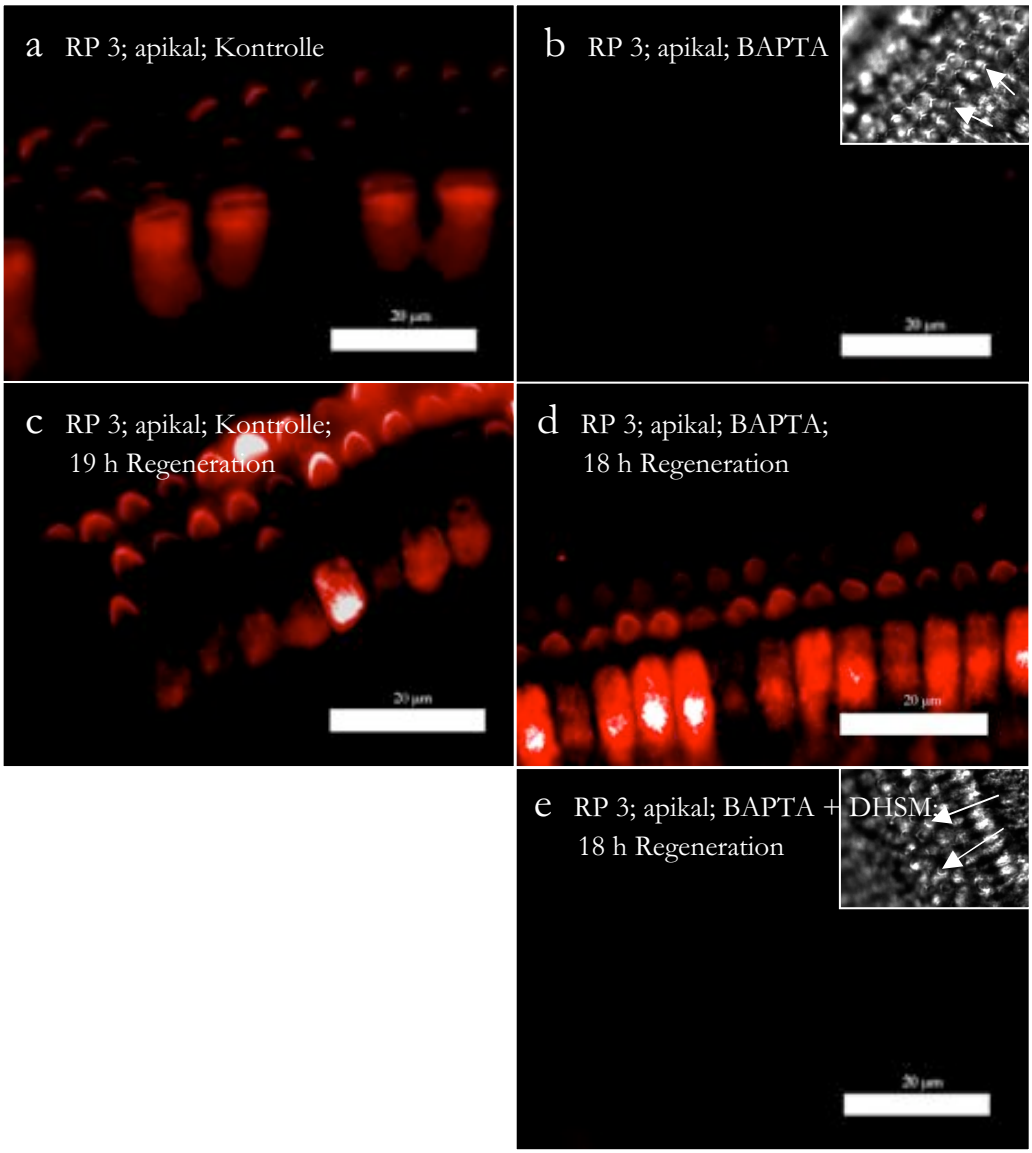

Abb 3.19 Rasterelektronenmikroskopische Haarbündelaufnahmen der äußeren und inneren Haarsinneszellen der apikalen Kochlea der Wistar Ratte am dritten postnatalen Tag mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX a) Kontrollaufnahme eines für 30 Minuten mit Extrazellulärlösung behandelten Präparats ohne Regenerationszeit b) Aufnahme der apikalen Haarbündel nach 30-minütiger Behandlung mit BAPTA ohne Regenerationszeit, Inlay: DIC-Aufnahme des Präparats: Die Körper der Haarsinneszellen und die V-förmigen Haarbündel sind intakt (→). c) Kontrollaufnahme der apikalen Haarbündel nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und 18 Stunden und 30 Minuten Regenerationszeit d) Aufnahme der apikalen Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und 18-stündiger Regeneration e) Kontrolle der Zellintegrität nach BAPTA-Behandlung und 18 Stunden Regenerationszeit, Block der MET-Kanäle mit DHSM und Inkubation in FM 1-43FX, Inlay: DIC-Aufnahme des Präparats. Die Zellkörper und Haarbündel sind intakt (→).
(RP 3: Ratte im Alter von drei Tagen postnatal; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N´,N´-tetraessigsäure; DHSM: Dihydrostreptomycin; MET-Kanal: mechanoelektrischer Transduktionskanal; DIC: Differentialinterferenzkontrast; μm: Mikrometer; h: Stunden)

