

Aus dem Institut für Biophysik
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
geschäftsführender Professor: Prof. Dr. Markus Hoth

Expression
der akzessorischen Calciumkanal-Untereinheiten $\alpha_2\delta 1$ bis 3
im Spiralganglion der Maus
und
Etablierung einer dissoziierten Primärkultur
von Spiralganglien-Neuronen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors in der Medizin

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von: Veronika Scheuer
geboren am: 17.02.1989 in Trier

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Aufbau des Säugerohres.....	5
2.2 Feinbau des Corti-Organs.....	8
2.3 Rolle der Spiralganglien-Neurone.....	11
2.4 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle.....	13
2.5 Calciumkanäle in Spiralganglien-Neuronen.....	16
2.6 Spezielle Mausmodelle.....	17
2.6.1 $\alpha_2\delta_3$ -defizientes Mausmodell.....	17
2.7 Fragestellungen.....	19
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Verwendete Mauslinien.....	21
3.1.1.1 NMRI-Mäuse.....	21
3.1.1.2 $\alpha_2\delta_3$ -defiziente Mäuse.....	21
3.1.1.3 TYF-Mäuse.....	21
3.1.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial.....	22
3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung.....	24
3.1.3.1 Verwendete Chemikalien.....	24
3.1.3.2 Verwendete Lösungen.....	24
3.1.3.3 Verwendete Antikörper.....	26
3.1.4 Quantitative TaqMan ® Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	28
3.1.4.1 Isolation von mRNA.....	28
3.1.4.2 Transkription der mRNA in cDNA.....	28
3.1.4.3 GAPDH-PCR.....	28
3.1.5 Zellkultur.....	30
3.1.5.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	30
3.2 Methoden.....	32
3.2.1 Verwendete Präparatebezeichnungen.....	32
3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung.....	32

3.2.2.1	Präparation und Aufbereitung der Spiralganglien-Neurone.....	32
3.2.2.2	Färbeschritte.....	33
3.2.2.3	Verwendete Antikörperkombinationen zur Immunfluoreszenzfärbung akuter <i>whole mount</i> -Präparate.....	33
3.2.2.4	Verwendete Antikörperkombinationen zur Immunfluoreszenzfärbung bei der Frage nach der Expression der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheiten.....	34
3.2.2.5	Live-Aufnahmen bei TYF-Mäusen.....	34
3.2.2.6	Auswertung.....	35
3.2.3	Quantitative TaqMan ® Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	36
3.2.3.1	Präparation und Entnahme der Spiralganglien.....	36
3.2.3.2	mRNA-Isolation aus Spiralganglien.....	36
3.2.3.3	cDNA-Transkription aus isolierter mRNA von Spiralganglien.....	37
3.2.3.4	Verifizierung der Umschreibung.....	37
3.2.3.5	Quantitative TaqMan ® Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	37
3.2.4	Zellkultur.....	40
3.2.4.1	Beschichten der Deckgläser.....	40
3.2.4.2	Präparation der Spiralganglien-Neurone für dissoziierte Zellkultur und <i>whole mount</i> -Kultur.....	40
3.2.4.3	Herstellung des Kulturmediums.....	41
3.2.4.4	Kultur von <i>whole mount</i> -Präparaten.....	42
3.2.4.5	Enzymatische und mechanische Vereinzelung der Spiralganglien-Neurone.....	42
3.2.4.6	Ausplattieren der Spiralganglien-Neurone und Kultivierungsbedingungen.....	42
3.2.4.7	Immunfluoreszenzfärbung an vereinzelt kultivierten Spiralganglien-Neuronen.....	43
3.2.4.8	Qualitätskontrolle der dissoziierten Primärkultur von Spiralganglien-Neuronen.....	43
3.2.4.9	Etablierung der Zellkulturversuche zur Verbesserung des Überlebens der Spiralganglien-Neurone.....	43
3.2.4.10	Statistische Auswertung.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen der Spiralganglien im Gewebeverband.....	45
4.2	Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene.....	50

4.3 Expression von $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheiten in Spiralganglien-Neuronen auf Proteinebene.....	51
4.4 Etablierung eines Zellkultursystems für Spiralganglien-Neurone.....	56
5 Diskussion.....	63
5.1 Differentielle Proteinexpression in Spiralganglien-Neuronen.....	63
5.2 Identifizierung der Spiralganglien-Neurone.....	64
5.3 Eigenschaften und Spezifität des anti-Cacna2d3-Antikörpers von Santa Cruz.....	65
5.4 Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene.....	67
5.5 TYF-Mäuse.....	68
5.6 Myelinisierung der murinen Spiralganglien-Neurone.....	69
5.7 Optimierung des Zellkulturprotokolls.....	70
5.8 Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur bei Zugabe von Wachstumsfaktoren.....	73
5.9 Variabilität im Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur.....	75
5.10 Klinische Relevanz.....	76
6 Literaturverzeichnis.....	79
7 Dank.....	87
8 Lebenslauf.....	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Aufbau des Ohres.....	6
Abbildung 2.2: Querschnitt durch die Cochlea.....	7
Abbildung 2.3: Querschnitt durch das Corti-Organ.....	10
Abbildung 2.4: Überblick über die Anordnung und Verbindung der Spiralganglien-Neurone.....	12
Abbildung 2.5: Aufbau eines spannungsgesteuerten Calciumkanals.....	15
Abbildung 3.1: Prinzip der Fluoreszenzdetektion mit TaqMan®-Sonden.....	38
Abbildung 4.1: Spiralganglien-Neurone vom Typ I und II der neonatalen Maus.....	46
Abbildung 4.2: Myelinisierung der Spiralganglien-Neurone.....	47
Abbildung 4.3: Live fluoreszierende Spiralganglien-Neurone und Fasern von TYFc-Mäusen.....	49
Abbildung 4.4: qRT-PCR der Calciumkanal-Untereinheiten $\alpha_2\delta 1$ bis 3 von SG-cDNA.....	50
Abbildung 4.5: Akute <i>whole mount</i> -Präparation der SG-Neurone einer NMRI-Maus an P7.....	52
Abbildung 4.6: Markierung von Spiralganglien-Neuronen einer $\alpha_2\delta 3^{-/-}$ Maus mit einem anti-Cacna2d3-Antikörper.....	53
Abbildung 4.7: Doppelfärbung mit anti-Peripherin und anti-Cacna2d3 an Spiralganglien-Neuronen.....	55
Abbildung 4.8: Immunfluoreszenzfärbung an dissoziierten Spiralganglien-Neuronen in Kultur.....	57
Abbildung 4.9: Live fluoreszierende dissoziierte Spiralganglien-Neurone von TYFc-Mäusen.....	58
Abbildung 4.10: Überleben von Spiralganglien-Neuronen bei unterschiedlich beschichteten Deckgläsern in der dissoziierten Zellkultur.....	60
Abbildung 4.11: Überleben von Spiralganglien-Neuronen bei Zugabe von Wachstumsfaktoren in der dissoziierten Zellkultur.	61
Abbildung 5.1: Differentielle Proteinexpression in Typ I und Typ II Neuronen.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über die verschiedenen Klassen von Calciumkanälen.....	14
Tabelle 3.1: Übersicht über verwendete Geräte und allgemeinen Laborbedarf.....	22
Tabelle 3.2: Chemikalien für Immunfluoreszenzfärbung.....	24
Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Präparationslösung (B01-Lösung).....	25
Tabelle 3.4: Verwendete Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung.....	25
Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung.....	26
Tabelle 3.6: mRNA-Isolations-Kit.....	28
Tabelle 3.7: Chemikalien für die cDNA-Transkription.....	28
Tabelle 3.8: Chemikalien für die GAPDH-PCR.....	28
Tabelle 3.9: Zusammensetzung des TAE-Puffers (50-fach konzentriert).....	29
Tabelle 3.10: Chemikalien und Verbrauchsmaterial für Zellkultur.....	30
Tabelle 3.11: TaqMan ® Gen-Expressions Assays.....	39
Tabelle 5.1: Vergleich der Immunreaktivität von Typ I und Typ II Neuronen.....	64

Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_2\delta_3^{-/-}$	homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defiziente Maus
$\alpha_2\delta_3^{+/-}$	heterozygotes Kontrolltier für $\alpha_2\delta_3^{-/-}$
ABR	<i>Auditory Brainstem Response</i>
ÄHZ	äußere Haarzelle
AID	α -Interaktionsdomäne
BAHA	<i>Bone Anchored Hearing Aid</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
C _T -Wert	Schwellenwert / <i>cycle treshold</i>
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
dB	Dezibel
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
(c)DNA	(<i>complementary</i> , komplementäre) Desoxyribonuclein-Säure (<i>Acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
FGF 2 / basic FGF	<i>Fibroblast Growth Factor 2 / basic Fibroblast Growth Factor</i>
g	Einheit der Erdbeschleunigung: 1 g = 9,81 m/s ²
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>Glial cell-Derived Neurotrophic Factor</i>
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HCN-Kanal	Hyperpolarisationsaktivierter, durch zyklische Nukleotide gesteuerter (Kationen-)Kanal (<i>Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide-gated (Cation) Channel</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT 1	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase 1

Abkürzungsverzeichnis

Hz	Hertz (1/s)
HZ	Haarzelle(n)
IgG	Immunglobulin G
IHZ	innere Haarzelle
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NT 3	Neurotrophin 3
P	postnataler Lebenstag der Maus
PAK	primärer Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
(m)RNA	(<i>messenger</i>) Ribonuklein-Säure (<i>Acid</i>)
SAK	sekundärer Antikörper
SDHA	Succinatdehydrogenase, Untereinheit A
SG	Spiralganglion/ Spiralganglien
SGN/SG-Neuron	Spiralganglien-Neuron
TAE-Puffer	Tris- {Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan} Acetat- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Puffer
TaqMan ® qRT-PCR	quantitative TaqMan ® Real-Time Polymerasekettenreaktion
UdS	Universität des Saarlandes
UV-Licht	ultraviolettes Licht
eYFP	<i>enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>

1 Zusammenfassung

Fragestellung: Spiralganglien-Neurone sind die primär-afferenten Neurone im auditorischen System und damit ein wichtiges Element für die Verbindung der Sinneszellen mit den zentralen neuronalen Verarbeitungsstufen. Die Kenntnisse über ihre Physiologie und Pathophysiologie sind derzeit unzureichend. Aufgrund der beim Menschen unzugänglichen Lage im knöchernen Modiolus der Cochlea im Felsenbein werden für Studien Modellorganismen, beispielsweise Mäuse, benötigt. Für viele Untersuchungen ist es unerlässlich, die Spiralganglien-Neurone aus der Cochlea frei zu präparieren. Um deren Überleben für verschiedene *in vitro* Experimente (Elektrophysiologie, live-Aufnahmen) längerfristig zu ermöglichen, bietet sich eine Kultivierung an. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer dissoziierten Primärkultur von murinen Spiralganglien-Neuronen. Ferner wurde untersucht, wie die neuronalen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten 1 bis 3 spannungsgesteuerter Calciumkanäle gemäß der Tonotopie in den Spiralganglien von Mäusen exprimiert sind und ob sich dieses Muster in $\alpha_2\delta 3$ -defizienten Mäusen ändert.

Material und Methoden: Es wurden unterschiedliche Mausmodelle verwendet: NMRI-Mäuse, $\alpha_2\delta 3$ -defiziente Mäuse sowie verschiedene TYF-Linien. Die Identifizierung und Charakterisierung von neonatalen Spiralganglien-Neuronen erfolgte über Immunfluoreszenzfärbung im Gewebeverband und in der dissoziierten Zellkultur mit verschiedenen Antikörpern. Die primären Antikörper anti- β -Tubulin und anti-Peripherin dienten der Identifizierung der verschiedenen Typen von Spiralganglien-Neuronen. Zur Darstellung von Schwann-Zellen wurden Antikörper gegen *Myelin Basic Protein* verwendet. Mithilfe von Antikörpern gegen die $\alpha_2\delta 3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle (anti-Cacna2d3) wurde deren Expression auf Proteinebene untersucht. Weiterhin wurde mit quantitativer TaqMan® Real-Time Polymerasekettenreaktion die Expression der verschiedenen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle auf mRNA-Ebene analysiert.

Ergebnisse: Typ I Spiralganglien-Neurone ließen sich mit anti- β -Tubulin identifizieren. Etwa 5 bis 10 % der Spiralganglien-Neurone waren Peripherin-positive Typ II Neurone. Die Identifizierung von Spiralganglien-Neuronen war weiterhin bei den genetisch modifizierten TYFc/e-Mäusen mit neuronenspezifischer Expression von eYFP durch deren Fluoreszenz sowohl im Gewebeverband als auch in der dissoziierten Kultur möglich. *Myelin Basic Protein* war bei neonatalen Mäusen schon im Alter von 2 bis 7 Tagen nach Geburt nachweisbar, ein Hinweis auf frühe Myelinisierung der Typ I Neurone. Keiner der beiden verwendeten anti-Cacna2d3-Antikörper

war sicher spezifisch für das Volllängenprotein dieser Untereinheit, da es auch im Gewebe von $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen zu einer distinkten Färbung kam. Bezüglich der Expression der mRNA neuronaler $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten wurde festgestellt, dass in der basalen/midbasalen Hälfte der Cochlea von Kontroll-Mäusen alle 3 neuronalen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten 1 bis 3 mit einer signifikant stärkeren Expression von $\alpha_2\delta_3$ vorkamen. Demgegenüber war basal in der $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus die $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit tendenziell verstärkt exprimiert. Bezogen auf die apikale/mediale Hälfte der Cochlea war keine Bevorzugung einer der Untereinheiten erkennbar. Im Rahmen der Zellkulturversuche führten zahlreiche Modifikationen des Zellkulturprotokolls, wie die Optimierung der Komponenten des Kulturmediums und eine geänderte Deckglasbeschichtung zu einem signifikant verbesserten Überleben der Spiralganglien-Neurone. Ein positiver Effekt durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren FGF 2 und GDNF bezogen auf das Überleben der Spiralganglien-Neurone konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Durch Immunfluoreszenzfärbung wird die Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen im Spiralganglion in fixierter Form ermöglicht. Murine Spiralganglien-Neurone vom Typ I zeigen deutlich früher als bisher angenommen eine Myelinisierung sowohl der Neurite als auch der Somata. TYFc/e-Mäuse mit neuronenspezifischer Expression von eYFP sind ein wertvolles Hilfsmittel, Spiralganglien-Neurone *in vivo* sowohl im Zellverband als auch in der dissoziierten Kultur zu identifizieren. Einer der getesteten anti-Cacna2d3-Antikörper (Cacna2d3, S-14: Santa Cruz) ist möglicherweise spezifisch für das Protein der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Außerdem zeigt er eine besondere Affinität zu Typ II-Neuronen, was auf eine verstärkte Proteinexpression dieser Untereinheit in der genannten Spiralganglien-Neuronengruppe schließen lässt. Bezüglich der mRNA-Expression zeigten die Daten der quantitativen TaqMan® Real-Time Polymerasekettenreaktion bei den $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen basal eine stärkere, vermutlich kompensatorische, Expression der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit. Dadurch kommt es jedoch nicht zu einem Ausgleich der genetisch bedingten Störung ihres auditorischen Phänotyps. Zudem stellt die $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit bei den Kontrollen insbesondere im basalen Cochlea-Abschnitt die dominierende $\alpha_2\delta$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle dar. Das Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur nach 24 Stunden war variabel und lag zwischen $2,2 \pm 1 \%$ und $3,9 \pm 0,6 \%$ bezogen auf die Spiralganglien-Neurone einer Cochlea. Diese Zahlen liegen gut im Wertebereich, der für dissoziierte Spiralganglien-Neuron-Kulturen bei Mäusen und Ratten publizierten Daten (0,14 - 6 %). Es ist daher gelungen, eine Methode für die Kultur dissoziierter neonataler Spiralganglien-Neurone zu etablieren.

Summary

Purpose: Spiral ganglion neurons, the primary afferent neurons in the auditory system, connect the sensory cells in the cochlea with central auditory neurons in the brain. So far, little is known about their physiology and pathophysiology. Because they are located in the bony modiolus of the cochlea within the temporal bone, access to them is extremely difficult, particularly in human beings. For this reason and because of their genetic potential, mice are used to study those cells. To ensure survival of dissected spiral ganglion neurons from the cochlea for *in vitro* experiments (e.g. electrophysiology, live imaging), for a sufficient period of time, culturing these cells is required. In the present thesis a primary cell culture system of enzymatically isolated mouse spiral ganglion neurons has been established. Furthermore, it has been investigated which neuronal $\alpha_2\delta$ -subunits of voltage-gated calcium channels ($\alpha_2\delta 1$ to 3) are expressed in the murine cochlea as a function of tonotopy and if this pattern is changed in $\alpha_2\delta 3$ -deficient mice.

Material and Methods: Different strains of mice have been used: NMRI mice, $\alpha_2\delta 3$ -deficient mice as well as different TYF-lines. Identification and characterization of neonatal spiral ganglion neurons has been performed using immunofluorescence labeling with various antibodies in both whole mounts and in dissociated cultured spiral ganglion neurons. To identify the different types of spiral ganglion neurons, the primary antibodies anti- β -tubulin and anti-peripherin have been used. Moreover, Schwann cells have been labelled with anti-myelin basic protein. The expression of the $\alpha_2\delta 3$ -subunit of voltage-gated calcium channels on protein level has been studied with different Cacna2d3 antibodies. In addition, mRNA expression of the neuronal $\alpha_2\delta$ -subunits of voltage-gated calcium channels ($\alpha_2\delta 1$ to 3) has been examined using quantitative TaqMan[®] real-time polymerase chain reaction.

Results: Anti- β -tubulin was used to identify type I spiral ganglion neurons. About 5 to 10 % of the spiral ganglion neurons were peripherin-positive, indicating they are type II neurons. In whole mounts and dissociated cultures of TYFc/e-mice, which selectively express eYFP in neurons, identification of spiral ganglion neurons was performed due to their fluorescence. Myelin basic protein was detected in spiral ganglion neurons as early as postnatal days 2 to 7 indicating that type I spiral ganglion neurons are myelinated at that age. None of the Cacna2d3 antibodies tested was clearly specific for the full length protein of that subunit because distinct staining could also be detected in the tissue of $\alpha_2\delta 3$ -deficient mice. At mRNA level, transcripts of all 3 neuronal $\alpha_2\delta$ -subunits (1 to 3) were detected in the basal/midbasal half of the cochlea of control mice, with a

significantly higher expression of $\alpha_2\delta_3$. In contrast, the expression of the $\alpha_2\delta_2$ -subunit was tendentially increased in that cochlear location in $\alpha_2\delta_3$ -deficient mice. No difference in expression was found in the apical/medial half of the cochlea between the two genotypes. Regarding the dissociated cell culture, various adjustments of the cell culture protocol, for example the optimization of components of the culture medium and an altered coating of the coverslips, led to a significantly increased survival rate of spiral ganglion neurons. Addition of the growth factors FGF 2 and GDNF did not further improve the survival of spiral ganglion neurons.