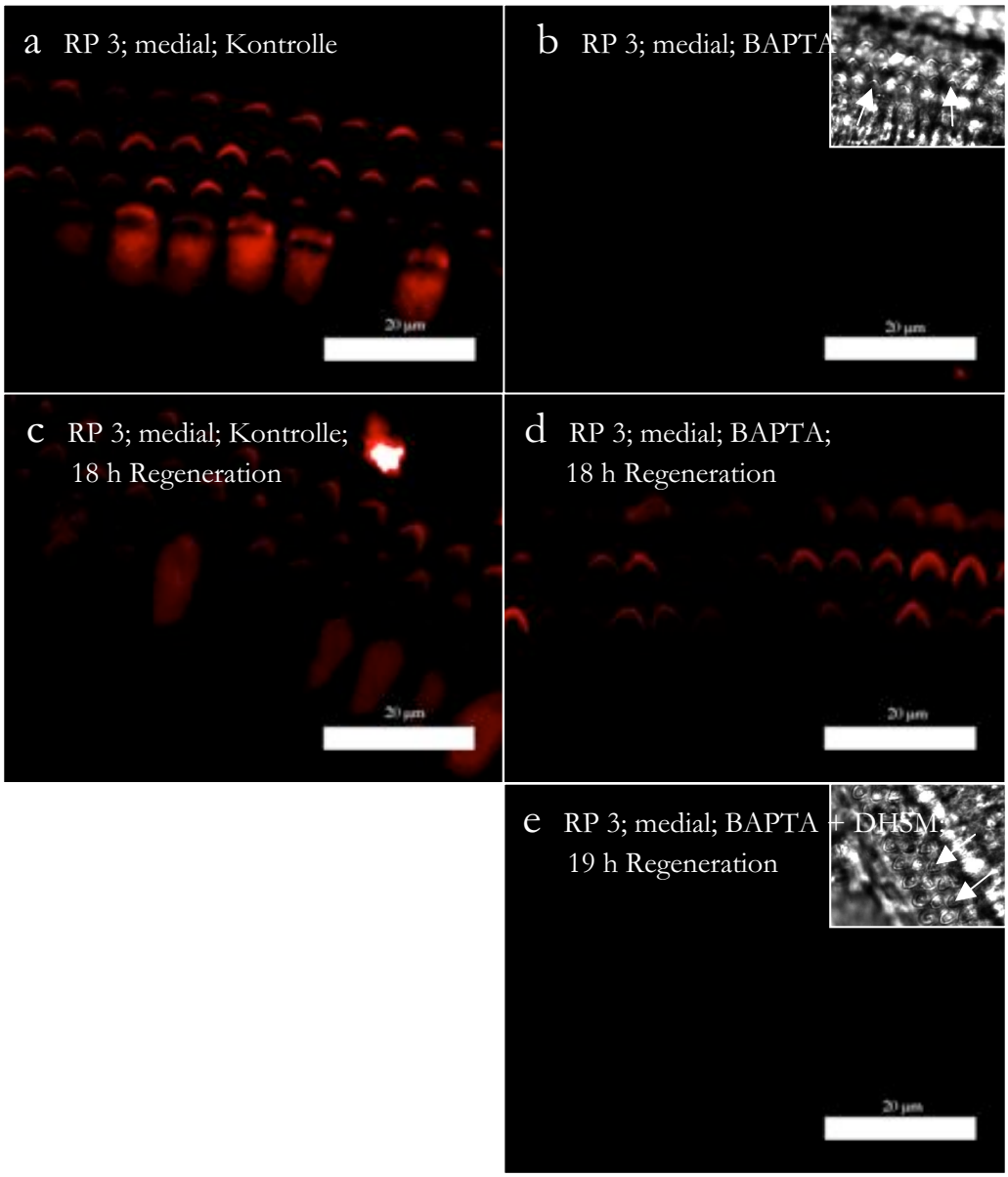

Abb 3.20 Haarbündelaufnahmen der äußeren und inneren Haarsinneszellen der medialen Kochlea der Wistar Ratte am dritten postnatalen Tag mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker FM 1-43FX a) Kontrollaufnahme eines für 30 Minuten in Extrazellulärlösung belassenen Präparats b) Aufnahme der medialen Haarsinneszellen nach 30-minütiger Behandlung in BAPTA, Inlay: DIC-Aufnahme des Präparats: Die Körper der Haarsinneszellen und die V-förmigen Haarbündel sind intakt (→). c) Kontrollaufnahme der medialen Haarbündel nach 30-minütiger Behandlung in Extrazellulärlösung und 18-stündiger Regeneration d) Aufnahme der medialen Haarbündel nach 30-minütiger Inkubation in BAPTA und 18 Stunden Regeneration e) Kontrolle der Zellintegrität nach BAPTA-Behandlung und 19-stündiger Regeneration mit Block der MET-Kanäle durch DHSM und Inkubation in FM 1-43FX, Inlay: DIC-Aufnahme des Präparats: Die Zellkörper und Haarbündel sind intakt (→).
(RP 3: Ratte im Alter von drei Tagen postnatal; BAPTA: 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,-N´,N´-tetraessigsäure; DHSM: Dihydrostreptomycin; MET-Kanal: mechanoelektrischer Transduktionskanal; DIC: Differentialinterferenzkontrast; μm: Mikrometer; h: Stunden)

4 Diskussion

4.1 Entwicklung der Haarbündelmorphologie und Haarbündellinks der Wistar Ratte

4.1.1 Morphologie kochleärer Haarsinneszellen während der Entwicklung

Um die Regenerationsfähigkeit der postnatalen Haarsinneszellen beurteilen zu können, wird zunächst die physiologische Haarbündelentwicklung mit dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Bei der Wistar Ratte im Alter von wenigen Stunden stellen sich die Haarbündel rund dar, die typische V-Form ist noch nicht entwickelt. Die Stereozilien sind durch undifferenzierte Links miteinander verbunden. Bereits am dritten bis vierten Tag nach der Geburt zeigt sich die charakteristische V-Form der Haarbündel mit drei Stereozilienreihen. Durch die Längendifferenzierung der Stereozilien lassen sich nun auch die Links unterscheiden. Im Alter von drei bis vier Tagen sind Tip-Links und Lateral-Links zu erkennen, bei adulten Ratten kommen zusätzlich Top-Connectors hinzu. Die Anzahl der Links nimmt während der Entwicklung ab dem dritten bis vierten Tag drastisch ab. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Entwicklung der Haarbündelmorphologie dieser Arbeit ist zu großen Teilen kongruent zu den beschriebenen Entwicklungsabläufen, die ebenfalls mit einem Rasterelektronenmikroskop an Ratten durchgeführt wurden [Lenoir M. et al (1987)], [Zine A., Romand R. (1996)].

4.1.2 Mechanische Eigenschaften der Haarbündel

Die laserdifferentialinterferometrische Bestimmung der Gesamtsteifigkeit der Haarbündel wird ergänzend zu der morphologischen Untersuchung der Haarbündelentwicklung eingesetzt, um die Auswirkung der intrazellulären Entwicklung des Aktin-Zytoskeletts zu beurteilen. Die Experimente ergeben, dass die Haarbündelsteifigkeit am dritten bis vierten Lebenstag größer ist als am Tag der Geburt. Zudem sind in beiden Stadien die medialen Haarbündel steifer als die apikalen (siehe Abb. 3.4). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass mit zunehmender Entwicklung die Haarbündel steifer werden. Bei der Haarbündelentwicklung laufen zwei Prozesse ab: Zum einen nimmt die Dichte der Aktinfilamente in den Stereozilien zu, was die Stereozilien steifer macht, zum anderen sinkt die Dichte der Haarbündellinks und damit auch deren Anteil der Gesamtsteifigkeit. Die in dieser Arbeit gemessene Zunahme der Haarbündelsteifigkeit während der Entwicklung zeigt, dass für die Gesamtsteifigkeit die Stereoziliensteifigkeit eine größere Rolle spielen als der Vernetzungsgrad der Stereozilien.
Bei den unbehandelten Haarbündeln der Ratten im Alter von drei bis vier Tagen (siehe Abb. 3.15; a) zeigen Haarbündel der inneren Reihe eine größere Steifigkeit als die der mittleren und äußeren Reihe. Da mit der Entwicklung die Steifigkeit ansteigt, ist davon auszugehen, dass die innere Reihe weiter entwickelt ist als die mittlere, welche ebenfalls weiter entwickelt ist als die äußere. Dies bestätigt sich in weiteren Versuchen, bei denen mit dem Kalziumchelator BAPTA die Haarbündellinks vollständig zerstört werden, so dass die Steifigkeit einzelner Stereozilien gemessen werden kann (siehe Abb. 3.15; b). Hier zeigt sich ebenfalls eine Steifigkeitsabnahme von der inneren Reihe zu der äußeren.
In der Literatur finden sich einige Steifigkeitsmessungen an den Haarsinneszellen unterschiedlicher Tierspezies. In häufig angewandten Verfahren wie zum Beispiel der Steifigkeitsmessung über die Biegung kalibrierter Glasfasern [Crawford A. C., Fettiplace R. (1985)], [Flock Â., Strelioff D. (1984)] oder AFM-Sensoren [Langer M. G. et al (2001)], [Langer M. G. et al (1999)] wurde gezeigt, dass eine Untersuchung der Haarbündel ohne deren Beschädigung erfolgen kann. Jedoch müssen diese Verfahren notwendigerweise Kontakt zu den untersuchten Geweben aufnehmen und induzieren durch die Berührung und Auslenkung der Haarbündel Transduktionsströme und Adaptationsprozesse mit Steifigkeitsänderungen [Goff L. et al (2005)]. An der Wistar Ratte im Alter von vier Tagen wurden bisher Steifigkeitsmessungen mittels AFM-Sensoren durchgeführt. In exzitatorischer Richtung zeigen die äußeren Haarsinneszellen eine Steifigkeit von 0,0025 N/m, in inhibitorischer 0,0031 N/m [Langer M. G. et al (2001)]. Die Steifigkeit der apikalen, äußeren Haarsinneszellen von Mäusen im Alter von einem bis zwei Tagen wurde mittels Glasfaser bestimmt. Im Mittel wird die Steifigkeit mit

0,00142 N/m angegeben [Russell I. J. et al (1992)]. Deutlich höher wird die Steifigkeit der äußeren Haarsinneszellen von Mäusen im Alter von ein bis zwei Tagen angegeben. Im Mittel beträgt sie 0,0045 N/m [Géléoc G. S. G. et al (1997)]. Die Haarbündel wurden bei Géléoc mittels Wasserstrahl ausgelenkt. Zur Bestimmung der Steifigkeit ist die Geometrie des Haarbündels notwendig, die nur näherungsweise angegeben werden kann. Das erklärt möglicherweise die großen Abweichungen von den übrigen Messungen. Weitere Steifigkeitsmessungen wurden an den Haarbündeln des Gehörs von Schildkröten oder Ochsenfröschen durchgeführt, die mittels Fasern bekannter Steifigkeit an den Kinozilien durchgeführt wurden. Im Mittel wurde die Steifigkeit bei Schildkröten mit 0,00059 N/m angegeben [Crawford A. C., Fettiplace R. (1985)]. Beim Ochsenfrosch konnte eine Abhängigkeit der Steifigkeit von der extrazellulären Kalzium-Konzentration gezeigt werden. Bei einer Konzentration von 1 mM Ca^{2+} liegt die Steifigkeit bei ca. 0,0007 N/m. Die höchste Steifigkeit erreichen die Haarbündel bei der physiologischen Endolymph-Konzentration von 0,25 mM Ca^{2+} mit ca. 0,0012 N/m [Marquis R. E., Hudspeth A. J. (1997)]. In mehreren weiteren Experimenten an Haarbündeln des Ochsenfrosches wurden vergleichbare Steifigkeitsdaten gefunden [Martin P. et al (2000)], [Martin P. et al (2003)], [Cheung E. L. M., Corey D. P. (2006)]. Die Haarbündel niederer Vertebraten sind deutlich länger als die Haarbündel des Cortischen Organs beim Säuger, was sich in der geringeren Steifigkeit widerspiegelt.