Conclusions: The different cell-types of the spiral ganglion can be discriminated using immuno-labeling with various antibodies. Axons and cell bodies of type I mouse spiral ganglion neurons are myelinated from postnatal day 2 onwards. TYFc/e-mice which selectively express eYFP in neurons are a valuable tool to identify spiral ganglion neurons *in vivo* in whole mounts and in dissociated culture. One of the Cacna2d3 antibodies tested (Cacna2d3, S-14; Santa Cruz) might be specific for the protein of the $\alpha_2\delta_3$ -subunit of voltage-gated calcium channels. This antibody showed a high affinity for type II neurons, suggesting that type II spiral ganglion neurons strongly express $\alpha_2\delta_3$ protein. Quantitative TaqMan® real-time polymerase chain reaction revealed increased expression of the $\alpha_2\delta_2$ -subunit of voltage-gated calcium channels in basal spiral ganglion neurons of $\alpha_2\delta_3$ -deficient mice compared with controls. This elevated expression of the $\alpha_2\delta_2$ -subunit might reflect a compensatory mechanism in spiral ganglion neurons, which however does not restore normal auditory function. In addition to that, the $\alpha_2\delta_3$ -subunit is the dominating subunit in the basal part of the cochlea of control mice. In dissociated culture, neuronal survival varied between $2,2 \pm 1 \%$ to $3,9 \pm 0,6 \%$ based on the number of spiral ganglion neurons of one cochlea after 24 hours. This number of surviving spiral ganglion neurons is in good agreement with published data for dissociated cultures of spiral ganglion neurons of mice and rats (0,14 % - 6 %). In summary, a dissociated culture of mouse spiral ganglion neurons has been successfully established.

2 Einleitung

Das menschliche Hörvermögen überspannt einen Frequenzbereich von 16 Hz bis 19.000 Hz. Im Alter von 2 bis 5 Jahren können noch höhere Frequenzen bis maximal 20.000 Hz wahrgenommen werden (Huppelsberg und Walter, 2009). Mit dem Alter wird die akustische Wahrnehmung im Rahmen der Presbyakusis zunehmend eingeschränkt (Probst et al., 2008).

Die Ohren sind die empfindlichsten Sinnesorgane des Menschen. Mithilfe hochkomplexer Verstärkungs- und Verarbeitungsmechanismen ist das menschliche Gehör in der Lage, selbst leiseste Umgebungsgeräusche wahrzunehmen und aus einer deutlich lauterer Umgebung herauszufiltern. Diese Empfindlichkeit ist wohl auf die entwicklungsgeschichtliche Funktion als Warn- und Orientierungssystem zurückzuführen (Behrends et al., 2010) und wird als „Cocktailparty Effekt“ bezeichnet. Innerhalb des auditorischen Systems kann zwischen dem peripheren und zentralen Teil unterschieden werden. Während peripher periodische Luftdruckschwankungen in neuronale Signale umgewandelt werden (Schmidt et al., 2010), dominieren zentral vor allem komplexe Verarbeitungssysteme, die beispielsweise das Richtungshören (durch den binauralen Vergleich des Höreindrucks) und die Schallmustererkennung ermöglichen (Huppelsberg und Walter, 2009). Letztgenannte ist besonders wichtig zum Verstehen und adäquaten Einsatz der Kommunikation. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Spiralganglien-Neurone, die als erste Neurone in der Hörbahn die Verbindung von peripheren und zentralen Anteil des auditorischen Systems gewährleisten.

2.1 Aufbau des Säugerohres

Das periphere Hörorgan ist in äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr dreigeteilt. Unter dem äußeren Ohr fasst man die Ohrmuschel und den äußeren Gehörgang zusammen. Hier wird der Schall wie durch einen Trichter aufgefangen und gerichtet auf das Trommelfell übertragen, welches die Grenze zum Mittelohr bildet. Am Trommelfell setzt die Gehörknöchelchenkette bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel an. Letzterer ist über seine Fußplatte mit dem ovalen Fenster und somit dem Innenohr verbunden. Die Gehörknöchelchenkette fungiert als Schallbrücke zwischen den Medien Luft (im äußeren Ohr) und Flüssigkeit (im Innenohr, Abbildung 2.1) und bewirkt durch die Hebelwirkung von Hammer, Amboss und Steigbügel gemeinsam mit dem Größenunterschied von Trommelfell und ovalen Fenster eine Impedanzanpassung. Ohne diese würden 99 % der Schallenergie beim Übergang von der Luft im Mittelohr auf das flüssige Medium im Innenohr

Einleitung

reflektiert und damit für die akustische Wahrnehmung verloren gehen (Geisler, 1998; Huppelsberg und Walter, 2009; Schmidt et al., 2010).

Das in der Pars petrosa des Schläfenbeins eingebettete Innenohr hat 2 Funktionen, die von benachbarten Sinnesorganen gewährleistet werden: Zum Einen die Detektion von Linear- und Winkelbeschleunigungen, und damit die Verarbeitung von Blickfeldstabilisierung, Halte- und Stellreflexen, Koordination von Bewegungsabläufen und räumlicher Orientierung. Dies wird vom Vestibularorgan mit seinen 3 Bogengängen und den Maculaorganen Sacculus und Utriculus geleistet. Zum Anderen die akustische Wahrnehmung. Diese wird vom Corti-Organ ermöglicht, das im häutigen Labyrinth der knöchernen Cochlea liegt (zur Übersicht siehe Hudspeth, 1989; Huppelsberg und Walter, 2009).

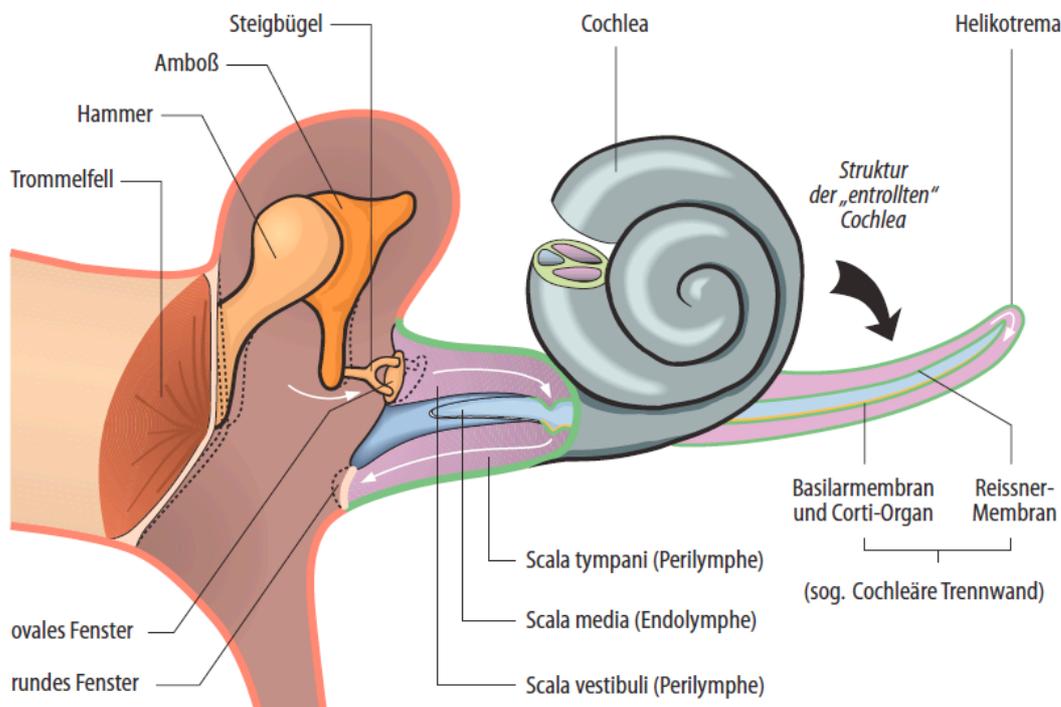


Abbildung 2.1: Aufbau des Ohres.

Über Trommelfell und Gehörknöchelchenkette wird die Schallenergie auf das ovale Fenster und damit die mit Perilymphe gefüllte Scala vestibuli des Innenohres übertragen. Dabei findet eine Impedanzanpassung von der Luft im äußeren Ohr auf die Perilymphe im Innenohr statt (Schmidt et al., 2010).

Das häutige Labyrinth ist um die knöcherne Achse (Modiolus) der Cochlea gewunden. Beim Menschen sind dies zweieinhalb, bei der Maus zweieinviertel Windungen. Das häutige Labyrinth besteht aus 3 flüssigkeitsgefüllten Gängen (Abbildung 2.1; Abbildung 2.2). Zentral ist die

Scala media gelegen, die auch Ductus cochlearis genannt wird. Darüber liegt die Scala vestibuli, darunter die Scala tympani, die jeweils durch die Reissner-Membran beziehungsweise die Basilarmembran von der Scala media abgegrenzt sind (Geisler, 1998).

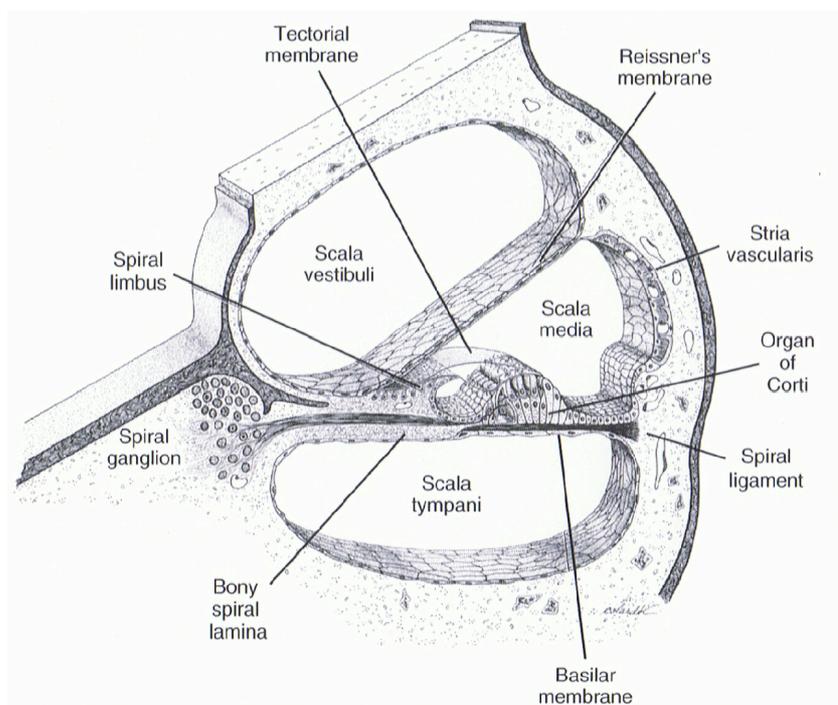


Abbildung 2.2: Querschnitt durch die Cochlea.

3 häutige Gänge sind innerhalb der Cochlea um den Modiolus gewunden. Die Scala media ist durch die Reissner-Membran nach oben von der Scala vestibuli und durch die Basilarmembran nach unten von der Scala tympani getrennt. Auf der Basilarmembran liegt das Corti-Organ, das somit Teil der Scala media ist. Die laterale Wand der Scala media bildet die Stria vascularis, die für die hohe Kaliumkonzentration in der Endolymphe mitverantwortlich ist. Im Gegensatz dazu enthalten Scala vestibuli und Scala tympani Perilymphe, deren Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit ähnelt und im Vergleich kaliumarm ist. Bony spiral lamina = Lamina spiralis ossea; Spiral ligament = Ligamentum spirale (Geisler, 1998).

Die Scala vestibuli beginnt am ovalen Fenster und geht am apikalen Ende der Cochlea, dem Helicotrema, in die Scala tympani über, welche am runden Fenster endet (Abbildung 2.1). Von der Fußplatte des Steigbügels am ovalen Fenster ausgehend wird die Schwingung der Gehörknöchelchenkette auf die Perilymphe der Scala vestibuli übertragen. Das runde Fenster dient zum Druckausgleich der Schwingung, die über die nicht komprimierbare Perilymphe fortgeleitet wird (Schmidt et al., 2010).

Die Scala media ist begrenzt von der Stria vascularis an ihrer lateralen Wand, die die kaliumreiche Endolymphe produziert, sowie dem Corti-Organ, das auf der Basilarmembran aufliegt. Letztere ist

zwischen der Lamina spiralis ossea (einer Knochenleiste am Modiolus) und dem Ligamentum spirale der Cochleawand aufgespannt (Abbildung 2.2). Vom inneren Sulcus aus ragt die Tektorialmembran wie eine Haube über die Haarzellen (Geisler, 1998). Die physikalischen Eigenschaften der Basilarmembran ändern sich im Verlauf der Cochlea. So ist sie im apikalen Teil nahe des Helicotremas breiter, dünner und weniger steif. Entlang der Basilarmembran entsteht durch die Übertragung von Schallenergie auf die Perilymphe eine Wanderwelle. Diese ändert sich ebenfalls abhängig von den Eigenschaften der Basilarmembran und der Funktion des cochleären Verstärkers: Zum Helicotrema hin wird die Wellenlänge kürzer, während demgegenüber die Amplitude größer wird (von Békésy, 1960).

Aufgrund der genannten physikalischen Eigenschaften der Basilarmembran kann bereits in der Cochlea eine tonotope Wahrnehmung des Schalls stattfinden, das heißt eine bestimmte Frequenz erregt örtlich genau definierten Nervenfasern entlang der cochleären Windungen. Hochfrequente Töne werden im basalen Teil der Cochlea nahe des ovalen Fensters verarbeitet, während niederfrequente Töne im apikalen Bereich der Cochlea nahe des Helicotremas ein maximales Signal erzeugen (von Békésy, 1960). Für jede Tonfrequenz existiert damit ein Ort, an dem eine maximale Schwingung der Basilarmembran entsteht (Geisler, 1998).

2.2 Feinbau des Corti-Organ

Im Corti-Organ liegen, in zahlreiche Stützzellen eingebettet, die Sinneszellen der Cochlea (zur Übersicht siehe Raphael und Altschuler, 2003; Abbildung 2.3). Sie werden aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung mit mehreren unterschiedlich hohen und über dünne Proteinfäden (Tip-links; Pickles et al., 1984) verbundenen apikalen Villi als „Haarzellen“ bezeichnet. Aus historischen Gründen werden diese Villi Stereozilien genannt. Unterschieden wird zwischen 2 Typen von Haarzellen (HZ), die sowohl in ihrem zellulären Aufbau, als auch in ihrer Innervation sowie der Funktion im Hörorgan verschieden sind: 1 Reihe innerer Haarzellen (IHZ) und 3 Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ; Geisler, 1998; Abbildung 2.3).

An den Haarzellen dient die Membrana reticularis als Trennschicht und Potentialgrenze zwischen oberem endo- und unterem perilymphatischem Raum. Dadurch unterscheidet sich die Ionenzusammensetzung an den Stereozilien (kaliumreiche Endolymphe) von der am Zellkörper (relativ kaliumarme Perilymphe). Dieser Gradient wird über aktive Ionenaustauschprozesse an der Stria vascularis aufrecht erhalten (Schmidt et al., 2010).

Hauptaufgabe der äußeren Haarzellen ist die lokale Verstärkung des akustischen Signals (Davis, 1983). Die durch Schall ausgelöste Schwingung der Basilarmembran verursacht eine Scherbewegung zwischen Tektorial- und Basilarmembran. Dabei werden die in die Tektorialmembran ragenden Stereozilien der äußeren Haarzellen mechanisch ausgelenkt und es öffnen sich an den Tip-links gelegene dehnungsempfindliche Kationenkanäle (zur Übersicht siehe Hudspeth, 1989), die zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht genau identifiziert sind. Außerdem bewirkt die Aktivität der äußeren Haarzellen eine Verstärkung der Scherbewegung zwischen Basilar- und Tektorialmembran, was über den entstehenden Endolymphstrom zu einer stärkeren Auslenkung der Stereozilien der inneren Haarzellen führt. Es kommt zum Einstrom von Kationen, dem so genannten Transduktionsstrom, der in den beiden Typen von Haarzellen ein Rezeptorpotential generiert. Äußere Haarzellen sind durch das an ihrer lateralen Zellwand gelegene Motorprotein Prestin (Abbildung 2.3, rot) elektromotil, das heißt einer Spannungsänderung (dem oszillierenden Wechsel von De- und Hyperpolarisation) folgt eine Flächenänderung der einzelnen Prestinmoleküle und damit eine Längenänderung der gesamten Zelle (Zenner et al., 1985; Zheng et al., 2000). Diese aktive, unter Energieverbrauch ablaufende Längenänderung führt zu einer Verstärkung des akustischen Reizes um etwa 40 bis 60 dB (Lieberman et al., 2002). Dies entspricht in etwa dem Schalldruckpegel einer (leisen bis moderaten) menschlichen Unterhaltung. Die Presbyakusis ist häufig von einem Verlust der äußeren Haarzellen im Hochtonbereich begleitet. Die reduzierte Funktion dieser cochleären Verstärkerelemente ist von Relevanz: Insbesondere das Sprachverständnis ist in einer Unterhaltung mit mehreren Gesprächspartnern herabgesetzt, da es zu einem Diskriminationsverlust der einzelnen akustischen Quellen kommt.

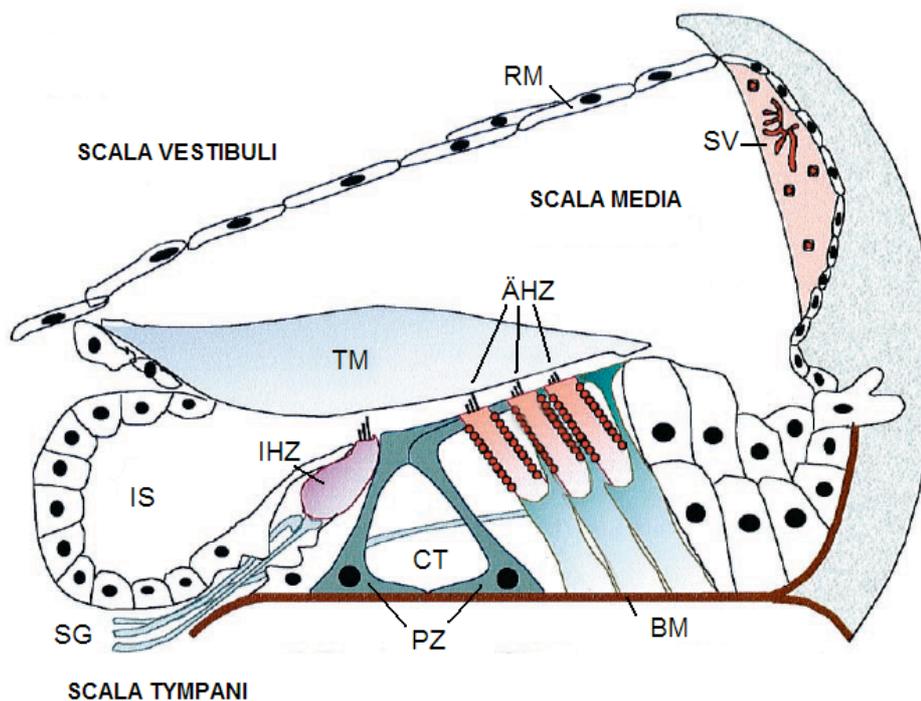


Abbildung 2.3: Querschnitt durch das Corti-Organ.

Die einzelnen Anteile des Corti-Organ sind im Querschnitt dargestellt. Dabei bedeuten die Abkürzungen: ÄHZ: äußere Haarzellen (rot: Motorprotein Prestin), BM: Basilarmembran, CT: Corti-Tunnel, IHZ: innere Haarzellen, IS: innerer Sulcus, PZ: Pfeilerzellen, RM: Reissner-Membran, SG: Spiralganglion, SV: Stria vascularis, TM: Tectorialmembran (zur Lage der Spiralganglien-Neurone siehe Abbildung 2.4; modifiziert nach Ashmore et al., 2000).

Die eigentlichen Sinneszellen sind die inneren Haarzellen (Geisler, 1998). An ihnen findet die Transduktion des mechanischen Reizes, der Auslenkung der Stereozilien, zu elektrochemischen Signalen in Form einer Neurotransmitterausschüttung statt. Der Transduktionsstrom depolarisiert die Zelle, wodurch sich unter anderem Calciumkanäle vom Typ $Ca_v1.3$ öffnen (Platzer et al., 2000). Dies führt zur Glutamat-Freisetzung an am basalen Pol der Zelle gelegenen Synapsen (Puel, 1995). Das an den afferenten Endigungen der Spiralganglien-Neurone entstehende exzitatorische postsynaptische Potential wird über die Neurite der Neurone als Aktionspotential nach zentral geleitet. Adulte innere Haarzellen generieren ein graduiertes Rezeptorpotential (Kros et al., 1998), das heißt sie können fein abgestufte Änderungen der Anregungsschwingungen in analoge, fein abgestufte Änderungen des Rezeptorpotentials und in fein abgestufte Transmitterausschüttung wandeln. Dadurch ist eine präzise Schallverarbeitung möglich. Demgegenüber sind immature innere Haarzellen spontanaktiv (Brandt et al., 2007; Johnson et al., 2011; Kros et al., 1998). Vor Hörbeginn bilden sie Aktionspotentiale, als deren Aufgabe unter anderem die funktionelle

Feineinstellung der synaptischen Verschaltungen zu den Neuronen der Hörbahn, inklusive der Spiralganglien-Neurone, diskutiert wird (Pujol et al., 1998).

2.3 Rolle der Spiralganglien-Neurone

Spiralganglien-Neurone (SG-Neurone, SGN) sind die primär-afferenten Neurone im auditorischen System. Ihre Hauptaufgabe ist die Verbindung der Sinneszellen mit den zentral gelegenen auditorischen Kerngebieten. Die Weiterleitung des auditorischen Signals wird über den Hörnerv gewährleistet, der aus den zentralen Neuriten der Spiralganglien-Neurone besteht. Die Spiralganglien-Neurone sind somit die erste Schaltstelle im auditorischen System. Ihre Somata sind im Ganglion cochleare entlang des Rosenthal-Kanals lokalisiert. Dieser bildet eine knöcherne Rinne am Modiolus der Cochlea (Rusznák und Szűcs, 2009; Abbildung 2.2; Abbildung 2.3). Abhängig von der betrachteten Spezies ergeben sich verschieden hohe Anzahlen von Spiralganglien-Neuronen: die humane Cochlea enthält etwa 35.000 (Rask-Andersen et al., 2012), während in der murinen Cochlea etwa 12.350 Spiralganglien-Neurone vorhanden sind (Ehret, 1983). Nach innervierten Zellen, Morphologie und Funktion werden 2 Typen von Spiralganglien-Neuronen unterschieden: myelinisierte Neurone vom Typ I und unmyelinisierte vom Typ II (Reid et al., 2004; Rusznák und Szűcs, 2009). Durch entwicklungsbedingten neuronalen Zelltod kommt es während der postnatalen Reifung in der ersten Woche zum Verlust von insbesondere Typ II Neuronen. Außerdem nehmen die Spiralganglien-Neurone in den ersten 3 postnatalen Wochen an Größe zu und an Dichte im Rosenthal-Kanal ab (Echteler und Nofsinger, 2000). Bipolare Typ I Neurone (90 bis 95 %) liegen eins-zu-eins mit den inneren Haarzellen verschaltet vor und sind somit die primären Neurone im Hörorgan. Typ II Neurone (5 bis 10 %) erscheinen demgegenüber pseudounipolar und bilden über die äußeren Spiralbündel, das heißt, ihre peripheren Neurite, Synapsen mit 3 bis 20 äußeren Haarzellen (Barclay et al., 2010; Geisler, 1998). Aufgrund dieser Verschaltung sind die Spiralganglien-Neurone wie auch die Haarzellen tonotop organisiert (zur Übersicht siehe Adamson et al., 2002; Echteler und Nofsinger, 2000).

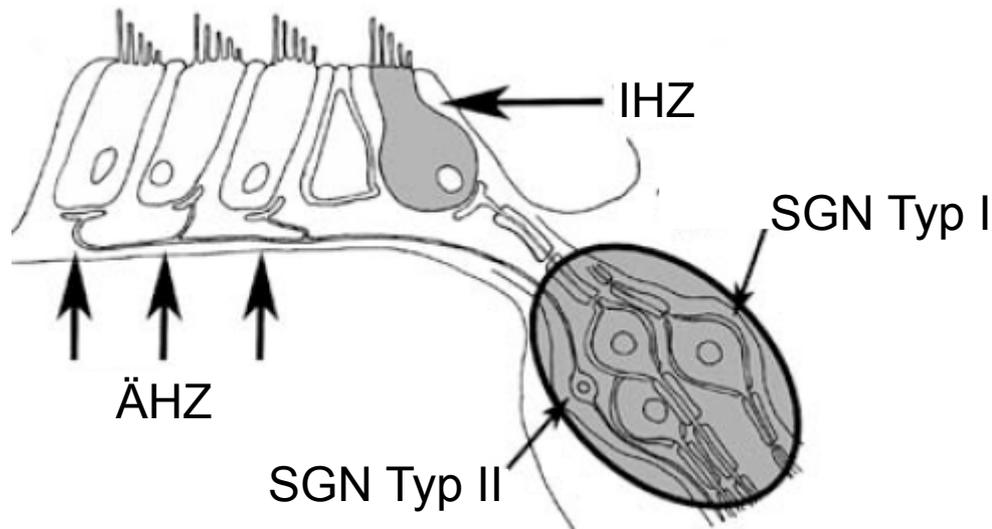


Abbildung 2.4: Überblick über die Anordnung und Verbindung der Spiralganglien-Neurone.

Den 3 Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ) steht 1 Reihe innerer Haarzellen (IHZ) gegenüber. In dem grauen Kreis sind die beiden Typen von Spiralganglien-Neuronen dargestellt (SGN Typ I und SGN Typ II). SGN Typ I sind myelinisiert und zahlreicher. Ihre peripheren Fortsätze enden jeweils einzeln an den inneren Haarzellen. Demgegenüber sind SGN Typ II deutlich kleiner, unmyelinisiert und bilden Synapsen mit mehreren äußeren Haarzellen (Rusznák und Szűcs, 2009).

Die Weiterleitung der akustischen Information von den Haarzellen zu den zentralen auditorischen Kerngebieten erfolgt elektrisch über Aktionspotentiale. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Spiralganglien-Neurone sind entlang der tonotopen Achse der Cochlea nicht homogen. Apikale Spiralganglien-Neurone, die niederfrequente Töne verarbeiten, akkomodieren langsam und zeigen dabei breitere Aktionspotentiale sowie längere Latenzzeiten. Demgegenüber sind basale Spiralganglien-Neurone, die für die Verarbeitung hochfrequenter Töne verantwortlich sind, schnell akkomodierend mit schmalen Aktionspotentialen und kurzen Latenzzeiten (zur Übersicht siehe Adamson et al., 2002). Dies ist auf eine zum Teil spezifische Expression von verschiedenen Ionenkanälen, etwa Calcium-, Kalium- und HCN-Kanälen (hyperpolarisationsaktivierte, durch zyklische Nukleotide gesteuerte (Kationen-)Kanäle; Chen und Davis, 2006), innerhalb der neuronalen Zellmembran zurückzuführen (siehe auch 2.5 Calciumkanäle in Spiralganglien-Neuronen). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die die inneren Haarzellen innervierenden Spiralganglien-Neurone bezogen auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften untereinander nicht gleich sind, sondern in Neurone mit hoher Spontanrate und geringem dynamischen Bereich, mittlerer Spontanrate und mittlerem dynamischen Bereich und geringer Spontanrate und großem dynamischen Bereich eingeteilt werden können (Zilberstein et al., 2012). Als weitere Eigenschaft

sind Spiralganglien-Neurone spontanaktiv (Lin und Chen, 2000; Rusznák und Szűcs, 2009). Dieser Effekt beruht bei murenen Spiralganglien-Neuronen hauptsächlich auf der spontanen Glutamat-Freisetzung durch die inneren Haarzellen sowie auf ihren intrinsischen Membraneigenschaften (2.2 Feinbau des Corti-Organs).

2.4 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle kommen in den Membranen erregbarer Zellen vor und erfüllen vielfältige Aufgaben. In Neuronen sind dies: (i) präsynaptischer Calciumeinstrom zur synaptischen Übertragung, (ii) Modulation der elektrischen Erregbarkeit der Neurone, insbesondere in Verbindung mit Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen (Chen und Davis, 2006; Rusznák und Szűcs, 2009) und (iii) Erregungs-Transkriptions-Kopplung (zur Übersicht siehe Catterall et al., 2005; Catterall, 2011). Anhand von pharmakologischen und elektrophysiologischen Charakteristika erfolgt eine Einteilung in 5 Gruppen (Tabelle 2.1): L-Typ, P/Q-Typ, N-Typ, R-Typ und T-Typ-Kanäle. Letztere bilden die Gruppe der *low-voltage activated*-Kanäle. Ihr wesentlichstes Merkmal ist eine Aktivierung bei schwacher Depolarisation. Demgegenüber aktivieren die R-Typ, L-Typ-, N-Typ- und P/Q-Typ-Kanäle erst bei stärkerer Depolarisation (*high-voltage activated*-Kanäle; zur Übersicht siehe Catterall et al., 2005). Den verschiedenen Klassen von Calciumkanälen sind unterschiedliche $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheiten zugeordnet. Dabei kommen einige dieser Untereinheiten überproportional häufig in bestimmten Geweben vor (Striessnig und Koschak, 2008).

Tabelle 2.1: Übersicht über die verschiedenen Klassen von Calciumkanälen.

Den verschiedenen Calciumkanalklassen sind unterschiedliche $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheiten zugeordnet. Weiterhin unterscheiden sie sich in Bezug auf ihre Expressionsgewebe (modifiziert nach Striessnig und Koschak, 2008).

Calciumkanalklasse	$Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit	Expressionsgewebe
L-Typ	$Ca_v1.1\alpha_1$	Skelettmuskel
	$Ca_v1.2\alpha_1$	Herzmuskel und glatte Muskulatur, Neurone, endokrine Zellen,
	$Ca_v1.3\alpha_1$	Sinusknoten und AV-Knoten, Neurone, endokrine Zellen, Sinneszellen
	$Ca_v1.4\alpha_1$	Retina
P/Q-Typ	$Ca_v2.1\alpha_1$	Neurone, endokrine Zellen
N-Typ	$Ca_v2.2\alpha_1$	Neurone, endokrine Zellen
R-Typ	$Ca_v2.3\alpha_1$	Neurone, endokrine Zellen, Herzmuskel und glatte Muskulatur
T-Typ	$Ca_v3.1\alpha_1$	Neurone, Sinusknoten
	$Ca_v3.2\alpha_1$	Gefäßmuskulatur und Herzmuskel, Niere und Leber
	$Ca_v3.3\alpha_1$	Neurone

Ein spannungsgesteuerter Calciumkanal besteht aus 3 bis 4 verschiedenen Untereinheiten (Abbildung 2.5). Diese Untereinheiten sind: (i) $Ca_v\alpha_1$, (ii) $Ca_v\beta$, (iii) $Ca_v\alpha_2\delta$ und in einigen Fällen (iv) $Ca_v\gamma$ (zur Übersicht siehe: Catterall et al., 1988; Arikath und Campbell, 2003; Dolphin, 2009). Von jeder Untereinheit existieren mehrere Isoformen. Dadurch ergibt sich eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten, die durch zahlreiche Spleißvarianten noch erhöht wird.

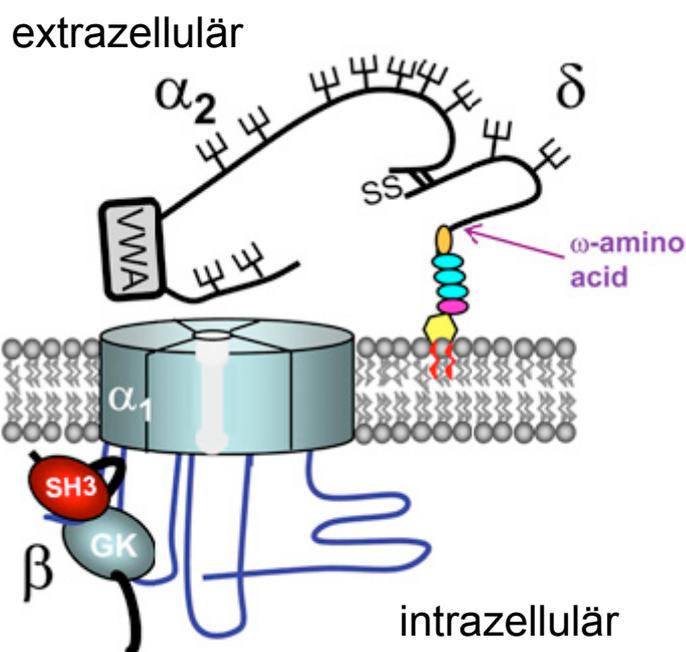


Abbildung 2.5: Aufbau eines spannungsgesteuerten Calciumkanals.

Der spannungsgesteuerte Calciumkanal besteht aus einer transmembranären $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit, einer vollständig intrazellulären $Ca_v\beta$ -Untereinheit und einer über einen GPI-Anker in der extrazellulären Lipidschicht der Zellmembran befestigten $Ca_v\alpha_2\delta$ -Untereinheit (Strukturen des GPI-Ankers: Ethanolamin (orange), 3 Mannoseringe (blau), Glucosamin (violett) und Inositol (gelb)). Eine Disulfidbrücke verbindet den α_2 - und δ -Anteil (modifiziert nach Davies et al., 2010).

Die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit ist ein transmembranäres Protein und formt die Kanalpore. Sie trägt sowohl den Spannungssensor als auch den Selektivitätsfilter. Bei geöffneter Pore strömt Ca^{2+} in die Zelle ein. Die β -Untereinheit liegt intrazellulär und bindet über komplementäre Interaktionsbereiche an die α -Interaktionsdomäne (AID) der Kanalpore (zur Übersicht siehe Dolphin, 2012). Des Weiteren ist die β -Untereinheit am Transport des Kanals vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran beteiligt. Außerdem moduliert die β -Untereinheit die Spannungsabhängigkeit des Calciumstroms durch die Kanalpore (zur Übersicht siehe Dolphin, 2009). Auf Organebene sind $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit und $Ca_v\beta$ -Untereinheit häufig spezifisch miteinander kombiniert. So interagieren in der Skelettmuskulatur $Ca_v\beta_1$ und $Ca_v1.1\alpha_1$ spezifisch miteinander (zur Übersicht siehe Arikath und Campbell, 2003).

Die in der vorliegenden Dissertation untersuchte $Ca_v\alpha_2\delta$ -Untereinheit weist einige Besonderheiten auf: Es kodieren vier Gene für dieses Protein (CACNA2D1, CACNA2D2, CACNA2D3 und

CACNA2D4), das posttranslational in die α_2 - und δ -Untereinheit geschnitten wird. Diese werden anschließend wieder über eine Disulfidbrücke verbunden (De Jongh et al., 1990). Beide Untereinheiten ragen im Wesentlichen in den Extrazellulärraum und sind über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der äußeren Lipidschicht verankert (zur Übersicht siehe Bauer et al., 2010; Davies et al., 2010). Sie verlangsamen den *turnover* der Calciumkanäle an der Zellmembran (zur Übersicht siehe Bauer et al., 2010). Zusätzlich beeinflusst die δ -Untereinheit die Spannungsabhängigkeit des Calciumkanals (Davies et al., 2010).

Die verschiedenen Typen von $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -Untereinheiten sind im Säugetier-Organismus nicht homogen verteilt. So findet sich $\alpha_2\delta 1$ insbesondere an der Präsynapse exzitatorischer Neurone (Bauer et al., 2009; Cole et al., 2005), $\alpha_2\delta 2$ ist vor allem an GABA-ergen Neuronen und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns lokalisiert (Barclay et al., 2001; Cole et al., 2005), während $\alpha_2\delta 3$ sehr dicht im zentralen Cortex, Hippocampus, Nucleus caudatus sowie Putamen verteilt ist (Cole et al., 2005). Untersuchungen an *Drosophila* haben gezeigt, dass speziell die letztgenannte Untereinheit eine wichtige Rolle beim Transport des Calciumkanals zur korrekten Stelle an der Präsynapse spielt (Dickman et al., 2008). Eine Ausnahme zu dieser breit gefächerten Verteilung stellt die $\alpha_2\delta 4$ -Untereinheit dar: Sie wird lediglich in endokrinen Geweben und den Neuronen der Retina exprimiert (Qin et al., 2002). Über das Vorkommen der $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien-Neuronen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Daten veröffentlicht.

2.5 Calciumkanäle in Spiralganglien-Neuronen

Für die Funktion der Spiralganglien-Neurone sind spannungsgesteuerte Calciumkanäle (siehe auch 2.4 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle) unverzichtbar (Chen et al., 2011; Lin et al., 2011; Roehm et al., 2008). Dabei ist ihre Verteilung über die Zelle nicht uniform, sondern zeigt gemäß der Funktion der Kanäle unterschiedliche Verteilungsschwerpunkte. Außerdem ist zu beachten, dass die Reifung der Spiralganglien-Neurone bis zur zweiten postnatalen Woche fortschreitet, wodurch das Verteilungsmuster der Ionenkanäle bis zu diesem Zeitpunkt wandelbar bleibt (Rusznák und Szücs, 2009). Lin et al. (2011) konnten über elektrophysiologische Ableitungen an den Terminalen von Hörnervenfaser im Nucleus cochlearis anterior bei Mäusen zum Zeitpunkt des Hörbeginns (am postnatalen Tag (P) 11 bis 12; Ehret, 1985) zeigen, dass etwa 85 % der präsynaptischen Calciumströme über P/Q-Typ-Kanäle ($\text{Ca}_v2.1\alpha_1$) ablaufen. Unter den Terminalen der Hörnervenfaser werden die „*endbulbs of Held*“ verstanden. Sie entsprechen der synaptischen Verbindung von Spiralganglien-Neuronen (präsynaptisch) und Bushy-Zellen (postsynaptisch). Die

Bushy-Zellen sind wesentliche „onset-Neurone“ und in Schaltkreise eingebunden, die Laufzeitunterschiede analysieren, woraus im auditorischen Cortex ein binauraler Höreindruck entsteht (Lin et al., 2011). Die Existenz von N- und T-Typ-Kanälen konnte pharmakologisch ebenfalls nachgewiesen werden (Roehm et al., 2008; Lin et al., 2011).