Steifigkeitsmessungen ohne mechanische Kontaktaufnahme mit dem Haarbündel mittels Laserdifferentialinterferometrie sind noch nicht an den Haarsinneszellen von Säugetieren durchgeführt worden, sondern lediglich an den Haarsinneszellen des Sacculus beim Ochsenfrosch [Denk W. et al (1989)]. Die Steifigkeit beträgt bei diesen Messungen im Mittel 0,00035 N/m.

Die laserdifferentialinterferometrischen Steifigkeitsmessungen, sowohl von Denk W. et al (1989), als auch dieser Arbeit, ergeben eine niedrigere Haarbündelsteifigkeit als Vergleichsmessungen am jeweiligen Modellorganismus. Das könnte verursacht sein durch die methodischen Unterschiede. Durch die rein passive Messmethode werden keine Adaptationsprozesse induziert, die sich auf die Steifigkeit auswirken.

Zur Entwicklung der Haarbündelsteifigkeit mit dem Lebensalter liegen bisher keine Vergleichsdaten bei Säugetieren vor.

Für alle oben genannten Vergleichsmessungen wird ebenfalls eine relativ hohe Standardabweichung der Steifigkeit angegeben, die sich auch in den Steifigkeitsmessungen dieser Arbeit gezeigt hat. Es kann somit von einer hohen Variabilität der einzelnen Haarbündel mit unterschiedlich langen Stereozilien und unterschiedlichem Vernetzungsgrad der Stereozilien ausgegangen werden.

Die Analyse der Steifigkeitsdaten dieser Arbeit zeigt eine Normalverteilung. Es liegen allerdings bei höheren Steifigkeitswerten mehr Ausreißer vor. Als Ursache dafür sind möglicherweise Haarbündel zu sehen, deren Stereozilien nicht exakt parallel zum Strahlengang stehen. Die laserdifferentialinterferometrischen Messungen detektieren nur den horizontalen Anteil der Haarbündelschwingungen. Bei schräg stehenden Stereozilien wird dieser Vektor verkleinert, was zu einem erhöhten Ergebnis der Steifigkeitsmessung führt. Auch Messungen, die nicht exakt an der Spitze der Stereozilien ausgeführt werden, führen zu einer Verkleinerung der gemessenen Schwingungsamplitude und zur erhöhten errechneten Steifigkeit. Es ist unwahrscheinlich, dass umgeknickte Stereozilien, die auf der Kutikularplatte zu liegen kommen, zu dem größeren Anteil an hohen Steifigkeitsmessungen führen, da diese Haarbündel einen sehr schlechten Hell-Dunkel-Kontrast bieten und deshalb in den Messungen nicht verwendet werden können. Bei ungleicher Verteilung der Steifigkeitsmessungen um den Mittelwert wird bei der Darstellung der Steifigkeitsdaten der Median mit erster und dritter Quartile verwendet.

4.1.3 Differenzierung der Haarbündellinks der äußeren Haarsinneszellen im Alter von wenigen Stunden

In der Literatur ist beschrieben, dass die unterschiedlichen Linktypen elektronenmikroskopisch anhand der Struktur und der Größe zu unterscheiden sind [Auer M. et al (2008)]. In dieser Arbeit fallen morphologisch bei den frühen postnatalen Haarbündeln Links auf, die sich mit dem Rasterelektronenmikroskop nicht differenzieren lassen (siehe Kapitel 4.1.1 und Abb. 3.1). Unklar ist momentan, ob diese Links identisch aufgebaut sind, oder ob es bereits bei diesen Links molekulare Unterschiede gibt. Dies führt zu der Frage, ob diese Links die einzige Vorstufe aller differenzierten Links der adulten Säugerkochlea sind, oder ob die morphologisch nicht zu unterscheidenden Links bereits molekular determiniert sind.

Ein Hinweis auf eine einzige Vorstufe ergibt sich aus der Beobachtung, dass die rasterelektronenmikroskopisch nicht zu differenzierenden Haarbündellinks in der frühen Phase der Entwicklung vollständig durch BAPTA zerstört werden (siehe Abb. 3.5 und Abb 3.6). Bei adulten Haarbündeln werden vor allem die Tip-Links durch BAPTA zerstört, während die Lateral-Links und Top-Connectors nicht auf die BAPTA-Behandlung reagieren (siehe Abb. 3.7), [Goodyear R. J. et al (2005)].

Dagegen spricht die folgende Überlegung: Bereits bei der Geburt sind die Haarsinneszellen der Maus zur Transduktion fähig [Géléoc G. S. G. et al (1997)]. Folglich müssen bereits Tip-Links vorhanden sein, die den MET-Kanal öffnen. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch

bei der Ratte bereits bei Geburt ein intakter Transduktionskanal vorhanden sein muss, da sich die Zellen mit dem Offenkanalblocker des MET-Kanales FM 1-43FX anfärben. Legt man nun die Hypothese zugrunde, dass sich alle Links aus einer Vorstufe entwickeln, dann müssten sich alle Links aus Tip-Links entwickeln. Bei jungen Tieren müssten dann aufgrund der großen Anzahl von mehreren hundert Tip-Links größere Transduktionsströme gemessen werden als bei adulten Tieren mit höchstens hundert Tip-Links. Es konnte keine Änderung des maximalen Transduktionsstroms bei Säugetieren zwischen dem fünften und 18. postnatalen Tag gemessen werden [Kennedy H. J. et al (2003)]. Andere Messungen an Mäusen im Alter von ein bis zwei Tagen zeigen identische maximale Transduktionsströme der äußeren Haarsinneszellen, wie bei Kennedy H. J. et all (2003) beschrieben [Géléoc G. S. G. et al (1997)].
Somit erscheint es wahrscheinlicher, dass sich die rasterelektronenmikroskopisch nicht zu differenzierenden Links der früh-postnatalen Haarbündel zumindest in zwei Subpopulationen unterteilen lassen. Tip-Links existieren über die gesamte Entwicklungsperiode hinweg in unveränderter Anzahl, die übrigen Links der adulten Haarbündel entwickeln sich aus gegenwärtig nicht zu differenzierenden Links. Diese Links durchlaufen in den ersten Lebenstagen eine Entwicklung, da sie in späteren Stadien ihre BAPTA-Sensibilität verlieren.