Am Soma der Spiralganglien-Neurone ist die Aufgabe der spannungsgesteuerten Calciumkanäle insbesondere die Kopplung von zellulärer Erregung und Transkription. Somit kann die Häufigkeit der elektrischen Erregung die Expression von Merkmalen beeinflussen. Hierfür werden insbesondere L-Typ Kanäle diskutiert (zur Übersicht siehe Catterall et al., 2005; Catterall, 2011). An den peripheren Dendriten der Spiralganglien-Neurone findet vor allem die feine Modulation elektrischer Erregung statt. Hierzu diskutiert werden sowohl R-, N- als auch T-Typ-Kanäle (Roehm et al., 2008). Die mRNA-Expression von N-Typ ($Ca_v2.2\alpha_1$) und T-Typ ($Ca_v3.3\alpha_1$) Kanälen konnte von Chen et al. (2011) in neonatalem murinen Spiralganglien-Gewebe über quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden.

2.6 Spezielle Mausmodelle

Spiralganglien-Neurone des Menschen liegen für Experimente weitestgehend unzugänglich im knöchernen Labyrinth des Innenohrs verborgen. Daher sind Studien an Modellorganismen unerlässlich. Die Hausmaus, *mus musculus*, bietet sich für Studien am peripheren Hören besonders an, da sie zum Einen taub geboren wird (Ehret, 1983), wodurch die Entwicklung des Gehörs gut untersucht werden kann und zum Anderen ihr Skelett noch nicht vollständig verknöchert ist. Dies ermöglicht den Zugang zu den Spiralganglien-Neuronen (zur Übersicht siehe Adamson et al., 2002). Ein weiterer Vorteil ist, dass gezielte Mutationen in das Genom der Mäuse eingeführt werden können. So ist es einerseits möglich, neue Gene zu dem bestehenden Genom hinzuzufügen, andererseits können Gene auch ausgeschaltet werden. In diesem letztgenannten Zusammenhang spricht man von „defizienten Mäusen“ für ein bestimmtes Merkmal.

2.6.1 $\alpha_2\delta_3$ -defizientes Mausmodell

$\alpha_2\delta_3$ -defiziente Mäuse ($\alpha_2\delta_3^{-/-}$ -Mäuse) tragen eine Mutation im CACNA2D3 Gen, das für die $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle kodiert. Unter dem Promotor B6.129P2-Cacna2d3^{tm1Dgen} ist im Exon 15 ein Mutationskonstrukt eingeführt worden (Information gemäß The Jackson Laboratory, 2013: <http://jaxmice.jax.org/strain/005780.html>). Dieses Konstrukt besteht aus 3 Teilen: 1. einer internen ribosomalen Eintrittsstelle, eine spezifische Faltung der

mRNA, die ohne weitere Initiationsfaktoren die Bindung von mRNA an Ribosomen ermöglicht. 2. lacZ, ein Teil des lac-Operons, der für eine bakterielle β -Galaktosidase kodiert und 3. Neo555g, ein Gen, das für Neomycinresistenz kodiert. Gleichzeitig wurden in dem genannten Exon 11 Basenpaare, die Sequenz zwischen 1521 bp und 1531 bp, deletiert (Information gemäß Mouse Genome Informatics, 2013: <http://www.informatics.jax.org/>; The Jackson Laboratory, 2013: <http://jaxmice.jax.org/strain/-005780.html>). Aufgrund des Einfügens des Gens der bakteriellen β -Galaktosidase ist die Gendeletion über eine lacZ-Färbung nachweisbar (Neely et al., 2010).

Die beschriebenen $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ -Mäuse besitzen einen Hörphänotyp (Pirone et al., 2013, eingereicht). Sie zeigen leicht erhöhte Hörschwellen (etwa 5 dB) und aberrante Wellen akustisch evozierter Hirnstammpotentiale (aberrante ABR-Wellen). Diese lassen auf eine auditive Verarbeitungsstörung ausgehend von den Spiralganglien-Neuronen schließen, da insbesondere die Wellen II (von Spiralganglien-Neuronen auf Bushy-Zellen im Nucleus cochlearis), III (vom Nucleus cochlearis in den oberen Olivenkomplex) und IV (vom oberen Olivenkomplex zum Nucleus lemniscus lateralis) betroffen sind. Außerdem ist die synaptische Transmission an den Bushy-Zell-Synapsen beeinträchtigt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die präsynaptischen Boutons in der $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus morphologisch deutlich kleiner sind als in korrespondierenden Kontrollen und die Zahl der Calciumkanäle, betreffend insbesondere $Ca_v2.1\alpha_1$, wie in einer Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden konnte, reduziert ist (Pirone et al., 2013, eingereicht). Somit fließt wahrscheinlich ein geringerer Strom an der Synapse und es wird weniger Neurotransmitter freigesetzt.

2.7 Fragestellungen

Spiralganglien-Neurone stellen als erste neuronale Schaltstelle einen wichtigen Abschnitt in der Hörbahn dar. Verschiedene Mausmodelle können ein Instrument sein, um mehr über den Aufbau und die Eigenschaften der Spiralganglien-Neurone zu erfahren. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Etablierung einer dissoziierten Primärkultur von Spiralganglien-Neuronen ein Schritt, damit beispielsweise elektrophysiologische Untersuchungen, wie sie bei der präklinischen Entwicklung und Verbesserung von Cochleaimplantaten von Nutzen sein können, ermöglicht werden. Damit die Eigenschaften der Spiralganglien-Neurone im enzymatisch und mechanisch vereinzelt Kulturpräparat verstanden werden können, wurden zunächst Untersuchungen an Spiralganglien-Neuronen im Gewebeverband durchgeführt. Folgende Fragestellungen wurden daher in der vorliegenden Dissertation bearbeitet:

- 1 Wie können die verschiedenen Zelltypen des Spiralganglions im Gewebeverband unterschieden werden?
- 2 Welche $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten sind auf mRNA- und Proteinebene in Spiralganglien von Wildtypmäusen exprimiert? Wie ist in $\alpha_2\delta 3$ -defizienten Mäusen das Expressionsmuster der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle verändert?
 - 2.1 Wie ist die Verteilung der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten entlang der tonotopen Achse der Cochlea bezogen auf mRNA? Wie wirkt sich die Deletion der $\alpha_2\delta 3$ -Untereinheit darauf aus?
 - 2.2 Sind die $\alpha_2\delta 3$ -Untereinheiten über Immunfluoreszenzfärbung spezifisch nachweisbar?
- 3 Etablierung einer dissoziierten Primärkultur von Spiralganglien-Neuronen als Präparat für elektrophysiologische Messungen von Calciumströmen.
 - 3.1 Wie sind Spiralganglien-Neurone kultivierbar und wie kann man sie von umgebenden Zellen in Kultur unterscheiden?
 - 3.2 Wie können die Kulturbedingungen optimiert werden, um ein besseres Überleben der Spiralganglien-Neurone zu erreichen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Mauslinien

Die Tierhaltung verlief nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und den Auflagen der Veterinärbehörde des Saarlandes. Die Tiere waren untergebracht in der Tierhaltung der Experimentellen Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar. Sie erhielten Wasser und Futter ad libitum und wurden in einem 12 Stunden Tag- und 12 Stunden Nacht- Rhythmus gehalten.

3.1.1.1 NMRI-Mäuse

Bei NMRI-Mäusen (NMRI: *Naval Medical Research Institute*) handelt es sich um ein konventionelles Albino-Mausmodell. Eine Besonderheit dieser Linie ist, dass sie in Auszucht gezüchtet wurde und somit über einen relativ breiten genetischen Hintergrund verfügt, wodurch hereditäre genetische Defekte unwahrscheinlich sind. Zudem tragen die Mäuse keinen bekannten Hörphänotyp. Die NMRI-Mäuse wurden bezogen über Charles River; Sulzfeld, Deutschland (Information gemäß Charles River, 2013: http://www.criver.com/fr-FR/ProdServ/ByType/-ResModOver/ResMod/Pages/NMRI_Mouse.aspx).

3.1.1.2 $\alpha_2\delta_3$ -defiziente Mäuse

Die Mäuse wurden von Deltagen Inc.; San Carlos, Kalifornien, USA erzeugt und über Jackson Laboratories; Bar Harbor, Maine, USA gekauft (Information gemäß The Jackson Laboratory, 2013: <http://jaxmice.jax.org/strain/005780.html>; 2.6.1 $\alpha_2\delta_3$ -defizientes Mausmodell).

3.1.1.3 TYF-Mäuse

Die TYF-Mäuse wurden von Prof. Dr. Frank Kirchhoff, Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt. Sie exprimieren *enhanced Yellow Fluorescent Protein* (eYFP) unter dem Neuronen-spezifischen Promotor Thy-1.2. Der Name der Mauslinie bezieht sich auf den verwendeten Promotor und das darunter exprimierte Protein (Thy-1.2, Yellow Fluorescent Protein). In der Arbeit wurden verschiedene Sublinien betrachtet, insbesondere TYFe und TYFc. In der TYFc-Linie, die im Folgenden näher untersucht wurde, fluoreszieren zahlreiche, jedoch nicht alle Typen von Neuronen (Winter et al., 2007). Eine

weitere verwendete Mauslinie sollte in Gliazellen unter dem humanen GFAP-Promotor (*Glial Fibrillary Acidic Protein*; saures Gliafaserprotein) einen blauen Fluoreszenzfarbstoff exprimieren. Sie wurde ebenfalls auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht.

3.1.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.1: Übersicht über verwendete Geräte und allgemeinen Laborbedarf.

Gerät/Laborbedarf	Hersteller
LSM 700 Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, Deutschland
Stereomikroskopsystem SZX16	Olympus Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Schüttler KS 130 basic	IKA-Werke GmbH & CO KG; Staufen, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2; UVF 6.18S	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Laminar-Flow Reinluftwerkbank; HF 07-12	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank CB 150	Binder GmbH; Tuttlingen, Deutschland
Vortex Mixer VX 200	Axon Labortechnik; Kaiserslautern, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, Deutschland
-80-Grad-Tiefkühlschrank ULT 6 TA	Thermo Electron LED GmbH; Niederelbert, Deutschland
Kühlschrank (No-Frost-Technik) GKMN 2770	Bauknecht; Stuttgart, Deutschland
Bunsenbrenner Lobogaz 470	VWR International GmbH; Radnor, Pennsylvania, USA
Eppendorf-Röhrchen	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen mit Nocken (35 x 10 mm) steril (Zellkultur)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland

Petrischalen (60 x 15 mm) unsteril (Präparation)	
Ethanol	Zentrales Chemikalienlager der UdS; Homburg/Saar, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson Labware; Franklin Lakes, New Jersey, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Axon Labortechnik; Kaiserslautern, Deutschland
Deckgläser quadratisch (22 x 22 mm) rund (Durchmesser 10 mm und 15 mm)	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, Deutschland R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik; Emmendingen, Deutschland
Objektträger Superfrost plus weiß 90 Grad	VWR International GmbH; Radnor, Pennsylvania, USA
Präparationsbesteck (Pinzetten, mehrere Formen und Größen)	Fine Science Tools GmbH; Vancouver, Kanada

3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

3.1.3.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3.2: Chemikalien für Immunfluoreszenzfärbung.

Chemikalie	Hersteller
PBS	Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien, USA
BSA (Albumin Bovine Fraction Powder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
Triton™ X-100	VWR International GmbH; Radnor, Pennsylvania, USA
Vectashield® with DAPI	Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, Kalifornien, USA
DAPI (4'6-Diamidin-2-phenylindol) (0,5 mg/ml Stammlösung) Absorption: 364 nm Emission: 454 nm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
ImmunoPen™	Calbiochem; Darmstadt, Deutschland
PFA (Formaldehyd, 16 %)	Polysciences Europa GmbH; Eppelheim, Deutschland
Cell-Tak™	BD Bioscience; Franklin Lakes, New Jersey, USA

3.1.3.2 Verwendete Lösungen

Die physiologische Präparationslösung wurde auf Vorrat hergestellt, steril filtriert und bei 4 °C im Kühlschrank bis zum Gebrauch gelagert. Bei Verwendung im Rahmen der Zellkultur wurde jeweils eine noch sterile Flasche verwendet. Dies gilt ebenso für die Verwendung bei der RNA-Isolation.

Die verschiedenen Färbelösungen wurden jeweils unmittelbar vor Beginn der Präparation hergestellt, mit dem Vortex Mixer gemischt und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Präparationslösung (B01-Lösung).

Die einzelnen Bestandteile der Lösung zur Präparation neonataler SG-Neurone sind mit verwendeter Menge (mM), Hersteller und Firmensitz aufgeführt.

Bestandteil	Menge (mM)	Hersteller
NaCl	153	Merk Bioscience GmbH; Schwalbach, Deutschland
KCl	5,80	Calbiochem; Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	1,30	Calbiochem; Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	0,90	Calbiochem; Darmstadt, Deutschland
Glucose	5,60	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
HEPES acid	10	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	0,70	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3.4: Verwendete Lösungen für Immunfluoreszenzfärbung.

Die Inhaltsstoffe der Lösung sind jeweils mit ihrem prozentualen Anteil an der Lösung aufgeführt.

Name der Lösung	Inhaltsstoffe
Blockpuffer	1 % BSA in PBS
Permeabilisierungspuffer	0,5 % Triton™ X-100 in PBS
Reaktionspuffer	0,5 % BSA, 0,2 % Triton™ X-100 in PBS
Waschpuffer	0,1 % Triton™ X-100 in PBS (1x)

3.1.3.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung.

Die Antikörper sind jeweils mit Epitop, Spezies, genutzter Verdünnung, Hersteller und Firmensitz sowie der Lotnummer aufgeführt. PAK: primärer Antikörper; SAK: sekundärer Antikörper.

Antikörper	Epitop/Fluoreszenz	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Lotnummer
PAK	Cacna2d3 (S-14)	<i>goat, polyclonal</i>	1:50	Santa Cruz biotechnology, inc.; Santa Cruz, Kalifornien, USA	Aliquot von H. Seitter, Centre for Integrative Neuroscience; Tübingen
PAK	Cacna2d3	<i>rabbit, polyclonal</i>	1:200	Novus Biologicals; Cambridge, UK	5012012
PAK	β -Tubulin	<i>mouse, monoclonal</i>	1:200	Covance; Princeton, New Jersey, USA	E11CF0069
PAK	Peripherin	<i>rabbit, polyclonal</i>	1:400	Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, USA	NG1780586
PAK	<i>Myelin Basic Protein (MBP)</i>	<i>mouse, monoclonal</i>	1:1000	Covance; Princeton, New Jersey, USA	SMI-99P
PAK	<i>Myelin Basic Protein (MBP)</i>	<i>rabbit, polyclonal</i>	1:200	Dako; Glastrup, Dänemark	A0623
SAK	Alexa Fluor® 488 Absorption: 495 nm Emission: 519 nm	<i>donkey-anti- goat</i> IgG	1:500	Molecular Probes; Eugene, Oregon, USA	Aliquot von M. Knipper, Tübinger Hörforschungs zentrum; Tübingen
SAK	Alexa Fluor® 488 Absorption: 495 nm Emission: 519 nm	<i>donkey-anti- mouse</i> IgG	1:500	Molecular Probes; Eugene, Oregon, USA	898250

SAK	Alexa Fluor® 546 Absorption: 556 nm Emission: 573 nm	<i>donkey-anti-rabbit</i> IgG	1:1000	Life Technologies GmbH; Carlsbad, Kalifornien, USA	1218269
SAK	Cy3 Absorption: 550 nm Emission: 570 nm	<i>donkey-anti-rabbit</i> IgG	1:1500	Jackson Immuno Research; Newmarket, Suffolk, UK	94967
SAK	Cy3 Absorption: 550 nm Emission: 570 nm	<i>donkey-anti-goat</i> IgG	1:1500	abcam; Cambridge, UK	GR3149

3.1.4 Quantitative TaqMan® Real-Time Polymerasekettenreaktion

3.1.4.1 Isolation von mRNA

Tabelle 3.6: mRNA-Isolations-Kit.

Kit	Hersteller
PeqGOLD MicroSpin TotalRNA Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland

3.1.4.2 Transkription der mRNA in cDNA

Tabelle 3.7: Chemikalien für die cDNA-Transkription.

Chemikalie	Hersteller
SuperScript® III CellsDirect cDNA Synthesis Kit ¹	Invitrogen Limited; Carlsbad, Kalifornien, USA
Random Primer pdN6 (Random Hexamer Primers)	Applied Biosystem; Carlsbad, Kalifornien, USA
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	New England Biolabs; Ipswich, Massachusetts, USA

3.1.4.3 GAPDH-PCR

Tabelle 3.8: Chemikalien für die GAPDH-PCR.

Chemikalie	Hersteller
Primer: GAPDH <i>forward</i> 5'-TCTACTGGCGTCTTCACCACCA-3'	Biomers.net GmbH; Ulm, Deutschland
Primer: GAPDH <i>reverse</i> 5'-AGGAGACAACCTGGTCCTCAGT-3'	Biomers.net GmbH; Ulm, Deutschland
GoTaq® Green Master Mix	Promega; Fitchburg, Wisconsin, USA
LE Universalagarose	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland

¹ SuperScript® III reverse Transcriptase, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Oligo dT20 Primer, DNase I, DNase I Buffer, EDTA, dNTP mix, 5x FS Buffer, 0,1 M Dithiothreitol, RNase H, control RNA, control primers, resuspension Buffer, RNase-free water (Information gemäß Invitrogen, 2013: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/18080200>).

Tabelle 3.9: Zusammensetzung des TAE-Puffers (50-fach konzentriert).

Tris- {Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan} Acetat-EDTA-(Ethylendiamintetraessigsäure)-Puffer (TAE-Puffer)

Bestandteil	Menge	Hersteller
TRIS-Base	2 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure, 100 % p.a. Reinheit	9 M	VWR International GmbH; Radnor, Pennsylvania, USA
EDTA	50 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, Deutschland

3.1.5 Zellkultur

3.1.5.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.10: Chemikalien und Verbrauchsmaterial für Zellkultur.

Die Chemikalien sind mit verwendeter Menge in Volumenprozent, Hersteller und Firmensitz aufgeführt. Die Fußnoten geben die genaue Zusammensetzung der bereits fertig eingekauften Lösungen an.