4.2 Regenerationsfähigkeit der postnatalen und adulten Haarsinneszellen

4.2.1 Regenerierte Links in der Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abb. 3.9 bis 3.13) zeigen nach BAPTA-induzierter Schädigung und Regenerationszeit deutlich die Reversibilität der Haarbündellinks. Diese beginnt bereits nach sechs Stunden. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die regenerierten Links noch auf Höhe der Stereozilienschäfte, während nach 18 bis 20 Stunden die Stereozilienspitzen verlinkt sind. Eine Erklärung dafür wäre, dass sich die Links bei der Regeneration an der Basis der Stereozilien bilden und entlang des Schafts bis zur Spitze wandern. Der Motor für die Bewegung der undifferenzierten Links in Richtung Stereozilienspitze ist möglicherweise Myosin VIIa, das sich in der Region der Lateral-Links befindet und in nativen Haarsinneszellen für die Spannung des gesamten Haarbündels sorgt [Ernest S. et al (2000)], [Rhodes C. R. et al (2004)], [Henn A., De La Cruz E. M. (2005)].
Bei jungen Ratten lässt sich als Folge der Regeneration der Links auch die Reversibilität von morphologischen Veränderungen der Kutikularplatte zeigen (siehe Abb. 3.5). Nach Inkubation in BAPTA kommt es bei den sehr wenig entwickelten apikalen Haarsinneszellen der Rattenkochlea im Alter von wenigen Stunden zu einer kugeligen Aufwölbung der apikalen

Zelloberfläche. Diese entspricht vermutlich der ursprünglichen Zellform, die durch intakte Links flach gehalten wird, und nach deren Zerstörung zum Vorschein kommt. Diese Aufwölbung ist innerhalb von 20 Stunden vollständig reversibel.
Bei Ratten im Alter von drei bis vier Tagen bleibt die apikale Zelloberfläche auch nach Behandlung mit BAPTA flach.

4.2.2 Steifigkeit der Haarbündel nach Regeneration

Unklar ist nach den morphologischen Daten, ob die Links der regenerierten Haarbündel eine ähnliche Spannung generieren können, wie bei den unbehandelten Haarbündeln. Damit das gegeben ist, sollten jeweils die Lateral-Links und die Tip-Links mit den zugehörigen, funktionstüchtigen Myosin-Molekülen verknüpft sein (siehe Kapitel 1.3). Um dies zu überprüfen wurde die Gesamtsteifigkeit der Haarbündel nach Behandlung mit BAPTA und nach Regeneration untersucht.
Betrachtet man die apikalen Kochleaabschnitte der Ratten im Alter von drei bis vier Tagen so entspricht die Steifigkeit der mit BAPTA geschädigten Haarbündel nach Regeneration in ihrer Größenordnung den Kontrollbündeln (siehe Abb. 3.15; c und d). Das legt die Hypothese nahe, dass sich in den regenerierten Tip- und Lateral-Links Moleküle befinden müssen, die zur aktiven, adäquaten Spannung der Links führen. Bei genauerer Analyse fällt zusätzlich folgendes auf: Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, sind die inneren Reihen der äußeren Haarsinneszellen vermutlich weiter entwickelt als die mittleren und äußeren Reihen. Nach Regeneration ist bei den BAPTA-behandelten Präparaten die innere Reihe weniger steif als die Mittlere und die Äußere, was bedeutet, dass die Haarbündel der äußeren Reihe um ein Vielfaches mehr an Steifigkeit zunehmen als die der mittleren oder der inneren Reihe. Dies erklärt sich durch bereits publizierte Daten, die zeigen, dass die Regenerationsfähigkeit mit der Entwicklung abnimmt [Gale J. E. et al (2001)]. Diese Ergebnisse sind vermutlich als ein Hinweis darauf zu werten, dass der Verlust der Regenerationsfähigkeit bei Ratten bereits am dritten oder vierten Tag nach Geburt einsetzt. Es wären Steifigkeitsmessungen an weiter entwickelten Stadien und an adulten Ratten wünschenswert, um zu überprüfen, ob die Haarsinneszellen die Fähigkeit zur Regeneration vollständig verlieren und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt das passiert.
Bei den medialen Abschnitten der Rattenkochlea am Tag der Geburt ist die Interpretation der Daten aufgrund einer großen Streuung schwierig (siehe Abb. 3.14). Über die Regenerationsfähigkeit kann bei dieser Methode keine Aussage getroffen werden, da die BAPTA-geschädigten Haarbündel nicht stabil sind. Die Stereozilien knicken an den oberen Enden um und verhalten sich nicht mehr wie harmonische Oszillartoren. Die Daten zeigen aber den Trend

bei allen drei Reihen der Kontrollgruppen, dass nach 18 Stunden Regeneration die Steifigkeit der Haarbündel zunimmt. Hiervon unterscheiden sich die Haarbündel nach BAPTA-induziertem Schaden und Regenerationszeit nicht signifikant. Die Steifigkeitszunahme kann als Zeichen gedeutet werden, dass sich die Zellen während der Regeneration weiter entwickeln. Bei den Steifigkeitsmessungen an den Haarbündeln der Ratte im Alter von wenigen Stunden fällt eine hohe Streuung der Daten auf, für die wahrscheinlich zwei Fehlerquellen verantwortlich sind:

1) Bei der Präparation erfolgt die Dreiteilung des Cortischen Organs unter dem Stereomikroskop. Da es nicht möglich ist, exakt die gleichen Schnittstellen zu reproduzieren, unterliegen die Zellen der medialen Präparate zwangsläufig einer breiteren Streuung der Entwicklungsstadien, als dies bei den apikalen Abschnitten der Fall ist. Bei der Rattenkochlea im Alter von wenigen Stunden sind an den apikalen Abschnitten keine Steifigkeitsmessungen möglich, da die Haarbündel noch rund sind, wodurch die kontrastbildende V-Form der weiterentwickelten Haarbündel fehlt. Die Haarbündel an den medialen Abschnitten sind somit die jüngsten Haarsinneszellen, an denen Steifigkeitsmessungen möglich sind.

2) Die Wahl des frühen Zeitpunktes der Haarbündelentwicklung im postnatalen Stadium nach wenigen Stunden ist vermutlich eine weitere Fehlerquelle der Messungen an den medialen Haarbündeln der Rattenkochlea. Es ist auffällig, dass fast ausschließlich Ausreißer mit sehr hoher Steifigkeit vorkommen. Das führt zu der Vermutung, dass es sich hierbei um die Haarbündel von Zellen handeln könnte, die im apikalen Teil des medialen Abschnitts liegen. Da diese Zellen noch wenig entwickelt sind, könnte sich ihre Kutikularplatte noch kugelig aufwölben, so dass die Stereozilien nicht mehr parallel zum Strahlengang des Lasers stehen, wodurch nicht mehr die volle Amplitude ihrer Brownschen Schwingungen detektiert werden kann. Dies resultiert in einer Erhöhung der Haarbündelsteifigkeit.

4.2.3 Funktionalität des regenerierten mechanoelektrischen Transduktionsapparates

Es wurde gezeigt, dass die regenerierten Links wieder zu einer adäquaten Steifigkeit der Haarbündel führen. Das lässt vermuten, dass die regenerierten Tip-Links einen intakten und sensiblen Adaptationsapparat besitzen. In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die regenerierten, gespannten Links auch zur Öffnung von MET-Kanälen führen, was die Voraussetzung für den Transduktionsprozess darstellt. Dies geschieht durch Messungen des Einstroms des fluoreszierenden Offenkanalblockers FM 1-43FX durch den MET-Kanal. Bei kurzer Exposition des Cortischen Organs in FM 1-43FX kumuliert der fluoreszierende Farbstoff selektiv in den sensorischen Haarsinneszellen. Gezeigt wurde dies unter anderem für die Larve des Zebrafisches [Seiler C., Nicolson T. (1999)], den Sacculus des Ochsenfrosches [Gale J. E. et al (2000)] und die kochleären Haarsinneszellen der Maus [Gale J. E. et al (2001)], [Meyers J. R. et al (2003)]. FM 1-43 kann die Zellmembran der meisten Zellen nicht durchdringen und wird deshalb häufig Versuchen zur Beurteilung von Endo- und Exozytose verwendet. Bei Säuge-tieren ist belegt, dass FM1-43 durch den geöffneten mechanoelektrischen Transduktionskanal in die apikalen Abschnitte der Stereozilien eintritt und diesen Kanal dauerhaft verschließt [Gale J. E. et al (2001)], [Meyers J. R. et al (2003)].

Alle Messungen dieser Arbeit mit FM 1-43FX zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit BAPTA die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle reduziert. Es kommt zu einer starken Abschwächung der intrazellulären Fluoreszenz. Dies beruht wahrscheinlich auf einem Verlust der Verbindung von Tip-Links und MET-Kanal. Nach der Regenerationszeit erhöht sich dessen Offenwahrscheinlichkeit wieder um ein Vielfaches, was auf die wiederhergestellte Interaktion von Tip-Links und dem MET-Kanal zurückgeführt werden kann.

Da es sich bei den Messungen mit FM 1-43FX um eine semiquantitative Methode handelt, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, die Intensität der Fluoreszenz einzelner Zellreihen innerhalb eines Präparats oder unterschiedlicher Präparate exakt miteinander zu vergleichen. In Abbildung 3.20 ist bei der Kontrolle der Ratten im Alter von drei Tagen nach 18 Stunden Regeneration eine Reduktion der Strahlenintensität im Vergleich zu der Kontrolle ohne Regenerationszeit zu erkennen. Aufgrund der methodischen Grenzen wurde diesem Einzelergebnis in der Gesamtschau der Ergebnisse keine große Bedeutung beigemessen, da das mit BAPTA behandelte Präparat eine hohe Strahlenintensität nach Regenerationszeit von 18 Stunden zeigt.

Bei den Aufnahmen wird jeweils die Ebene der äußeren Haarbündel scharfgestellt, so dass sie als V zu sehen sind. Bei dieser Einstellung sind die Zellkörper der inneren Haarsinneszellen angeschnitten. So ist es an dieser Stelle möglich, die Regenerationsfähigkeit der inneren Haarsinneszellen zu beurteilt. Die inneren Haarsinneszellen verhalten sich in Bezug auf den

Einstrom von FM 1-43FX genau gleich wie die äußeren Haarsinneszellen: Nach der Behandlung mit BAPTA sind die MET-Kanäle geschlossen. Nach einigen Stunden Regeneration sind wieder funktionsfähige MET-Kanäle vorhanden.

In dieser Arbeit kann somit nachgewiesen werden, dass die regenerierten Tip-Links über die nötigen Voraussetzungen verfügen, die für die erfolgreiche Transduktion von Schall in elektrische und chemische Signale nötig sind.

Nun stellt sich die Frage, ob Haarsinneszellen des adulten Säugers ebenso über diese Fähigkeit verfügen. Das konnte in dieser Arbeit weder nachgewiesen, noch ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend betrachtet konnte diese Arbeit zeigen, dass bei intakter Morphologie auch die Funktion der Tip-Links intakt ist.

4.3 Induktion von Regeneration adulter Haarsinneszellen beim Säuger

Die Schwerhörigkeit ist eine komplexe Erkrankung und die Gründe des Haarbündelverlustes sind vielfältig. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Forschungsschwerpunkt auf der Fragestellung liegen sollte, wie die zerstörte Haarbündelstruktur zur Regeneration angeregt werden kann. Der Transduktionskanal scheint sich bei intakter Haarbündelstruktur und intakten Links selbstständig wiederherzustellen beziehungsweise mit den regenerierten Tip-Links zu verbinden.

Es sind bereits Gene bekannt, die auf Entwicklung der Haarsinneszellen Einfluss haben. Das Wachstum von Haarsinneszellen kann über den Zellzyklusinhibitor $p27^{Kip1}$ reguliert werden. Bei Mäusen, denen dieser Inhibitor fehlt, liegen die Haarsinneszellen anfangs in erhöhter Anzahl vor. Allerdings tritt später eine Degeneration der Haarsinneszellen auf [Lowenheim H. et al (1999)], [Chen P., Segil N. (1999)].

Bei tauben Meerschweinchen konnte innerhalb von acht Wochen mit Hilfe adenoviraler Vektoren, die das Gen Atoh1 exprimieren, eine deutliche Erniedrigung der Hörschwelle, gemessen im auditorischen Hirnstamm, erzielt werden [Izumikawa M. et al (2005)]. Die Autoren vermuten, dass einige der regenerierten Haarsinneszellen von Stützzellen abstammen. Das ist erkennbar an der gemischten Morphologie der Zellen mit apikalen Haarbündeln und basalem Kontakt mit der Basilarmembran, eine morphologische Besonderheit der Stützzellen. Andere der regenerierten Haarsinneszellen wiesen ausschließlich die Morphologie der Haarsinneszellen auf. Sie hatten keinen Kontakt zu der Basilarmembran.

Andere Gene begrenzen die physiologische Entwicklung der Haarsinneszellen. Hes1 Knockouttiere haben in verstärkter Anzahl innere Haarsinneszellen, Hes5 Knockouttiere besitzen mehr äußere Haarsinneszellen [Zine A. et al (2001)]. Offen ist momentan die Frage, ob die Inhibition von Hes1 oder Hes5 in dem geschädigten Innenohr eine Haarbündelregeneration induzieren kann. Offen ist auch, unter welchen weiteren Bedingungen Tip-Links, Lateral-Links und Top-Connectors regenerieren können und wie das Aktin-Zytoskelett zum erhöhten Turn-over angeregt werden kann.

Es wird sicherlich nicht eine einzige Lösung für die Behandlung der Schwerhörigkeit geben, aber mit dem hier vorgestellten Modell sollte es möglich sein, einige der offenen Fragen zu beantworten und weitere Erforschung von Innenohrschäden aller Art zu ermöglichen.

4.4 Perspektive

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methodenkombination ist gut geeignet, um die Haarbündelregeneration bei jungen Ratten zu überprüfen. Es konnten neue Erkenntnisse zur Regenerationsfähigkeit der Haarbündel gewonnen werden. Allerdings ist es mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht möglich, den Transduktionsprozess bis zum Auslösen von Aktionspotentialen zu verfolgen.

Unklar bleibt, wie sich die Haarbündel in ihrer physiologischen Umgebung verhalten. Im intakten Innenohr werden die Haarbündel von Endolymphe umspült, während sich die Zellkörper im Milieu der Perilymphe befinden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente in perilymphähnlicher Lösung durchgeführt, da die Zellkörper der Haarsinneszellen mit ihren Stoffwechselvorgängen vom Verfasser als bedeutender für die Regeneration angesehen wurden, als die Haarbündel.

In dieser Arbeit konnte nicht überprüft werden, in welchem Ausmaß bei adulten Säugetieren die durch BAPTA induzierten Schäden regenerieren. Der Grund hierfür liegt zum einen in der erschwerten Präparation bei älteren Tieren, bei denen sich ein Tunnel zwischen den inneren und äußeren Haarsinneszellen bildet, wodurch die äußeren Haarsinneszellen bei der Präparation häufig vom Cortischen Organ abgetrennt werden. Zum anderen ist bei adulten Ratten das Haarbündel weniger flexibel, und so kann es bei der Präparation leicht zur Zerstörung der Links kommen kann. Des Weiteren sind bei adulten Ratten die längsten Stereozilien der äußeren Haarsinneszellen mit der Tektorialmembran verbunden. Nicht immer lässt sich diese Verbindung ohne Beschädigung der Haarbündel trennen. Bei adulten Tieren stößt die in dieser Arbeit vorgestellte Methodenkombination aus obigen Gründen an seine Grenzen. Hier scheinen sich andere Methoden besser zu eigenen, wie zum Beispiel die Injektion von BAPTA oder anderen Wirkstoffen direkt in das Innenohr lebendiger Säuger [Sellick P. M. (2007)].

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint es vielversprechend, nach Wirkstoffen zu suchen, die bei adulten Säugern die Haarbündelregeneration anregen. Trotz der oben genannten Schwierigkeiten der angewandten Methoden bei adulten Tieren, bietet sich vor allem die Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit der MET-Kanäle mit einem fluoreszierenden Offenkanalblocker an, um schnell eine Vielzahl an unterschiedlichen Substanzen auf deren Auswirkung auf die Regeneration bei adulten Säugetieren zu testen. Auch rasterelektronenmikroskopisch kann die Regenerationsfähigkeit der Haarsinneszellen gut untersucht werden, da die Funktion des MET-Apparates intakt zu sein scheint, wenn die Morphologie wiederhergestellt ist. Zur exakten Bestimmung der Wirkung auf die Regenerationsfähigkeit sind zeitaufwändigere in vivo Experimente angebracht.