Chemikalie	Verwendete Menge (Volumenprozent)	Firma
HBSS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei) ²		Invitrogen limited; Carlsbad, Kalifornien, USA
HBSS (inklusive Ca ²⁺ und Mg ²⁺) ³		Invitrogen limited; Carlsbad, Kalifornien, USA
Collagenase	0,10 %, gelöst in HBSS Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei	Sigma Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	0,10 %, gelöst in HBSS Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei	Sigma Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
DNase I (aus dem PeqGOLD MicroSpin TotalRNA Kit)	0,01 %	PeqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, Deutschland
FCS	10,00 %	Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien, USA
GlutaMAX™-I Supplement		Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien, USA
Neurobasal ®-Medium		Life Technologies GmbH; Carlsbad, Kalifornien, USA
Neurobasal ®-A Medium (1x) liquid		Life Technologies GmbH; Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin Streptomycin	0,10 %	Life Technologies GmbH; Carlsbad, Kalifornien, USA
Poly-D-Lysin	50 µg/ml	BD Bioscience; Franklin Lakes, New Jersey, USA

2 KCl (400 mg/l); KH₂PO₄ (60 mg/l); NaHCO₃ (350 mg/l); NaCl (8000 mg/l); Na₂HPO₄ (48 mg/l); D-Glucose (1000 mg/l) (Information gemäß Invitrogen, 2013: http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.153.html).

3 CaCl₂ (140 mg/l); MgCl₂ (100 mg/l); MgSO₄ (100 mg/l); KCl (400 mg/l); KH₂PO₄ (60 mg/l); NaHCO₃ (350 mg/l); NaCl (8000 mg/l); Na₂HPO₄ (48 mg/l); D-Glucose (1000 mg/l); Phenolrot (10 mg/l) (Information gemäß Invitrogen, 2013: http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.153.-html).

HEPES		Life Technologies GmbH; Carlsbad, Kalifornien, USA
B27 ® SerumFree Supplement ⁴		Fisher Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland
BioCoat Poly-D-Lysin/Laminin-Coverslips		BD Biosciences; Franklin Lakes, New Jersey, USA
FGF-Basic Recombinant Mouse Protein (FGF 2)	10 ng/ml	Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien, USA
GDNF recombinant	100 pg/ml	Sigma Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

4 Vitamine: Biotin, DL α -Tocopherol-Acetat, DL α -Tocopherol, Vitamin A
 Proteine: BSA, Katalase, humanes rekombinantes Insulin, humanes Transferrin, Superoxiddismutase
 andere: Corticosteron, D-Galactose, Ethanolamin HCl, reduziertes Glutatathion, L-Carnithin HCl, Linolsäure,
 Progesteron, Putrescin 2HCl, Natriumselenit, Trijodthyronin (T3)
 (Information gemäß Invitrogen, 2013: http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.250.html).

3.2 Methoden

3.2.1 Verwendete Präparatebezeichnungen

Als „akutes *whole mount*-Präparat“ werden im Folgenden die Präparate bezeichnet, bei denen die Spiralganglien-Neurone im Gewebeverband verblieben sind und die sofort nach der Präparation, „akut“, verwendet wurden. Demgegenüber werden als „kultivierte *whole mount*-Präparate“ die Präparate bezeichnet, die erst nach 24 bis 48 Stunden Kultivierungsdauer im Brutschrank untersucht wurden. Präparate, bei denen die Spiralganglien-Neurone vor der Kultivierung enzymatisch und mechanisch vereinzelt wurden, werden als „dissoziierte Präparate“ und die einzelnen Spiralganglien-Neurone als „dissoziierte Spiralganglien-Neurone“ bezeichnet.

3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Bei allen angefertigten Präparaten wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI zur Darstellung der Zellkerne vervollständigt. Dies wird bei der Beschreibung der Herstellung der einzelnen Immunfluoreszenzpräparate nicht mehr gesondert erwähnt.

3.2.2.1 Präparation und Aufbereitung der Spiralganglien-Neurone

Die 4 bis 6 Tage alte Maus (P4 bis P6) wurde dekapitiert. Fell und Schnauze wurden entfernt und der Kopf median-sagittal geteilt. Die Präparation erfolgte auf eisgekühlter B01-Lösung (3.1.3.2 Verwendete Lösungen), die in ihrer Ionenzusammensetzung an die Perilymphe der Cochlea angeglichen ist. Nach Entfernen von Groß- und Kleinhirn wurde ausgehend von der medialen Seite der Schädelhälfte die Cochlea aus dem sie umgebenden Gewebe entnommen. Im Anschluss wurde das knorpelige Labyrinth der Cochlea mit Pinzetten entfernt, ohne dabei das häutige Labyrinth zu verletzen. Danach folgte die Trennung von apikalem, medialem und basalem Anteil der Cochlea durch Schnitte senkrecht zur Achse des Modiolus. Die Teilstücke wurden auf die Haarzellseite gedreht und weiter präpariert, indem die laterale Wand mit der Stria vascularis, den Haarzellen und den anhaftenden Membranen entfernt wurde. Auch der zentral knorpelige Modiolus und ein Teil der zentralen Neurite der Spiralganglien-Neurone wurde entfernt. Danach wurde das Präparat als Ganzes für 5 Minuten in 2 % Paraformaldehyd (PFA, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung) fixiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde das Gewebe mit Cell-Tak™, einem Proteingemisch, das das Gewebe auf der Glasoberfläche hält, auf einen Objektträger aufgeklebt. Mit dem

ImmunoPen™ wurde eine Begrenzung um das Präparat gezeichnet, um den Färbereich einzugrenzen und ein Austrocknen des Gewebes durch Verlaufen des Puffers zu verhindern.

3.2.2.2 Färbeschritte

Alle Schritte wurden in einer dunklen und feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubation erfolgte auf einer Rüttelplatte (50 Schwingungen pro Minute). Zu Beginn wurden die fixierten Präparate für 10 Minuten in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte das Aufschließen der Zellen für 10 Minuten mit Permeabilisierungspuffer. Unspezifische Bindungsstellen wurden im nächsten dreißigminütigen Schritt durch bovines Serumalbumin (BSA) geblockt (Blockpuffer). Danach wurden die in Reaktionspuffer gelösten primären Antikörper (PAK) aufgebracht. Diese inkubierten für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran erfolgten 2 Waschschrte mit Waschpuffer, um nicht gebundene Antikörperreste auszuwaschen. Dann wurden die ebenfalls in Reaktionspuffer gelösten sekundären Antikörper (SAK) aufgebracht. Vor dem Aufbringen wurde die Antikörperlösung 3 Minuten bei 6000 g ($1\text{ g} = 9,81\text{ m/s}^2$) zentrifugiert, um Antikörperkonglomerate zu entfernen. Nicht gebundener sekundärer Antikörper wurde nach 70 Minuten Inkubationszeit mit Hilfe von 2 Waschschrten (jeweils 15 Minuten) entfernt. Um die Zellkerne zu markieren, wurde das Präparat im Anschluss daran mit 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Dazu wurde das mit PBS 1:333 verdünnte DAPI (finale Konzentration: 1,5 µg/ml) für 3 Minuten auf die Präparate gegeben. Als letztes folgten 3 Waschschrte mit PBS für jeweils 1 Minute (Methode nach Knirsch et al., 2007). Nach Entfernen des ImmunoPen™ mit Hilfe eines Wattestäbchens konnte das fertige Präparat mit Vectashield® und einem in 70 % Ethanol gereinigten Deckglas eingedeckelt werden. Abschließend wurden die Präparate bis zur Auswertung im Kühlschrank aufbewahrt, meist für 24 bis 48 Stunden.

3.2.2.3 Verwendete Antikörperkombinationen zur Immunfluoreszenzfärbung akuter *whole mount*-Präparate

Um die verschiedenen Zelltypen der Spiralganglien im akuten *whole mount*-Präparat zu unterscheiden wurden als primäre Antikörper zum Einen anti-β-Tubulin für Typ I Neurone (Barclay et al., 2010; Chen et al., 2011), zum Anderen anti-Peripherin für Typ II Neurone verwendet (Barclay et al., 2010; Hafidi et al., 1993; Reid et al., 2004). Die passenden sekundäre Antikörper waren Alexa Fluor® 488- und Cy3-gekoppelt. Zur Abgrenzung von neuronalen Zellen und Stützzellen, speziell Schwann-Zellen, die die Myelinhüllen um Spiralganglien-Neurone bilden, wurden 2 Antikörper gegen *Myelin Basic Protein* (MBP: 1. *rabbit, polyclonal*; Dako, 2. *mouse*,

monoclonal; Covance) verwendet. Als sekundäre Antikörper dienten 1. ein Cy3-gekoppelter anti-*rabbit* IgG-Antikörper und 2. ein Alexa Fluor® 488-gekoppelter anti-*mouse* IgG-Antikörper. Als weitere primäre Antikörper wurden zusammen mit dem ersten anti-MBP-Antikörper (Dako) anti- β -Tubulin verwendet. Dazu wurde ein sekundärer, Alexa Fluor® 488-gekoppelter und gegen *mouse* gerichteter, IgG-Antikörper gewählt. Der zweite anti-MBP-Antikörper (Covance) wurde mit anti-Peripherin kombiniert. In dieser Immunfluoreszenzfärbung diente ein Cy3-gekoppelter und gegen *rabbit* gerichteter IgG-Antikörper als sekundärer Antikörper zu anti-Peripherin.

3.2.2.4 Verwendete Antikörperkombinationen zur Immunfluoreszenzfärbung bei der Frage nach der Expression der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheiten

Es wurden 2 Antikörper gegen die $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle (1. *goat, polyclonal*; Santa Cruz und 2. *rabbit, polyclonal*; Novus Biologicals) auf ihr Färbeverhalten und ihre Spezifität hin getestet. Die sekundären Antikörper waren beide Male Cy3-gekoppelt. Zur Identifizierung von Spiralganglien-Neuronen wurde das Gewebe mit anti- β -Tubulin gefärbt. Der dazu passende sekundäre Antikörper war Alexa Fluor® 488-gekoppelt. Diese Antikörperkombinationen wurden zunächst bei NMRI-Mäusen an P7 und anschließend, im Falle eines spezifischen Färbeergebnisses, bei den $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen, sowohl bei den homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen als auch bei heterozygoten Tieren im selben Alter (P7) getestet. Mit dem anti-Cacna2d3-Antikörper (S-14; Santa Cruz) wurde noch eine weitere Immunfluoreszenzfärbung, zusammen mit anti-Peripherin durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurden verwendet: ein Alexa Fluor® 546-gekoppelter anti-*rabbit* IgG-Antikörper, der an den anti-Peripherin-Antikörper bindet und ein Alexa Fluor® 488-gekoppelter anti-*goat* IgG-Antikörper. Der letztgenannte sekundäre Antikörper bindet an den anti-Cacna2d3-Antikörper.

3.2.2.5 Live-Aufnahmen bei TYF-Mäusen

Die Spiralganglien der verschiedenen TYF-Linien wurden wie zuvor beschrieben (3.2.2.1 Präparation und Aufbereitung der Spiralganglien-Neurone) akut als *whole mount*-Präparat verwendet. Dabei wurden nur Tiere verwendet, die mindestens ein Transgen TYF trugen. Das Präparat wurde mit B01-Lösung superfundiert und Fluoreszenz wurde bei Anregung mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm detektiert. Bei der Sublinie, die außerdem einen blauen Fluoreszenzfarbstoff in Gliazellen exprimiert, wurde zusätzlich ein Laser der Wellenlänge 405 nm zur Anregung verwendet. Das Alter der verwendeten Mäuse variierte von neonatalen (P4-P7) zu adulten mehrere Wochen alten Tieren.

3.2.2.6 Auswertung

Die Auswertung erfolgte am LSM 700 Konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit Zen-Software. Es wurden verschiedene Objektive genutzt: (i) Plan Achromat 20x/0,8 für Übersichtsaufnahmen; (ii) Plan Achromat 63x/1,4 Oil DIC für Detailaufnahmen und (iii) W Plan Achromat 40x/1,0 DIC VIS-IR für die live-Aufnahmen an den TYF-Mäusen. Mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen standen zur Anregung zur Verfügung: (i) 488 nm (verwendet zur Anregung von Alexa Fluor® 488), (ii) 555 nm (verwendet zur Anregung von Cy3 und Alexa Fluor® 546) und (iii) 405 nm (verwendet zur Anregung von DAPI).

3.2.3 Quantitative TaqMan® Real-Time Polymerasekettenreaktion

3.2.3.1 Präparation und Entnahme der Spiralganglien

Es wurden jeweils beide Ohren von je 2 Mäusen mit den Genotypen $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ und $\alpha_2\delta_3^{+/-}$ (Kontrolle) verwendet. Die Präparation der 5 bis 7 Tage alten Mäuse (P5-P7) erfolgte grundsätzlich wie in „3.2.2.1 Präparation und Aufbereitung der Spiralganglien-Neurone“ beschrieben. Um die Tonotopie zu erhalten, wurde die Cochlea in 2 Stücke (apikal/medial sowie basal/midbasal) geteilt. Mit Pinzette und Löffel wurden die Spiralganglien als *whole mount*-Präparat in ein Kryo-Röhrchen überführt. Dabei wurden die Gewebestücke gemäß ihrer Zugehörigkeit zu apikal/medialen und basal/midbasalen Anteil der Cochlea gepoolt. Mit dieser Methode war keine Zelltypen-spezifische Isolation allein der Spiralganglien-Neurone möglich. In den Proben waren weiterhin Stützzellen, wie beispielsweise Fibroblasten und Schwann-Zellen enthalten. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch (maximal 2 Wochen) bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.3.2 mRNA-Isolation aus Spiralganglien

Die mRNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit nach dem mitgelieferten Protokoll mit zusätzlichem DNA-Verdau. Zunächst wurden die Zellen der Spiralganglien (SG) mechanisch durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Durch anschließende Zugabe von Lysat-Puffer wurden die Zellen homogenisiert und lysiert. Freie DNA wurde nach Überführung der Proben im DNA Removing-Column durch Waschen mit 70 % Ethanol und anschließender einminütiger Zentrifugation (10.000 g) entfernt. Das dabei entstandene DNA-freie Filtrat wurde als nächstes in PerfectBind MS RNA Columns auf Collection Tubes überführt, die mRNA binden können. Nach erneuter Zentrifugation (1 Minute, 10.000 g) wurde der mRNA-freie Durchfluss verworfen. Es folgten 2 Waschschrte zur weiteren Aufreinigung der gebundenen mRNA. Dazu wurden jeweils RNA-Wash Buffer I und II über die PerfectBind MS RNA-Columns gegeben und anschließend zentrifugiert (1 Minute, 10.000 g). Der Durchfluss wurde beide Male verworfen. Zwischen den beiden Waschschrten erfolgte zur weiteren Reinigung der mRNA ein fünfzehnminütiger DNA-Verdau durch DNase I bei Raumtemperatur. Im Anschluss an den letzten Waschschrte erfolgte das Trocknen der zuvor aufgereinigten mRNA durch zweiminütige Zentrifugation (10.000 g). Als Letztes wurde die mRNA aus dem PerfectBind MS RNA Column in ein Eppendorf-Röhrchen eluiert, indem RNase-freies Wasser über die Probe pipettiert wurde. Anschließend wurde noch einmal

zentrifugiert (1 Minute, 10.000 g). Das Eppendorf-Röhrchen wurde mit der enthaltenen SG-mRNA bei -70 °C für 1 Tag bis zur cDNA-Transkription gelagert.

3.2.3.3 cDNA-Transkription aus isolierter mRNA von Spiralganglien

Zur Umschreibung von SG-mRNA in dazu komplementäre DNA (cDNA) wurden 10 µl der isolierten SG-mRNA mit jeweils 0,5 µl Oligo dT20 Primer [50 mM] und Random Primer pdN6 sowie 1 µl dNTPs [10 mM] in Eppendorf-Gefäße pipettiert und nach fünfminütiger Inkubation bei 65 °C, die zum Aufschmelzen der mRNA-Sekundärstruktur dient, auf Eis gekühlt. Dabei bindet der Oligo dT20 Primer an den Poly(A)-Schwanz der mRNA, während der Random Primer pdN6 an verschiedenen Abschnitten der mRNA binden kann und dort als Startpunkt der cDNA-Transkription dient. Anschließend wurden 4 µl 5X FS Buffer, 2 µl Dithiothreitol [100 mM] zur Auflösung der mRNA-Sekundärstruktur, 1 µl RNaseOUT™ als RNase Inhibitor und zum Schluss 1 µl SuperScript® III reverse Transkriptase dazu pipettiert. Das finale Probenvolumen betrug 20 µl. Die Reagenz wurde zunächst bei 50 °C für 150 Minuten zur cDNA-Transkription durch SuperScript® III reverse Transkriptase und anschließend 30 Minuten bei 70 °C zur Inaktivierung der Reaktion inkubiert (Methode nach Baig et al., 2011). Die so aus der zuvor isolierten mRNA umgeschriebene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.3.4 Verifizierung der Umschreibung

Um die Umschreibung zu verifizieren wurde eine PCR auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die in den Zellen als *housekeeping*-Gen exprimiert wird, durchgeführt. Dazu wurden Exon-überspannende Primer (GAPDH *forward* und *reverse*) verwendet. Zusammenfassend wurde eine Reaktion mit der cDNA, den beiden Primern GAPDH *forward* und *reverse*, doppelt destilliertem Wasser und dem GoTaq® Green Master Mix angesetzt. Nach 35 Zyklen in der PCR-Maschine wurde die so gezielt vervielfältigte cDNA mit Gelelektrophorese auf einen Agarosegel in TAE-Puffer aufgetrennt. Die GAPDH-Bande lag bei 558 Basenpaaren (558 bp; Methode nach Kuhn et al., 2009).

3.2.3.5 Quantitative TaqMan® Real-Time Polymerasekettenreaktion

Der Vorteil der quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) gegenüber der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion ist, dass Nukleinsäuren während ihrer Vervielfältigung in Echtzeit quantifiziert werden können. In diesem Fall wurde die Quantifizierung durch Verwendung eines TaqMan® Gen-Expressions Assays (Applied Biosystems; Foster City, Kalifornien, USA;

Tabelle 3.11; Information gemäß Applied Biosystems, 2013: http://bioinfo.invitrogen.com/genome-database/browse/gene-expression/keyword/Mm00486607_m1?ICID=search-gex-Mm00486607_m1; http://bioinfo.invitrogen.com/genome-database/browse/gene-expression/keyword/Mm00457825_m1?ICID=search-gex-Mm00457825_m1; http://bioinfo.invitrogen.com/genome-database/browse/gene-expression/keyword/Mm00486613_m1?ICID=search-gex-Mm00486613_m1) ermöglicht. Die Assays bestehen unter anderem aus 2 Primern (*forward* und *reverse*), einer TaqPolymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität und einer TaqMan®-Sonde, die 2 Anteile besitzt: 1. einen Reporterfluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und 2. einen Quencher am 3'-Ende. Sie bindet spezifisch an eine Nucleotidsequenz zwischen dem *forward* und dem *reverse* Primer. Dabei unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporterfluoreszenzfarbstoffs, solange beide Komponenten verbunden sind (Abbildung 3.1). Wird während des Elongationsvorgangs der Reporter durch die verwendete Taq-Polymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität abgespalten, kann der Quencher die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr unterdrücken und letztere nimmt proportional zur Menge an PCR-Produkt zu (Holzapfel und Wickert, 2007; Schlick, 2009). Dabei bezeichnet der C_T -Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert) die Zyklenzahl der PCR, bei der das Fluoreszenzsignal des Reporters erstmals das Hintergrundrauschen der Fluoreszenz übersteigt. Der C_T -Wert ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge in der Probe. Somit haben Proben mit geringer Kopienzahl hohe C_T -Werte.

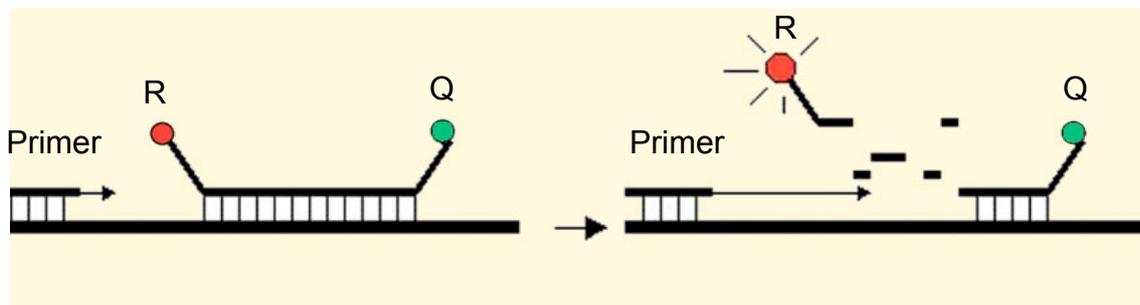


Abbildung 3.1: Prinzip der Fluoreszenzdetektion mit TaqMan®-Sonden.

Bei intakter Sonde unterdrückt der Quencher (Q) das Fluoreszenzsignal des Reporters (R). Die TaqMan®-Sonde hybridisiert mit dem komplementären DNA-Strang und wird während des Elongationsvorgangs von der Taq-Polymerase durch deren 5'-3'-Exonukleaseaktivität so abgebaut, dass der Reporter frei wird und fluoresziert (modifiziert nach Holzapfel und Wickert, 2007).

Damit die Expression eines spezifischen Gens in der Probe absolut bestimmt werden kann, müssen die Werte aus der qRT-PCR mit mitgeführten Standards des Zielgens verglichen werden. Diese Standards sind logarithmisch unterschiedlich stark verdünnt und haben dadurch bekannte

Transkriptkonzentrationen. Bei in der Zelle sehr schwach exprimierten Zielgenen erfolgt eine relative Quantifizierung im Vergleich zu Referenzgenen (beispielsweise Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase 1, HPRT 1, ein sogenanntes „housekeeping-Gen“). In diesem Zusammenhang spricht man vom „Normalisieren“ der Daten.

Die in dieser Arbeit durchgeführte TaqMan® qRT-PCR erfolgte nach der Isolation und Umschreibung der SG-mRNA in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Gerald Obermair, Sektion für Physiologie, Medizinische Universität Innsbruck in Innsbruck, Österreich. Dazu wurden Proben der SG-cDNA auf Trockeneis nach Innsbruck geschickt. Es wurden TaqMan® Gen-Expressions Assays für die neuronalen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten 1 bis 3 verwendet, um die relative Häufigkeit ihrer Transkripte beurteilen zu können. Die Amplifikationslänge für $\alpha_2\delta 1$ bis 3 variierte zwischen 84 und 109 Basenpaaren (Schlick et al., 2010). Zum Normalisieren der Daten wurden die housekeeping-Gene HPRT 1 (Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase 1) und SDHA (Succinat-dehydrogenase, Untereinheit A) verwendet (Schlick et al., 2010). Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (zweifaktorielle ANOVA) mit Holm-Sidak-Korrektur für multiple Vergleiche. Der p-Wert wurde auf $p < 0,05$ gesetzt.

Tabelle 3.11: TaqMan® Gen-Expressions Assays.

Es sind Assay-ID, Länge des Amplifikats und die zugehörigen Exongrenzen für die $\alpha_2\delta 1$ bis 3-Untereinheiten aufgeführt (Schlick, 2009; Schlick et al., 2010).

	Assay-ID	Länge des Amplifikats	Exongrenze
$\alpha_2\delta 1$	Mm00486607_m1	100 bp	33/34
$\alpha_2\delta 2$	Mm00457825_m1	84 bp	1/2
$\alpha_2\delta 3$	Mm00486613_m1	109 bp	5/6

3.2.4 Zellkultur

Zur Verhinderung der Kontamination der Kulturen wurde nach den europäischen GMP-Richtlinien gearbeitet, das heißt es wurden Handschuhe, Haarnetz und Mundschutz getragen und unter sterilen Werkbänken gearbeitet. Letzere wurden am Morgen einer geplanten Kultur erst mit destilliertem Wasser, dann mit Ethanol ausgewischt und mit UV-Licht bestrahlt. Dieser Vorgang wurde nach den Arbeiten wiederholt.

3.2.4.1 Beschichten der Deckgläser

Es wurden 2 verschiedene Beschichtungen verwendet: Zum Einen Poly-D-Lysin, ein synthetisches Molekül, das als dünne Beschichtung auf Glasoberflächen die Haftung von Zellen ermöglicht (Information gemäß BD Biosciences, 2013: http://wwwbdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/354210_pug.pdf). Zum Anderen Laminin, ein kollagen-ähnliches Glycoprotein, das Bestandteil der extrazellulären Matrix ist und ebenfalls das Anhaften von Zellen auf Glasoberflächen ermöglicht (Schmitz, 2009). Dabei wurden die mit Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Deckgläser fertig eingekauft, während die anderen vor Ort mit Poly-D-Lysin beschichtet wurden. Dazu wurden Deckgläser mit einem Durchmesser von 15 mm für etwa 1 Stunde in 70 % Ethanol gereinigt. Anschließend wurden sie dreimal mit dem Bunsenbrenner abgeflammt und in sterile Petrischalen gelegt, wo sie mit 100 µl Poly-D-Lysin [50 µg/ml] beschichtet wurden und für 1 Stunde unter UV-Licht inkubierten. Nach zweimaligem Spülen mit sterilem Aqua dest. wurden die so beschichteten Deckgläser in den verschlossenen Petrischalen bei 4 °C im Kühlschrank für bis zu 14 Tage aufbewahrt. Wenn bereits fertige mit Poly-D-Lysin/Laminin beschichtete Deckgläser genutzt wurden, waren diese unmittelbar vor Gebrauch in sterile Petrischalen gelegt worden.

3.2.4.2 Präparation der Spiralganglien-Neurone für dissoziierte Zellkultur und *whole mount*-Kultur

Zunächst wurde das Präparationsbesteck mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Präparation der Spiralganglien-Neurone erfolgte nach dem Dekapitieren der Tiere unter der sterilen Werkbank in steril filtrierter, eisgekühlter B01-Lösung. Die wie in „3.2.2.1 Präparation und Aufbereitung der Spiralganglien-Neurone“ präparierten Spiralganglien-Neurone wurden bei einer geplanten Verwendung zur dissoziierten Kultur bis zum Enzymverdau in eisgekühlter, steriler HBSS-Lösung (inklusive Ca²⁺ und Mg²⁺) gesammelt (Hegarty et al., 1997; Liu et al., 2008). Zur

Kultivierung als *whole mount*-Präparat wurden die Gewebestücke in eisgekühlter B01-Lösung gesammelt.

3.2.4.3 Herstellung des Kulturmediums

Das Kulturmedium ist speziell auf die Bedürfnisse (neonataler) neuronaler Zellen angepasst (Brewer et al., 1993; zur Übersicht siehe Konur und Ghosh, 2005; Vieira et al., 2007). Es wurde 1 Tag (mindestens 14 bis 16 Stunden) vor geplanter Kultur aus den Komponenten: Neurobasal®-A Medium (95 %), B27® SerumFree supplement (2 %), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 0,2 %), GlutaMAX™-I Supplement (2 %) und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (PenStrep, 0,2 %) hergestellt. Das Medium wurde bis zum Gebrauch geöffnet im Brutschrank gelagert, damit CO₂ in die Lösung diffundieren konnte und Bicarbonat entstand. Letzteres dient im Medium als Puffer, wodurch sich der pH-Wert von pH 7,82 unmittelbar nach dem Ansetzen hin zu physiologischeren Werten um pH 7,28 nach der Inkubation im Brutschrank änderte.

Neurobasal®-A bildet die Grundlage des Mediums und ist serumfrei. Das enthaltene Phenolrot dient als Indikator für den pH-Wert des Mediums (Information gemäß Invitrogen, 2013: http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.251.-html). L-Glutamin wurde in stabiler Form als GlutaMAX™-I Supplement, einer 200 mM Lösung des Dipeptids L-Alanyl-L-Glutamin in 0,85 % NaCl, zugeführt. GlutaMAX™-I Supplement verhindert über seine vergleichsweise hohe Stabilität die Bildung von zelltoxischen Ammonium-Ionen durch Zerfall von Glutamin in dem Kulturmedium. Des Weiteren ist es über einen weiten Temperaturbereich stabil und verbessert Zellüberleben und -wachstum (Balazs, 2006; Information gemäß Invitrogen, 2013: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/35050061>). Über den Zusatz von B27®, einer ebenfalls serumfreien Lösung, wurden die Bedingungen für das neuronale Überleben verbessert. So sind in B27® beispielsweise Vitamin A, verschiedene Antioxidantien und Insulin als endogener Wachstumsfaktor enthalten (Information gemäß Invitrogen, 2013: http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.250.-html). Die beiden Antibiotika Penicillin (aus der Gruppe der Betalactam-Antibiotika) und Streptomycin (aus der Gruppe der Aminoglycoside) verhindern die bakterielle Besiedlung des Mediums (Lüllmann et al., 2010). HEPES diente als zusätzlicher Puffer (Information gemäß Life Technologies, 2013: <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/-Products-and-Services/-Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/reagents/hepes.html>).

3.2.4.4 Kultur von *whole mount*-Präparaten

Die in steriler eisgekühlter B01-Lösung gesammelten *whole mount*-Präparate wurden mit Cell-Tak™ auf ein mit Poly-D-Lysin beschichtetes Deckglas aufgeklebt, mit 2 ml Kulturmedium bedeckt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die *whole mount*-Präparate verblieben ohne Medienwechsel für 24 bis 48 Stunden in Kultur.

3.2.4.5 Enzymatische und mechanische Vereinzelung der Spiralganglien-Neurone

Die in eisgekühlter, steril filtrierter HBSS-Lösung (inklusive Ca²⁺ und Mg²⁺) gesammelten Spiralganglien-Neurone wurden in einen Enzymmix, bestehend aus 388 µl HBSS-Lösung (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei) und den Enzymen Collagenase (4 µl), Trypsin (4 µl, 10 %) und DNase I (4 µl) überführt. Collagenase und Trypsin lockern den Zellverband um die Spiralganglien-Neurone, während die DNase I aus geschädigten Zellen frei gewordene DNA verdaut. Der Enzymmix wurde mit den enthaltenen Zellen für 25 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Dabei wurde das Gefäß alle 5 Minuten (insgesamt viermal) invertiert. Um die enzymatische Tätigkeit zu stoppen wurde im Anschluss 10 % fetales Kälberserum zugesetzt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgten 3 Waschschriffe mit jeweils 750 µl Kulturmedium. Die Flüssigkeit des letzten Waschschriffes verblieb auf den Zellen (etwa 400 µl). Durch vorsichtige mehrfache Trituration (etwa 15 bis 20 mal) mit einer angeschmolzenen blauen Pipettenspitze erfolgte der mechanische Aufschluss des Gewebes (Hegarty et al., 1997; Lv et al., 2010; Wei et al., 2007).

3.2.4.6 Ausplattieren der Spiralganglien-Neurone und Kultivierungsbedingungen

Die enzymatisch und mechanisch vereinzeltten Spiralganglien-Neurone wurden mit einer Pipette auf mit Poly-D-Lysin (Durchmesser 15 mm) oder Poly-D-Lysin/Laminin (Durchmesser 12 mm) beschichtete Deckgläser verteilt. Dabei wurden jeweils etwa 100 µl auf ein Deckglas aufgebracht. Das Verhältnis zwischen präparierter Cochlea und Deckgläsern betrug 1 (in der Regel wurden 4 Cochleae auf 4 Deckgläser ausplattiert, wobei auf jedem Deckglas Zellen aus jeder Cochlea vorhanden waren). Anschließend wurden die Deckgläser in verschlossenen Petrischalen für 2 Stunden im Brutschrank zum Sedimentieren und Adhären der Spiralganglien-Neurone gelagert. Danach wurden vorsichtig 2 ml Kulturmedium hinzupipettiert. Die Spiralganglien-Neurone verblieben über Nacht bis maximal 48 Stunden in Kultur, bevor eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt wurde.

3.2.4.7 Immunfluoreszenzfärbung an vereinzelt kultivierten Spiralganglien-Neuronen

Zur Untersuchung der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Kultur wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Im Unterschied zum unter „3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung“ erläuterten Protokoll fand lediglich vor dem Fixieren der Zellen auf dem Deckglas ein zehnminütiger Waschschriff mit PBS statt. Als primärer Antikörper diente anti- β -Tubulin zur Identifizierung der Spiralganglien-Neurone. Als sekundärer Antikörper wurde ein Alexa Fluor® 488-gekoppelter gegen *mouse* gerichteter IgG-Antikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte am LSM 700 Konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit Zen-Software.

3.2.4.8 Qualitätskontrolle der dissoziierten Primärkultur von Spiralganglien-Neuronen

Die Qualität der dissoziierten Primärkultur wurde daran gemessen, wie viele Spiralganglien-Neurone pro Deckglas vorhanden waren. Dazu wurden unter der Vergrößerung mit dem Plan Achromat 20x/0,8 Objektiv jeweils die Spiralganglien-Neurone auf einem horizontalen und vertikalen Balken ausgezählt. Die Höhe dieser Balken entsprach dem Gesichtsfeld (1,4 mm). Dabei wurden nur vereinzelt Spiralganglien-Neurone mit deutlichem anti- β -Tubulin-Signal gezählt. Ausgehend von diesen Zählwerten wurde ausgerechnet, wie viele Spiralganglien-Neurone auf einem Deckglas erwartet werden können. Aufgrund der verwendeten Zählmethode wurden zentral auf dem Deckglas, dort wo sich der horizontale und der vertikale Balken überkreuzten, einige Spiralganglien-Neurone doppelt gezählt. Der dadurch entstandene Fehler (3,8 % der Deckglasfläche bei Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern und 4,2 % der Deckglasfläche bei Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Deckgläsern) wurde im Folgenden aufgrund seiner geringen Größe vernachlässigt.

3.2.4.9 Etablierung der Zellkulturversuche zur Verbesserung des Überlebens der Spiralganglien-Neurone

Mit dem Ziel, das Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Kultur zu verbessern wurde zunächst untersucht, welche Deckglasbeschichtung besser geeignet ist. Dazu wurden Tests an 3 voneinander unabhängigen dissoziierten Kulturen durchgeführt. Die Cochleae von 5 bis 6 Tage alten NMRI-Mäusen wurden im Verhältnis 1 zu 1 auf Deckgläser ausplattiert (4 Cochleae auf 4 Deckgläser pro Kulturansatz). Die eine Hälfte der Deckgläser war mit Poly-D-Lysin beschichtet, die andere mit Poly-D-Lysin/Laminin (Vieira et al., 2007; Wei et al., 2007). Nach Kultivierung über Nacht erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung (3.2.4.7 Immunfluoreszenzfärbung an vereinzelt kultivierten Spiralganglien-Neuronen). Anschließend wurde die Anzahl der Spiralganglien-Neurone

pro Deckglas bei alleiniger Poly-D-Lysin-Beschichtung mit der Anzahl der Spiralganglien-Neurone pro Deckglas bei kombinierter Poly-D-Lysin-/Laminin-Beschichtung verglichen.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Anzahl der überlebenden Spiralganglien-Neurone untersucht. Dazu wurden Tests an 3 voneinander unabhängigen dissoziierten Kulturen durchgeführt. Die Cochleae von 5 Tage alten NMRI-Mäusen wurden im Verhältnis 1 zu 1 auf Poly-D-Lysin/Laminin beschichtete Deckgläser ausplattiert (in der Regel 4 Cochleae auf 4 Deckgläser pro Kulturansatz) und in sterile Petrischalen gelegt. Im Folgenden wurden die Petrischalen aufgeteilt. Das Kulturmedium für die Hälfte der Ansätze wurde mit Wachstumsfaktoren versetzt. Dazu wurden 100 pg/ml *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) und 10 ng/ml *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF 2) (Wei et al., 2007) verwendet. Das Kulturmedium für die Kontrolle erhielt keine Zusätze. Nach Kultivierung über Nacht erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung (3.2.4.7 Immunfluoreszenzfärbung an vereinzelt kultivierten Spiralganglien-Neuronen). Danach wurde die Anzahl der Spiralganglien-Neurone pro Deckglas bei Zugabe der genannten Wachstumsfaktoren mit der Anzahl der Spiralganglien-Neurone pro Deckglas ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren nach maximal 24 Stunden in Kultur verglichen. In einem weiteren gleich aufgebauten Versuch wurde die Anzahl der Spiralganglien-Neurone pro Deckglas bei Zugabe von 100 pg/ml GDNF und 10 ng/ml FGF 2 mit der Anzahl der Spiralganglien-Neurone pro Deckglas ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren nach maximal 48 Stunden in Kultur verglichen.

3.2.4.10 Statistische Auswertung

Mithilfe der Software Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachusetts, USA) erfolgte die statistische Auswertung: Die Daten wurden auf ihre statistische Signifikanz mit einem einseitigen Mann-Whitney-U-Test mit einem p-Wert $< 0,05$ überprüft. Alle in der Arbeit gezeigten Säulendiagramme sind ebenfalls mit Origin Pro 8.5 erstellt.

4 Ergebnisse

Zu Beginn des Projekts stand die Charakterisierung der Spiralganglien-Neurone über Immunfluoreszenzfärbung im Vordergrund: Einerseits, um Aussagen über die Morphologie der neuronalen Zellen und ihre Anordnung im Zellverband zu erhalten und andererseits, um die beiden Typen von Spiralganglien-Neuronen zu unterscheiden. Diese Unterscheidung war aufgrund zu geringer Auflösung weder mit dem Stereomikroskop (Olympus Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland) noch mit Hilfe des Zellkulturmikroskopes (Mikroskop Primo Vert; Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, Deutschland) möglich. Nachdem weitere Kenntnisse über die Eigenschaften der Spiralganglien-Neurone erlangt worden waren, sei es im Rahmen von weiteren Immunfluoreszenzversuchen oder von quantitativen TaqMan® Real-Time Polymerasekettenreaktionen, erfolgte die Etablierung eines Protokolls für die dissoziierte Primärkultur von Spiralganglien-Neuronen.