5 Zusammenfassung

Die chronische Lärmschwerhörigkeit, unter der weltweit Millionen Menschen leiden, ist bedingt durch die Schädigung der sensorischen Zellen des Innenohres. Diese galten auf Grund ihres hohen Differenzierungsgrades bislang als nicht fähig zur Regeneration, so dass eine Heilung der Lärmschwerhörigkeit bis heute nicht möglich ist. Während die Regenerationsfähigkeit der Innenohr- und Gleichgewichtssinneszellen bei niederen Vertebraten schon länger bekannt ist, gibt es nun jedoch auch vermehrt Hinweise auf ein entsprechendes Potential der kochleären Haarsinneszellen beim Säuger. Dies könnte im Idealfall eine Behandlungsmöglichkeit der Innenohrschwerhörigkeit bedeuten.

Eine systematische Analyse des Regenerationspotentials der äußeren Haarsinneszellen der Säugerkochlea wird in der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Wegen der großen strukturellen Ähnlichkeit zum Cortischen Organ des Menschen wurde die Wistar Ratte als Modellorganismus ausgewählt, bei der die sensorischen Haarsinneszellen innerhalb der ersten Lebenstage eine rasante Entwicklung durchlaufen. Zur Beurteilung der morphologischen, mechanischen und funktionellen Regenerationsfähigkeit wurde eine Methodenkombination verwendet, die vom Verfasser entwickelt wurde und sich in Vorversuchen als besonders geeignet herausstellte. Die Rasterelektronenmikroskopie dient zur Beurteilung der Haarbündelmorphologie. Mittels Nomarski-Laserdifferentialinterferometrie können die Brownschen Schwingungen der Stereozilien ohne mechanische Einflussnahme mit hoher Sensitivität detektiert werden. Aus diesen Daten wird die Haarbündelsteifigkeit errechnet. Mit dem fluoreszierenden Offenkanalblocker des mechanoelektrischen Transduktionskanals FM 1-43FX wird die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals dargestellt, die vom Vorhandensein und von der Spannung der Tip-Links abhängig ist.

- Die zunächst durchgeführten Untersuchungen der physiologischen Entwicklung äußerer Haarbündel zeigen bei Ratten am Tag der Geburt nicht zu differenzierende Links bei runden Haarbündeln. Bei älteren Ratten formieren sich die Stereozilien zu der V-förmigen Anordnung der Haarbündel, es differenzieren sich Tip-Links, Lateral-Links und Top-Connectors. Laserdifferentialinterferometrische Steifigkeitsmessungen zeigen eine Steifigkeitszunahme bei der Entwicklung der Haarbündel. Die innere Reihe der äußeren Haarsinneszellen scheint weiter entwickelt zu sein, als die mittlere und die äußere. Während bei Ratten im Alter bis zum vierten Lebenstag keine Differenzierung der Links mittels des

Kalzium-Chelators 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N´,N´-tetraessigsäure (BAPTA) möglich ist, kann bei adulten Stadien eine selektive Zerstörung der Tip-Links durch BAPTA festgestellt werden. Die Lateral-Links und Top-Connectors reagieren nicht auf die BAPTA-Behandlung.

- Zur Zerstörung der Tip-Links wird BAPTA verwendet, was die Morphologie einer chronischen Lärmschwerhörigkeit simuliert. Nach Regenerationszeit von sechs Stunden sind bei Ratten sowohl im Alter von wenigen Stunden als auch von drei bis vier Tagen rasterelektronenmikroskopisch nicht zu differenzierende Links in geringer Anzahl hauptsächlich an den Stereozilienschäften vorhanden. Nach 18 bis 20 Stunden Regeneration sind verstärkt Links an den Stereozilienspitzen und keine Unterschiede mehr zwischen den BAPTA-behandelten Präparaten und den Kontrollen feststellbar.
- Die laserdifferentialinterferometrischen Steifigkeitsmessungen zeigen einen signifikanten Steifigkeitsabfall der äußeren Haarbündel bei drei bis vier Tage alten Ratten nach Inkubation in BAPTA. Nach 18- bis 20-stündigen Regenerationszeiten entspricht die Steifigkeit sowohl bei den Ratten im Alter von wenigen Stunden als auch bei drei bis vier Tage alten Ratten der der Kontrollgruppen. Die dafür erforderliche Spannung der Tip-Links kann nur erreicht werden, indem sich Tip- und Lateral-Links an die Haarbündelfluktuationen adaptieren. Somit ist anzunehmen, dass die regenerierten Links über die gleichen Adaptationsmechanismen verfügen, wie die ursprünglichen Links. Bei Ratten im Alter von drei bis vier Tagen können bereits erste Anzeichen für das Stagnieren der Regenerationsfähigkeit detektiert werden, da die Steifigkeitszunahme nach Regeneration bei der weiter entwickelten inneren Haarbündelreihe geringer ausfällt als bei der mittleren und äußeren Reihe.
- Die Untersuchung der Offenwahrscheinlichkeit der mechanoelektrischen Transduktionskanäle mit FM 1-43FX demonstriert in beiden Altersgruppen die Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit durch BAPTA. Bereits nach sechsstündiger Regeneration kann die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Nach Regenerationszeiten von 18 bis 20 Stunden sind keine Unterschiede mehr zwischen den mit BAPTA behandelten Präparaten und den Kontrollen feststellbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei morphologisch unauffälligen Haarbündeln die notwendige Verbindung von Tip-Links mit den mechanoelektrischen Transduktionskanälen wiederhergestellt wird, und dass diese funktionstüchtig ist. Zur Therapie von erworbenen Innenohrschäden wie der chronischen Lärmschwerhörigkeit müssten adulte Haarsinneszellen aus dem Zellarrest geholt und zur Regeneration angeregt werden können. Hierbei kann die vorgestellte Methodenkombination unter anderem dafür zum Einsatz kommen, um Wirkstoffe zu identifizieren, die adulte Haarsinneszellen aus dem Arrest führen können.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed Z. M., Riazuddin S., Ahmad J., Bernstein S. L., Guo Y., Sabar M. F., Sieving P., Riazuddin S., Griffith A. J., Friedman T. B., Belyantseva I. A., Wilcox E. R.: PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human Molecular Genetics* **12**: 3215–3223 (2003)
- Ahmed Z. M., Goodyear R., Riazuddin S., Lagziel A., Legan P. K., Behra M., Burgess S. M., Lilley K. S., Wilcox E. R., Riazuddin S., Griffith A. J., Frolenkov G. I., Belyantseva I. A., Richardson G. P., Friedman T. B.: The tip-link antigen, a protein associated with the transduction complex of sensory hair cells, is protocadherin-15. *The Journal of Neuroscience* **26**: 7022–7034 (2006)
- Assad J. A., Shepherd G. M. G., Corey D. P.: Tip-Link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron* **7**: 985–994 (1991)
- Auer M., Koster A. J., Ziese U., Bajaj C., Volkmann N., Wang da N., Hudspeth A. J.: Three-dimensional architecture of hair-bundle linkages revealed by electron-microscopic tomography. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology.* **9**: 215–224 (2008)
- Barald K. F., Kelley M. W.: From placode to polarization: new tunes in inner ear development. *Development* **131**: 4119–4130 (2004)
- Berghaus A., Rettinger G., Böhme G.: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *Hippokrates-Verlag, Stuttgart (Duale Reihe)* **1. Auflage**: 24–93 (1996)
- Bermingham N. A., Hassan B. A., Price S. D., Vollrath M. A., Ben-Arie N., Eatock R. A., Bellen H. J., Lysakowski A., Zoghbi H. Y.: Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* **284**: 1837–1841 (1999)
- Blatchley B. J., Cooper W. A., Coleman J. R.: Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in rat. *Developmental Brain Research* **32**: 75–84 (1987)
- Boeda B., El-Amraoui A., Bahloul A., Goodyear R., Daviet L., Blanchard S., Perfettini I., Fath K. R., Shorte S., Reiners J., Houdusse A., Legrain P., Wulfrum U., Richardson G., Petit C.: Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair bundle. *EMBO Journal* **21**: 6689–6699 (2002)
- Boenninghaus H. G., Lenarz T.: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* **12. Auflage**: 102–120 (2004)