4.1 Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen der Spiralganglien im Gewebeverband

Den quantitativ größten Anteil der Spiralganglien-Neurone im akuten *whole mount*-Präparat bildeten bipolare β -Tubulin-positive Typ I Spiralganglien-Neurone, die ebenfalls β -Tubulin-positive Neurite zeigten (Abbildung 4.1). Demgegenüber war lediglich ein kleiner Anteil der Spiralganglien-Neurone mit anti-Peripherin gefärbt und zeigte sowohl an den Somata als auch an den Neuriten ein positives Signal. Aufgrund dieser Eigenschaften konnten sie als Typ II Neurone identifiziert werden. Beide Typen von Spiralganglien-Neuronen lagen im akuten *whole mount*-Präparat in einem breiten Streifen zirkulär um den etwa 250 bis 400 μm entfernten Modiolus. Dabei lagen die Somata der Typ II Neurone eher in Richtung auf die Haarzellen, das heißt von der zentralen Achse des Modiolus abgewandt. Der Hauptteil der markierten Spiralganglien-Neurone im akuten *whole mount*-Präparat waren Typ I Neurone. Ihre Anzahl übertraf die der Typ II Neurone um etwa das Zwanzigfache. Einige Spiralganglien-Neurone zeigten schwache Immunreaktivität sowohl für anti- β -Tubulin als auch für anti-Peripherin. Demgegenüber zeigten einige stark mit anti-Peripherin gefärbte Neurone keine anti- β -Tubulin-Immunreaktivität. Im Vergleich zu den Typ I Neuronen schienen die Typ II Neurone weniger β -Tubulin zu enthalten. Zusammenfassend waren die Peripherin-positiven Neurone in allen durchgeführten Färbungen schwächer oder gar nicht mit anti- β -Tubulin gefärbt.

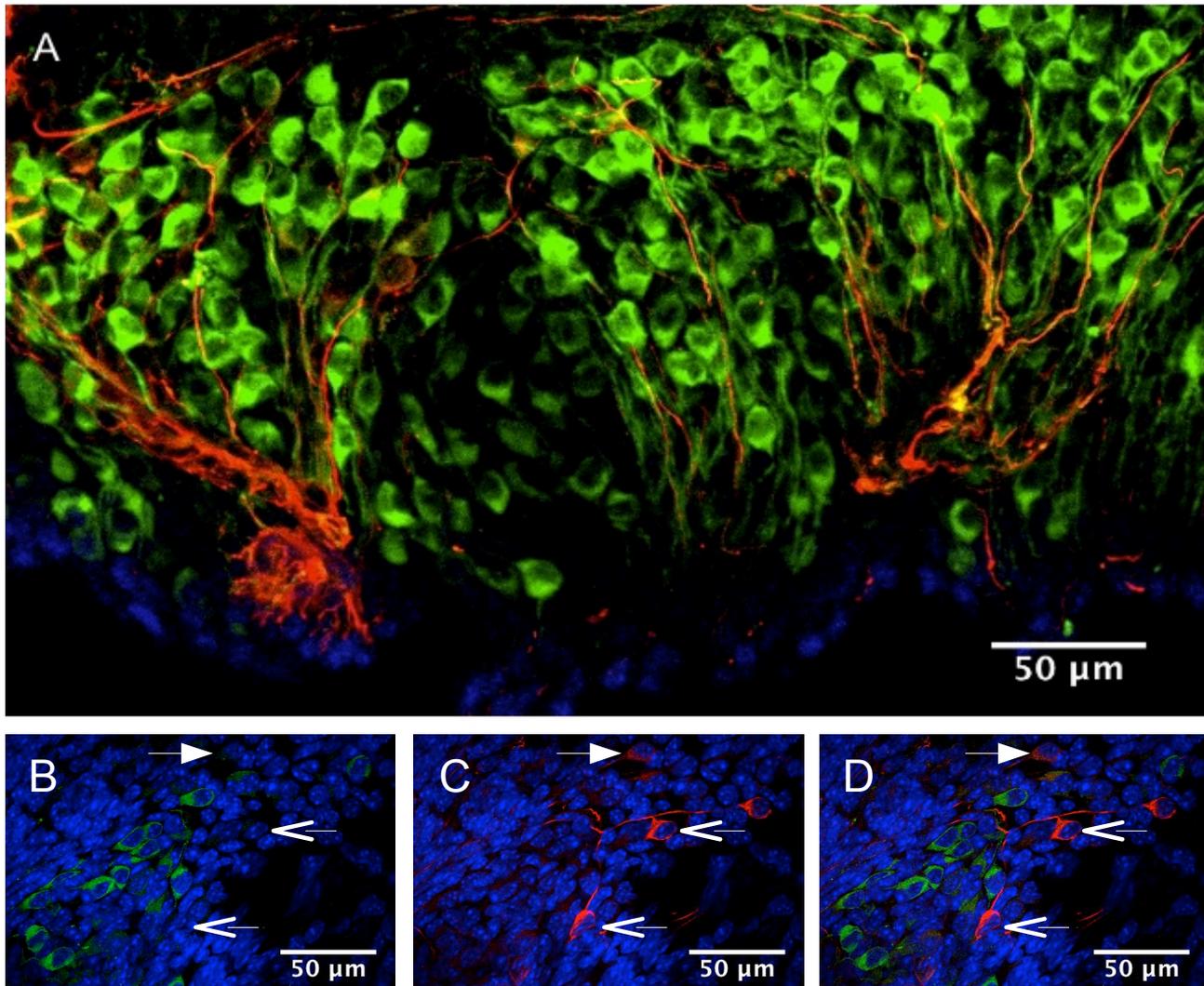


Abbildung 4.1: Spiralganglien-Neurone vom Typ I und II der neonatalen Maus.

SG-Neurone einer neonatalen NMRI-Maus an P5 in einer akuten whole mount-Präparation. Anti- β -Tubulin (grün) färbte überwiegend bipolare Somata und Neurite. Anti-Peripherin (rot) färbte einen kleinen Anteil der Neurone und Neurite. Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. **A**, Übersicht. Es sind vor allem Neurite der Typ I und II Neuronen, sowie einige β -Tubulin-positive Neurone sichtbar. **B** bis **D**, stärkere Vergrößerung in einer tieferen Fokusebene. **B**, anti- β -Tubulin-Signal. **C**, anti-Peripherin-Signal. **D**, Überlagerungsbild aus **B** und **C**. Ausgefüllte Pfeile: schwach anti-Peripherin- und anti- β -Tubulin-positive Neurone. Linienpfeile: anti-Peripherin-positive und anti- β -Tubulin-negative Neurone. Das Verhältnis von Typ I zu Typ II Neuronen betrug etwa 20:1.

In einer nachfolgenden Versuchsreihe wurde getestet, ob die Darstellung von Schwann-Zellen, die im peripheren Nervensystem die Myelinhüllen um Neurone bilden, im neonatalen Spiralganglien-Präparat möglich ist. Einer der verwendeten anti-MBP-Antikörper (Covance) zeigte ein spezifisches Färbeergebnis (Abbildung 4.2).

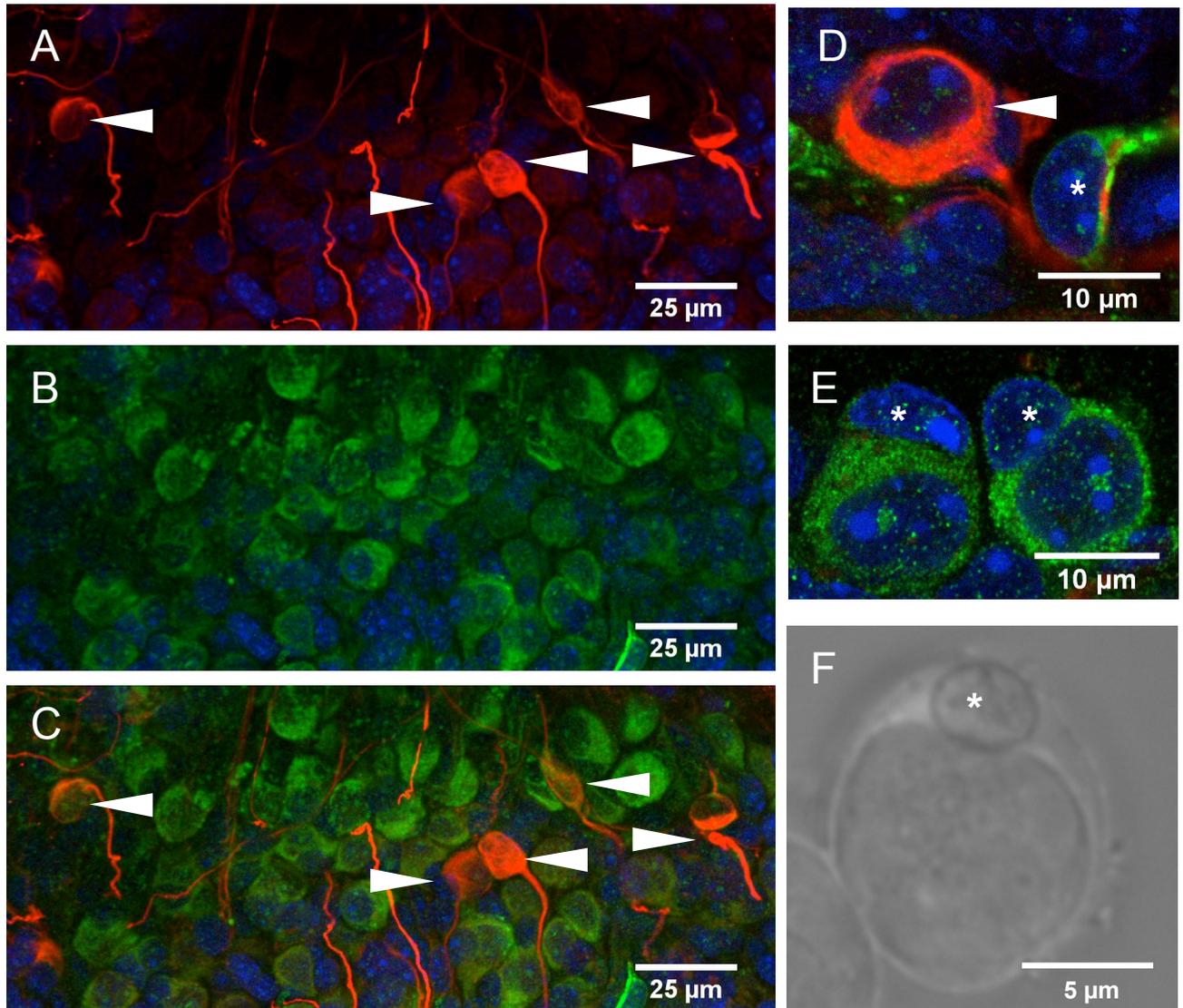


Abbildung 4.2: Myelinisierung der Spiralganglien-Neurone.

Myelinisierung der SG-Neurone einer neonatalen NMRI-Maus an P4 in einer akuten whole mount-Präparation. Anti-Peripherin (rot) färbte Typ II Neurone. Anti-MBP (grün) markierte Myelin, also vor allem die Myelinhüllen der Typ I Neurone. Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. **A**, roter Kanal. Einige Typ II Neurone und deren Fasern. **B**, grüner Kanal. MBP-Immunreaktivität an den Somata und wenigen Neuriten der Typ I Neurone. **C**, Überlagerungsbild aus **A** und **B**, kein anti-MBP-Signal an den Somata und Neuriten der Typ II Neurone (Pfeilspitzen). **D** und **E**, stärkere Vergrößerung in einer anderen Fokusebene. **D**, Peripherin-positives (rot), unmyelinisiertes Typ II Neuron. **E**, Peripherin-negatives, myelinisiertes (grün) Typ II Neuron. Die Somata der Schwann-Zellen sitzen den myelinisierten Somata der Typ I Neurone auf und sind an ihren kleinen länglich-deformierten Zellkernen zu erkennen (Sterne). **F**, myelinisiertes SG-Neuron einer NMRI-Maus an P6 in vitro im differentiellen Interferenzkontrast. Die akut isolierten und mit B01-Lösung superfundierten SG-Neurone wurden aufgrund ihrer Morphologie am Durchlichtmikroskop identifiziert (Aufnahme **F** wurde freundlicherweise von Dr. T. Eckrich zur Verfügung gestellt).

Während um die anti-Peripherin-gefärbten Typ II Neurone kein anti-MBP-Signal zu detektieren war (Abbildung 4.2; Bilder **A**, **C** und **D**), zeigten die umliegenden Zellen eine deutliche Anreicherung des Signals. Aufgrund des Fehlens einer anti-Peripherin-Immunreaktivität an diesen Zellen wurde darauf geschlossen, dass sie von Myelinhüllen umschlossene Typ I Neurone sind (Abbildung 4.2; Bilder **B** und **C**). Weiterhin fiel beim Durchfokussieren des Präparats auf, dass zahlreiche faserartige Strukturen ein deutliches anti-MBP-Signal zeigten. Diese wurden in einer Fokusebene teils exakt horizontal, teils tangential angeschnitten und führten somit zu einem Fluoreszenzsignal zwischen den Somata, das zunächst wie unspezifisches Signalrauschen wirkte. In einer 3D-Darstellung konnten diese Anschnitte einzelnen Fasern zugeordnet werden. Somit handelt es sich bei den genannten Strukturen am ehesten um Anschnitte der myelinisierten Neurite von Typ I Neuronen (Abbildung 4.2; Bild **B**). In einer höheren Vergrößerung ließen sich vereinzelt nahe beieinander liegende Zellpaare darstellen (Abbildung 4.2; Bild **E**). Dabei „sitzt“ eine Schwann-Zelle (Zellkerne sind mit einem Stern gekennzeichnet) auf dem Soma eines Typ I Neurons auf und hüllt es mit Myelin ein. Diese Beobachtung war parallel auch am Durchlichtmikroskop gemacht worden (Abbildung 4.2; Bild **F**). Typ I Spiralganglien-Neurone wurden morphologisch über das Vorhandensein einer Myelinhülle, ihr stark lichtbrechendes Zytoplasma und ihre bipolare Form sowohl bei TYF-Mäusen (P2-P7) als auch bei NMRI-Mäusen (P2-P7) identifiziert. Ein weiterer Antikörper gegen *Myelin Basic Protein* (MBP, Dako) zeigte keine spezifische Immunreaktivität. Das Fluoreszenzsignal war diffus über das Spiralganglien-Präparat verteilt und ließ sich keinen festen Strukturen zuordnen (Bildaten nicht gezeigt).

Die Darstellung vitaler Spiralganglien-Neurone war weiterhin bei den TYF-Mäusen möglich. Es wurden verschiedene TYF-Sublinien auf ihre Fluoreszenzeigenschaften im unfixierten Präparat hin getestet. Der Nachweis von eYFP-Fluoreszenz an Spiralganglien-Neuronen war sowohl bei TYFe- als auch bei TYFc-Mäusen vor Hörbeginn möglich (Abbildung 4.3). So zeigten akut präparierte Spiralganglien-Neurone einer TYFc-Maus am postnatalen Tag 4 eYFP-Fluoreszenz bei Anregung mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm. In der Untersuchung fluoreszierten sowohl die bipolaren Somata als auch die peripheren und zentralen Neurite der Spiralganglien-Neurone. Die Fluoreszenz in den peripheren Fortsätzen der Spiralganglien-Neurone war ebenfalls im Alter von 5 bis 7 Wochen nachweisbar. Hierbei konnten die Somata der Zellen nicht beurteilt werden, da sie bei der Präparation aufgrund ihrer Lage im knöchernen Modiolus der Cochlea entfernt wurden.

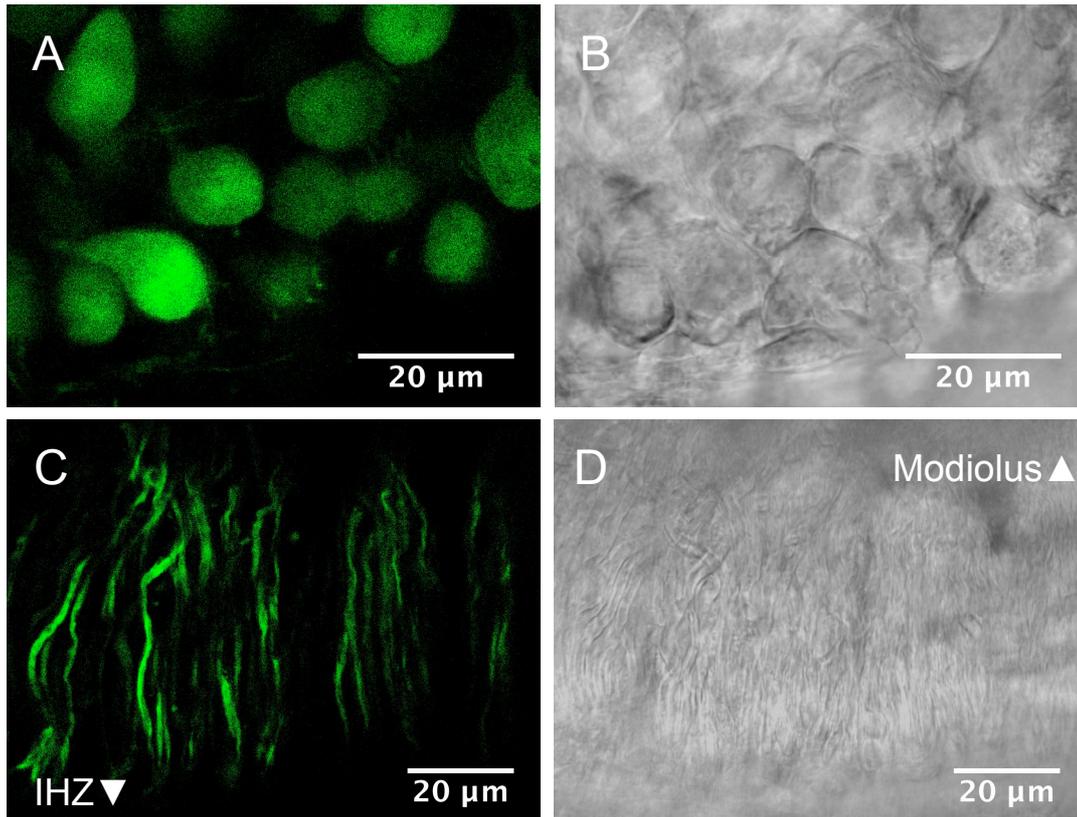


Abbildung 4.3: Live fluoreszierende Spiralganglien-Neurone und Fasern von TYFc-Mäusen.