- Bohne B. A., Rabbitt K. D.: Holes in the reticular lamina after noise exposure: implications for continued damage in the organ of corti. *Hearing Research* **11**: 41–53 (1983)
- Chen P., Segil N.: p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* **126**: 1581–1590 (1999)
- Chen Y. S., Liu T. C., Cheng C. H., Yeh T. H., Lee S. Y., Hsu C . J.: Changes of hair cell stereocilia and threshold shift after acoustic trauma in guinea pigs: comparison between inner and outer hair cells. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology* **65**: 266–274 (2003)
- Cheung E. L. M., Corey D. P.: Ca^{2+} changes the force sensitivity of the hair-cell transduction channel. *Biophysical Journal* **90**: 124–139 (2006)
- Cleveland J. P., Manne S., Bocek D., Hansma P. K.: A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Scientific Instruments* **64**: 403–405 (1993)
- Crawford A. C., Fettiplace R.: The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *Journal of Physiology* **364**: 359–379 (1985)
- Crowley D. H., Hepp-Reymond M. C.: Development of cochlear function in the ear of the infant rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **62**: 427–432 (1966)
- Denk W., Webb W. W., Hudspeth A. J.: Mechanical properties of sensory hair bundles are reflected in their Brownian motion measured with a laser differential interferometer. *Biophysics* **86**: 5371–5375 (1989)
- Ernest S., Rauch G., Haffter P., Geisler R., Petit C., Nicolson T.: Mariner is defective in myosin VIIa: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Human Molecular Genetics* **9**: 2189–2196 (2000)
- Fettiplace R., Hackney C. M.: The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nature Reviews/Neuroscience* **7**: 19–29 (2006)
- Flock Â., Strelioff D.: Studies on hair cells in isolated coils from the guinea pig cochlea. *Nature* **310**: 597–599 (1984)
- Forge A., Li L., Corwin J. T., Nevill G.: Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* **259**: 1616–1619 (1993)
- Furness D. N., Katori Y., Nirmal Kumar B., Hackney C. M.: The dimensions and structural attachments of tip links in mammalian cochlear hair cells and the effects of exposure to different levels of extracellular calcium. *Neuroscience* **154**: 10–21 (2008)
- Gale J. E., Meyers J. R., Corwin J. T.: Solitary hair cells are distributed throughout the extramacular epithelium in the bullfrog´s saccule. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* **1**: 172–182 (2000)
- Gale J. E., Marcotti W., Kennedy H. J., Kros C. J., Richardson G. P.: FM 1-43 dye behaves as a permanent blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. *The Journal of Neuroscience* **21**: 7013–7025 (2001)
- Géléoc G. S. G., Lennan G. W. T., Richardson G. P., Kros C. J.: A quantitative comparison of mechanoelectrical transduction in vestibular and auditory hair cells of neonatal mice. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society* **264**: 611–621 (1997)

- Gibson C. T., Smith D. A., Roberts C. J.: Calibration of silicon atomic force microscope cantilevers. *Nanotechnology* **16**: 234–238 (2005)
- Glowatzki E., Wild K., Brändle U., Fakler G., Fakler B., Zenner H.-P., Ruppersberg J. P.: Cell-specific expression of the α9 n-ACh receptor subunit in auditory hair cells revealed by single-cell RT-PCR. *Proceedings of the Royal Society of London* **262**: 141–147 (1995)
- Goff L., Bozovic D., Hudspeth A. J.: Adaption shift in the domain of negative stiffness during spontaneous oscillation by hair bundles from the internal ear. *Proceedings ot the National Academy of Science of the United States of America* **102**: 16996–17001 (2005)
- Goodyear R. J., Marcotti W., Kros C. J., Richardson G. P.: Development and properties of stereociliary link types in hair cells of the mouse cochlea. *The Journal of Comparative Neurology* **485**: 75–85 (2005)
- Hampton L. L., Wright C. G., Alagramam K. N., Battey J. F., Noben-Trauth K.: A new spontaneous mutation in the mouse Ames waltzer gene, Pcdh15. *Hearing Research* **180**: 67–75 (2003)
- Hawkins J. E.: The role of vasoconstriction in noise-induced hearing loss. *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology* **80**: 903–913 (1971)
- Henn A., De La Cruz E. M.: Vertebrate myosin VIIb is a high duty ratio motor adapted for generating and maintaining tension. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 39665–39676 (2005)
- Ipakchi R., Kyin T., Saunders J. C.: Loss and recovery of sound-evoked otoacustic emissions in young chicks following acoustic trauma. *Audiology and Neuro-Otology* **10**: 209–219 (2005)
- Izumikawa M., Minoda R., Kawamoto K., Abrashkin K. A., Swiderski D. L., Dolan D. F., Brough D. E., Raphael Y.: Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature Medicine* **11**: 271–276 (2005)
- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O., Gratzl M. (HRSG): Histologie. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* **5. Auflage**: (2002)
- Kazmierczak P., Sakaguchi H., Tokita J., Wilson-Kubalek E. M., Milligan R. A., Muller U., Kachar B.: Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* **449**: 87–91 (2007)
- Kelley M. W.: Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature Reviews/-Neuroscience* **7**: 837–849 (2006)
- Kennedy H. J., Evans M. G., Crawford A. C., Fettiplace R.: Fast adaptation of mechanoelectrical transducer channels in mammalian cochlear hair cells. *Nature Neuroscience* **6**: 832–836 (2003)
- Kirjavainen A., Sulg M., Heyd F., Alitalo K., Ylä-Herttuala S., Möröy T., Petrova T. V., Pirvola U.: Prox1 interacts with Atoh1 and Gfi1, and regulates cellular differentiation in the inner ear sensory epithelia. *Developmental Biology* (Publikation in Vorbereitung)

- Kros C. J., Rüsch A., Richardson G. P.: Mechano-electrical transducer currents in hair cells of the cultured neonatal mouse cochlea. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society* **249**: 185–193 (1992)
- Kuntz A. L., Oesterle E. C.: Transforming growth factor alpha with insulin stimulates cell proliferation in vivo in adult rat vestibular sensory epithelium. *The Journal of Comparative Neurology* **399**: 413–423 (1998)
- Ladrech S., Wang J., Simonneau L., Puel J., Lenoir M.: Macrophage contribution to the response of the rat organ of Corti to amikacin. *Journal of Neuroscience Research* **85**: 1970-1979 (2007)
- Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg: Jahresbericht 2006. *Seite* 75 (2006)
- Lanford P. J., Lan Y., Jiang R., Lindsell C., Weinmaster G., Gridley T., Kelley M. W.: Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nature Genetics* **21**: 289–292 (1999)
- Langer M. G.: Entwicklung eines Rasterkraftmikroskops zur Untersuchung der elastischen Eigenschaften von Mechanosensoren im Innenohr. *Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Tübingen: 77-92* (1998)
- Langer M. G., Koitschev A., Haase H., Rexhausen U., Hörber J. K. H., Ruppersberg J. P.: Mechanical stimulation of individual stereocilia of living cochlear hair cells by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **82**: 269–278 (1999)
- Langer M. G., Fink S., Koitschev A., Rexhausen U., Hörber J. K. H., Ruppersberg J. P.: Lateral mechanical coupling of stereocilia in cochlear hair bundles. *Biophysical Journal* **80**: 2608–2621 (2001)
- Lee Y. S., Liu F., Segil N.: A morphogenetic wave of p27(Kip1) transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development. *Development* **133**: 2817–2826 (2006)
- Lenoir M., Puel J. L., Pujol R.: Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea. A SEM study. *Anatomy and Embryology* **175**: 477–487 (1987)
- Li L., Forge A.: Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula. *International Journal of Developmental Neuroscience* **15**: 433–446 (1997)
- Libermann M. C., Beil D. G.: Hair cell condition and auditory nerve response in normal and noise-damaged cochleas. *Acta Oto-Laryngologica* **88**: 161–176 (1979)
- Lim D. J., Dunn D. E.: Anatomic correlates of noise induced hearing loss. *Otolaryngologic Clinics of North America* **12**: 493–513 (1979)
- Lowenheim H., Furness D. N., Kil J., Zinn C., Gultig K., Fero M. L., Frost D., Gummer A. W., Roberts J. M., Rubel E. W.: Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proceedings of the National Academy of Sciences ot the United States of America* **96**: 4084–4088 (1999)
- Maghelli N.: Mechanical properties of biological assemblies. Development of analysis instruments and methods. *Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Ulm: 82* (2005)

- Marcotti W., van Netten S. M., Kros C. K.: The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *The Jounal of Physiology* **567**: 505–521 (2005)
- Marquis R. E., Hudspeth A. J.: Effects of extracellular Ca^{2+} concentration on hair-bundle stiffness and gating-spring integrity in hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11923–11928 (1997)
- Martin P., Mehta A. D., Hudspeth A. J.: Negative hair-bundle stiffness betrays a mechanism for mechanical amplification by the hair cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12026–12031 (2000)
- Martin P., Bozovic D., Choe Y., Hudspeth A. J.: Spontaneous oscillation by hair bundles of the bullfrog´s sacculus. *The Journal of Neuroscience* **23**: 4533–4548 (2003)
- McPhee J. R., Van De Water T. R. (Jahn A. F., Santos-Sacchi J. Ed.): Structural and functional development of the ear. In Physiology of the ear. *Raven Press, New-York* **2. Auflage**: 191–214 (2001)
- Mellado Lagarde M. M., Drexl M., Lukashkina V. A., Lukashkin A. N., Russell I. J.: Outer hair cell somatic, not hair bundle, motility is the basis of the cochlear amplifier. *Nature Neuroscience* **11**: 746–748 (2008)
- Meyers J. R., MacDonald R. B., Duggan A., Lenzi D., Standaert D. G., Corwin J. T., Corey D. P.: Lighting up the senses: FM 1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *The Journal of Neuroscience* **23**: 4054–4065 (2003)
- Michel V., Goodyear R. J., Weil D., Marcotti, W., Perfettini, I., Wolfrum, U., Kros, C. J., Richardson, G. P., Petit, C.: Cadherin 23 is a component of the transient lateral links in the developing hair bundles of cochlear sensory cells. *Developmental Biology* **280**: 281–294 (2005)
- Nordmann A. S., Bohne B. A., Harding G. W.: Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hearing Research* **139**: 13–30 (2000)
- Pickles J. O., von Perger M., Rouse G. W., Brix J.: The development of links between stereocilia in hair cells of the chick basilar papilla. *Hearing Research* **54**: 163 (1991)
- Rhodes C. R., Hertzano R., Fuchs H., Bell R. E., de Angelis M. H., Steel K. P., Avraham K. B.: A Myo7a mutation cosegregates with stereocilia defects and low-frequency hearing impairment. *Mammalian Genome* **15**: 686–697 (2004)
- Rubel E. W., Fritzsch B.: Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annual Review of Neuroscience* **25**: 51–101 (2002)
- Ruben R. J.: Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitosis. *Acta Oto-Laryngologica Supplementum* **220**: 1–44 (1967)
- Russel I. J., Richardson G. P.: The morphology and physiology of hair cells in organotypic cultures of the mouse cochlea. *Hearing Research* **31**: 9–24 (1987)
- Russell I. J., Kössl M., Richardson G. P.: Nonlinear mechanical responses of mouse cochlear hair bundles. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological character. Royal Society* **250**: 217–227 (1992)

- Rzadzinska A. K., Schneider M. E., Davies C., Riordan G. P., Kachar B.: An actin molecular treadmill and myosin maintain stereocilia functional architecture and self-renewal. *The Journal of Cell Biology* **164**: 887–897 (2004)
- Schmidt R. F., Thews G., Lang F. (HRSG): Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* **28. Auflage**: S. 259–277 (2000)
- Seifert G. (HRSG): HNO - Pathologie. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York* **2. Auflage**: 302–303 (1999)
- Seiler C., Nicolson T.: Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *Journal of Neurobiology* **41**: 424–434 (1999)
- Sellick P. M.: Long term effects of BAPTA in scala media on cochlear function. *Hearing Research* **231**: 13–22 (2007)
- Siemens J., Lillo C., Dumont R. A., Reynolds A., Williams D. S., Gillespie P. G., Muller U.: Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* **428**: 950–955 (2004)
- Silbernagl S., Despopoulos A.: Taschenatlas Physiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* **7. Auflage**: (2007)
- Sobkowicz H. M., Bereman P., Rose J. E.: Organotypic development of the organ of corti in culture. *Journal of Neurocytology* **4**: 543–572 (1975)
- Söller C., Rauch G. J., Siemens J., Geisler R., Schuster S. C., the Tübingen 2000 Screen Consortium, Müller U., Nicolson T.: Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature* **428**: 955–959 (2004)
- Svrcek-Seiler W. A., Gebeshuber I. C., Rattay F.: Micromechanical models for the brownian motion of hair cell stereocilia. *Journal of theoretical Biology* **193**: 623–630 (1998)
- Uziel A., Romand R., Marot M.: Development of cochlear potentials in rats. *Audiology* **20**: 89–100 (1981)
- WHO: Prevention of noise-induced hearing loss. *http://www.who.int/pbd/deafness/en/noise.pdf* Seite 80 (1997)
- WHO: Deafness and hearing impairment. *http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html* (2006)
- Yamane H., Nakai Y., Takayama M., Konishi K., Iguchi H., Nakagawa T., Shibata S., Kato A., Sunami K., Kawakatsu C.: The emergence of free radicals after acoustic trauma and strial blood flow. *Acta Oto-Laryngology* **519**: 87–92 (1995)
- Yamasoba T., Kondo K.: Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell and Tissue Research* **325**: 23–31 (2006)
- Zaho Y., Yamoah E. N., Gillespie P. G.: Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **94**: 1569–1574 (1996)
- Zenner H. P. (HRSG): Hören. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New-York* **1. Auflage**: 106–118 (1994)

- Zine A., Aubert A., Qiu J., Therianos S., Guillemot F., Kageyama R., de Ribaupierre F.: Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian inner ear. *The Journal of Neuroscience* **21**: 4712–4720 (2001)
- Zine A., Romand R.: Development of the auditory receptors of the rat: a SEM study. *Brain Research* **721**: 49–58 (1996)

7 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt:

- Jun. Prof. Dr. Matthias Langer für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können, für sein Interesse und seine Unterstützung.

- Prof. Dr. Dr. h.c. Frank Lehmann-Horn für die überaus bereitwillige Übernahme der Betreuung dieser Dissertation nach dem Weggang von Matthias Langer und die vielen wertvollen Ratschläge.

- Prof. Dr. Paul Dietl für die Begutachtung dieser Dissertation.

- Dr. Stefan Fink für die Hilfe bei der Präparation, Planung und Durchführung der Experimente, sowie für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

- Francois Grauvogel für die tatkräftige Unterstützung beim Aufbau und Betrieb des Nomarski-Laserinterferenzmikroskops.

- dem ganzen Institut für Physiologie für die freundliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

- dem Promotionsprogramm Experimentelle Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Wirth für die finanzielle und fachliche Unterstützung.

- Sabine Vöhringer für ihre liebevolle Unterstützung und Ermutigung, sowie das sorgfältige Lektorat.

- Michael Schön für das überaus gründliche Lektorat.

- meiner Familie für ihr fortwährendes Interesse und ihre Ermutigungen.

8 Lebenslauf

Jürgen Ebert
Himmelstrasse 18
22299 Hamburg

Staatsangehörigkeit:	deutsch

24.06.1982:	geboren in Schwabmünchen
1988-1992:	Grundschule Blaufelden
1992-2001:	Gymnasium Gerabronn
Juni 2001:	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
2001-2002:	Zivildienst im Krankenhaus Crailsheim
seit 2002:	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
Sept. 2004:	Ärztliche Vorprüfung
Feb. 2005-Aug. 2007:	Praktische Arbeit der Dissertation
Dez. 2006-Aug. 2007:	Teilnahme am Promotionsprogramm Experimentelle Medizin
seit Aug. 2007:	Praktisches Jahr in Bern, Toronto und Ravensburg

Publikation: Ebert J., Fink S., Koitschev A., Walther P., Langer M. G., Lehmann-Horn F.: Recovery of mechano-electrical transduction in rat cochlear hair bundles after postnatal destruction of the stereociliar cross-links. *Proc. R. Soc. B* **277**: 2291-2299 (2010)