A, B, live-Bilder von fluoreszierenden SG-Neuronen in einer akuten whole mount-Präparation einer neonatalen, 4 Tage alten TYFc-Maus. Praktisch alle SG-Neurone exprimieren eYFP unter dem neuronalen Promotor Thy-1. A, Fluoreszenzsignal von eYFP (grün). Zahlreiche fluoreszierende neuronale Somata. B, Durchlichtbild. Dicht beieinander liegende stark lichtbrechende neuronale Zellkörper (die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. T. Eckrich zur Verfügung gestellt). C, D, live-Bilder fluoreszierender peripherer Neurite von SG-Neuronen einer adulten 6 Wochen alten TYFc-Maus. In der Präparation des Corti-Organs leuchten die Neurite, die die inneren Haarzellen innervieren. C, Fluoreszenzsignal von eYFP. Praktisch alle Neurite zeigen in verschiedenen Fokusebenen eYFP-Fluoreszenz (grün). D, Durchlichtbild der Neurite. Aufgrund des Alters konnten die neuronalen Somata in der Präparation nicht erhalten werden.

IHZ▼: in Richtung auf die inneren Haarzellen. Modiolus▲: in Richtung auf den Modiolus.

Eine weitere getestete Mauslinie, bei der zusätzlich zu eYFP unter dem Promotor Thy-1 in Neuronen unter dem humanen GFAP-Promotor einen blauen Fluoreszenzfarbstoff in Gliazellen exprimiert wird, zeigte weder an den Spiralganglien-Neuronen noch an den Gliazellen (wie beispielsweise den Schwann-Zellen) nachweisbare Fluoreszenzsignale im betrachteten Alter vor Hörbeginn am postnatalen Tag 12 (Bildaten nicht gezeigt).

4.2 Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene

In einem weiteren Teil des Projektes wurde die Expression der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle in Spiralganglien untersucht, da hierüber noch keine Daten existieren. Mit diesem Ziel wurden einerseits auf mRNA-Ebene die Expression der verschiedenen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten quantifiziert (Abbildung 4.4) und andererseits Immunfluoreszenzfärbungen mit 2 Antikörpern gegen die $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calciumkanals sowohl bei $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen als auch bei Kontroll-Mäusen ($\alpha_2\delta_3^{+/+}$) durchgeführt.

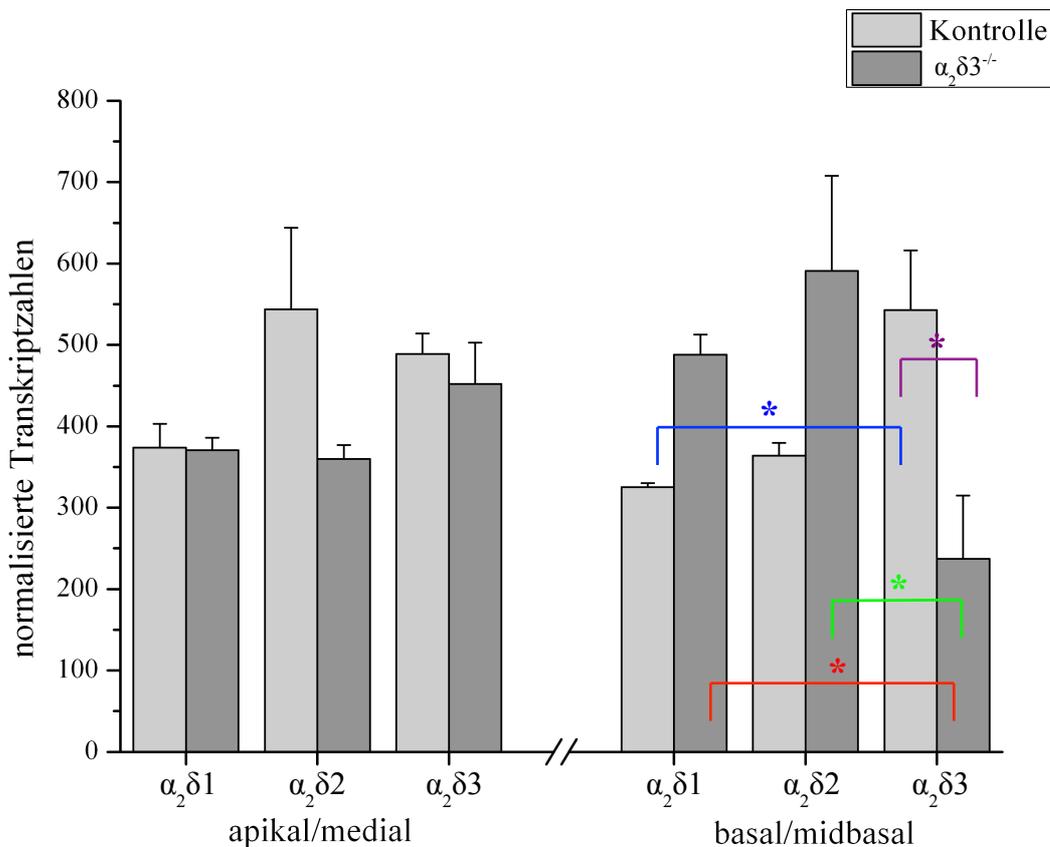


Abbildung 4.4: qRT-PCR der Calciumkanal-Untereinheiten $\alpha_2\delta_1$ bis 3 von SG-cDNA.

Gemittelte Transkriptzahlen ($n = 3$ bis 4 unabhängige Proben, \pm Standardfehler, $p < 0,05$) der Calciumkanal-Untereinheiten $\alpha_2\delta_1$ bis 3, normalisiert auf HPRT 1 und SDHA von SG-cDNA an P5. Kontrolle (hellgraue Balken) gegen $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ (dunkelgraue Balken). Links sind die Transkriptzahlen von Spiralganglien der apikalen/medialen Cochlea aufgetragen, rechts die der basalen/midbasalen Cochlea. Signifikanzen: Kontrolle: $\alpha_2\delta_3$ vs. $\alpha_2\delta_1$: $p = 0,03$ (*). $\alpha_2\delta_3^{-/-}$: $\alpha_2\delta_2$ vs. $\alpha_2\delta_3$: $p < 0,001$ (*) und $\alpha_2\delta_1$ vs. $\alpha_2\delta_3$: $p = 0,003$ (*). Kontrolle $\alpha_2\delta_3$ vs. $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ $\alpha_2\delta_3$: $p < 0,001$ (*).

In den Spiralganglien von Kontroll-Mäusen werden alle 3 der in neuronalen Zellen vorkommenden $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten ($\alpha_2\delta_1$ bis 3) exprimiert. Im apikalen/medialen Anteil der Cochlea ist sowohl für

homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defiziente Mäuse als auch für Kontroll-Mäuse kein signifikanter Unterschied in der Verteilung und Expression der einzelnen Untereinheiten ($\alpha_2\delta_1$ bis 3) erkennbar, das heißt in apikalen Spiralganglien ist keine der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten 1 bis 3 dominierend exprimiert. Weiterhin hat die Deletion der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit bei apikalen Spiralganglien keinen Einfluss auf das allgemeine Expressionsmuster der genannten Isoformen. Betrachtet man zunächst nur die Kontrolle, so ist im basalen Anteil der Cochlea die Verteilung der Untereinheiten zugunsten von $\alpha_2\delta_3$ verschoben. Dort wurden signifikant (*) höhere Transkriptzahlen dieser Untereinheit (543 ± 73) nachgewiesen als dies für die $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit (325 ± 5) der Fall ist. Für die $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit ist dies als Tendenz erkennbar (364 ± 16 ; $p = 0,085$). Im Gegensatz dazu kommt es bei den homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen in Abhängigkeit der Tonotopie zu einer veränderten Expression der Kanaluntereinheiten: So sind in der basalen Hälfte die Transkriptzahlen der $\alpha_2\delta_1$ - (488 ± 25) signifikant (*) und die der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheiten (591 ± 117) hochsignifikant (*) höher als die der (nichtfunktionalen) $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit (237 ± 78), die dort signifikant (*) schwächer exprimiert wird als in den entsprechenden Kontrollen (543 ± 73). Außerdem sind bei den homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen (dunkelgraue Balken) in der basalen Hälfte tendenziell mehr $\alpha_2\delta_2$ -Transkripte nachweisbar als in der Kontrolle (591 ± 117 in der $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ Maus gegenüber 364 ± 16 in der Kontrolle (hellgraue Balken); $p = 0,062$). An diesem Punkt stellt sich die Frage, weshalb im Gewebe der homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen noch $\alpha_2\delta_3$ -Transkripte nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um veränderte mRNA, die zu einem nichtfunktionalen Protein führt, jedoch von den verwendeten Primern erkannt wird (siehe auch 5.4 Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene). Da das Vorhandensein spannungsgesteuerter Calciumkanäle ein Charakteristikum speziell von Neuronen ist, ist davon auszugehen, dass die erkannten Transkripte aus Spiralganglien-Neuronen stammen.

4.3 Expression von $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheiten in Spiralganglien-Neuronen auf Proteinebene

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob durch Immunfluoreszenzfärbung der Nachweis der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle auf Proteinebene möglich ist. Bei jungen NMRI-Mäusen (P7) zeigte sich unter Verwendung des anti-Cacna2d3-Antikörpers (S-14; Santa Cruz) und des sekundären Antikörpers Cy3 im akuten *whole mount*-Präparat ein spezifisches Färbeergebnis (Abbildung 4.5).

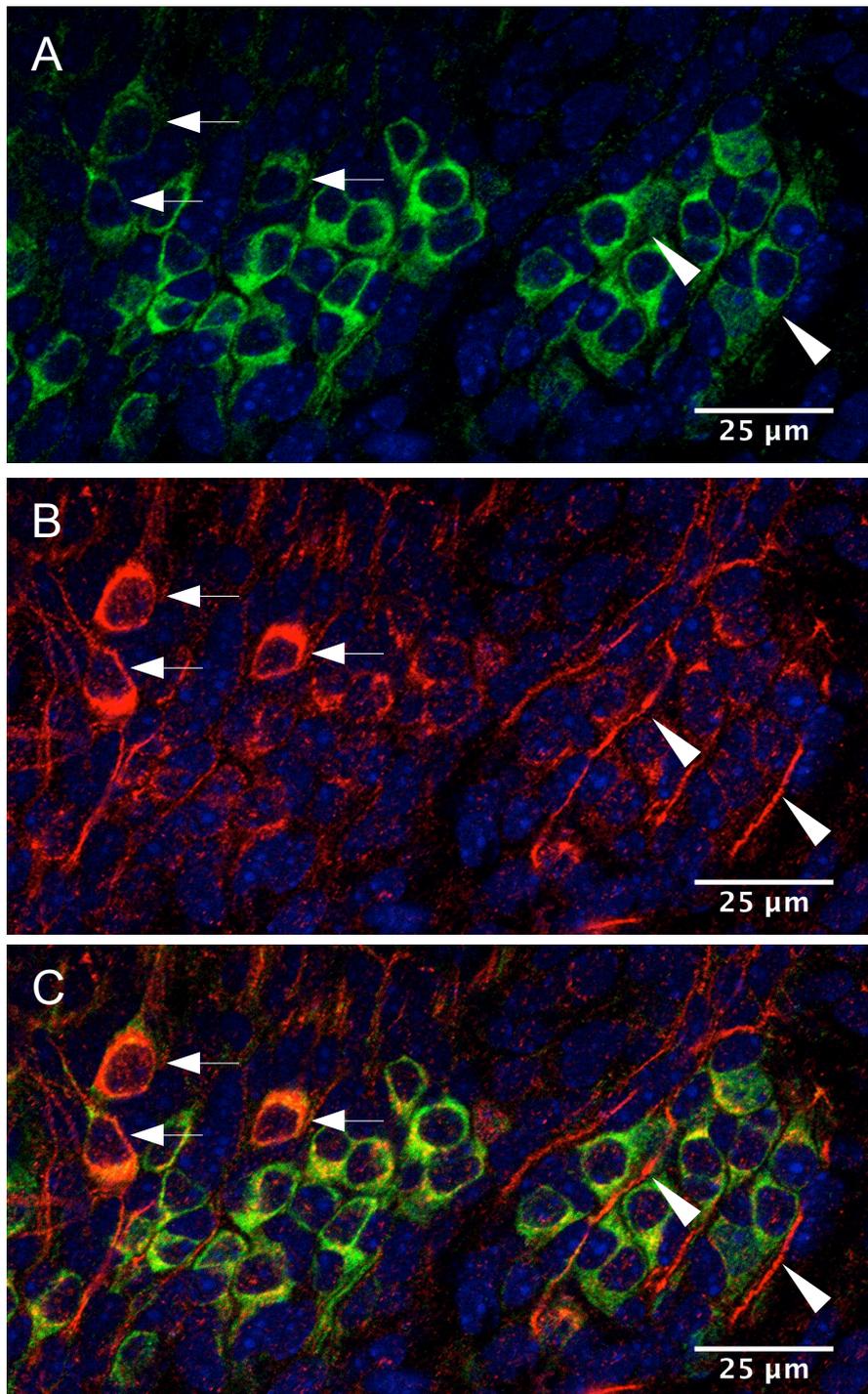


Abbildung 4.5: Akute whole mount-Präparation der SG-Neurone einer NMRI-Maus an P7.

Immunreaktivität von anti- β -Tubulin (grün) fand sich überwiegend an bipolaren Somata und Neuriten. Der anti-Cacna2d3-Antikörper (rot) markierte lediglich einige SG-Neurone und zahlreiche Neurite. Zellkerne wurden mit DAPI blau markiert. **A**, grüner Kanal. β -Tubulin-positive Somata. **B**, roter Kanal. Ein Anteil der SG-Neurone zeigt Cacna2d3-positive Somata sowie einige ausschließlich mit anti-Cacna2d3-markierte Neurite (Pfeilspitzen). **C**, Überlagerungsbild. Kolokalisierte Fluoreszenzsignale an den mit ausgefüllten Pfeilen markierten SG-Neuronen.

Anti- β -Tubulin färbte zahlreiche bipolare Somata und Neurite, während der anti-Cacna2d3-Antikörper (S-14; Santa Cruz) eine verhältnismäßig deutlich kleinere Anzahl von neuronalen Somata sowie zahlreiche Neurite anfärbte. Die Spiralganglien-Neurone, die ein besonders starkes anti-Cacna2d3-Signal zeigten, waren andererseits schwächer mit anti- β -Tubulin gefärbt. Im Überlagerungsbild zeigte sich teilweise eine kolokalisierte Immunreaktivität von anti- β -Tubulin und anti-Cacna2d3. Um die Spezifität des anti-Cacna2d3-Antikörpers (S-14; Santa Cruz) zu überprüfen, wurde das gleiche Färbeprotokoll auch bei den $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen angewendet und zwar sowohl bei homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen als auch bei heterozygoten Tieren im vergleichbaren Alter (P6).

Sollte der anti-Cacna2d3-Antikörper spezifisch nur diese Untereinheit erkennen, dürfte in der homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus ($\alpha_2\delta_3^{-/-}$) kein anti-Cacna2d3-Signal nachweisbar sein, während bei dem heterozygoten Tier ($\alpha_2\delta_3^{+/-}$) ein ähnliches Bild wie zuvor bei der NMRI-Maus zu erwarten wäre. Für beide Versuche ließ sich kein Unterschied in der Immunfluoreszenzmarkierung des anti-Cacna2d3-Antikörpers gegenüber dem Wildtypen (NMRI-Mäuse) nachweisen (Abbildung 4.6). Der überwiegende Anteil von Spiralganglien-Neuronen zeigte β -Tubulin-positives Immunsignal, während etwa 5 bis 10 % der Spiralganglien-Neurone durch den anti-Cacna2d3-Antikörper markiert waren.

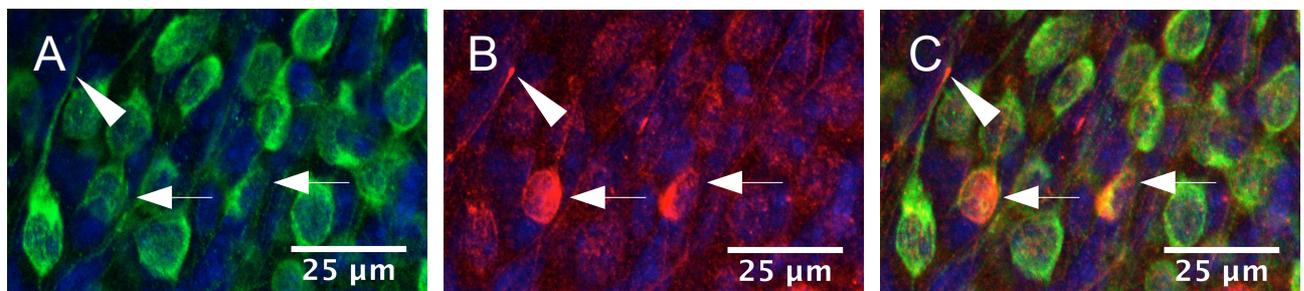


Abbildung 4.6: Markierung von Spiralganglien-Neuronen einer $\alpha_2\delta_3^{-/-}$ Maus mit einem anti-Cacna2d3-Antikörper.

Akute whole mount-Präparation der SG-Neurone einer homozygot $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus ($\alpha_2\delta_3^{-/-}$) an P6. Anti- β -Tubulin (grün) markierte überwiegend bipolare Somata und Neurite. Der anti-Cacna2d3-Antikörper (rot) markierte etwa 5 bis 10 % der SG-Neuronen und Neurite. Zellkerne wurden mit DAPI blau markiert. **A**, grüner Kanal. β -Tubulin-positiv Somata und Neurite. **B**, roter Kanal. Ein kleiner Anteil der SG-Neurone zeigt Cacna2d3-positive Somata. Einige Neurite sind ausschließlich mit anti-Cacna2d3 und nicht mit anti- β -Tubulin markiert (Pfeilspitze). **C**, Überlagerungsbild. Kolokalisation von anti- β -Tubulin und anti-Cacna2d3 an den mit Pfeilen markierten SG-Neuronen.

Aufgrund der distinkten Färbung durch den anti-Cacna2d3-Antikörper und der der anti-Peripherin-Immunreaktivität sehr ähnlichen Fluoreszenzsignale lag die Vermutung nahe, dass der anti-Cacna2d3-Antikörper (S-14; Santa Cruz) möglicherweise Epitope erkennt, die überwiegend nur von Spiralganglien-Neuronen Typ II exprimiert werden. Es wurde folglich eine Doppelfärbung von anti-Cacna2d3 und anti-Peripherin angefertigt (Abbildung 4.7). Dabei zeigte sich eine Kolokalisation der Immunreaktivitäten von anti-Cacna2d3 und anti-Peripherin. Es waren sowohl die Somata der Spiralganglien-Neurone als auch zahlreiche Neurite markiert. Beim Durchfokussieren der akuten *whole mount*-Präparate überwog der Anteil der ausschließlich Cacna2d3-positiven Neurite gegenüber den Neuriten mit einer Kolokalisation von anti-Cacna2d3 und anti-Peripherin. Dies bedeutet, dass nicht nur Typ II Neurone, sondern auch Typ I Neurone Cacna2d3 exprimieren. Letztere jedoch nicht in ihren Somata sondern praktisch ausschließlich in ihren Neuriten, während für Typ II Neurone dieser Unterschied in der Proteinexpression zwischen beiden Zellkompartimenten nicht zutrifft.

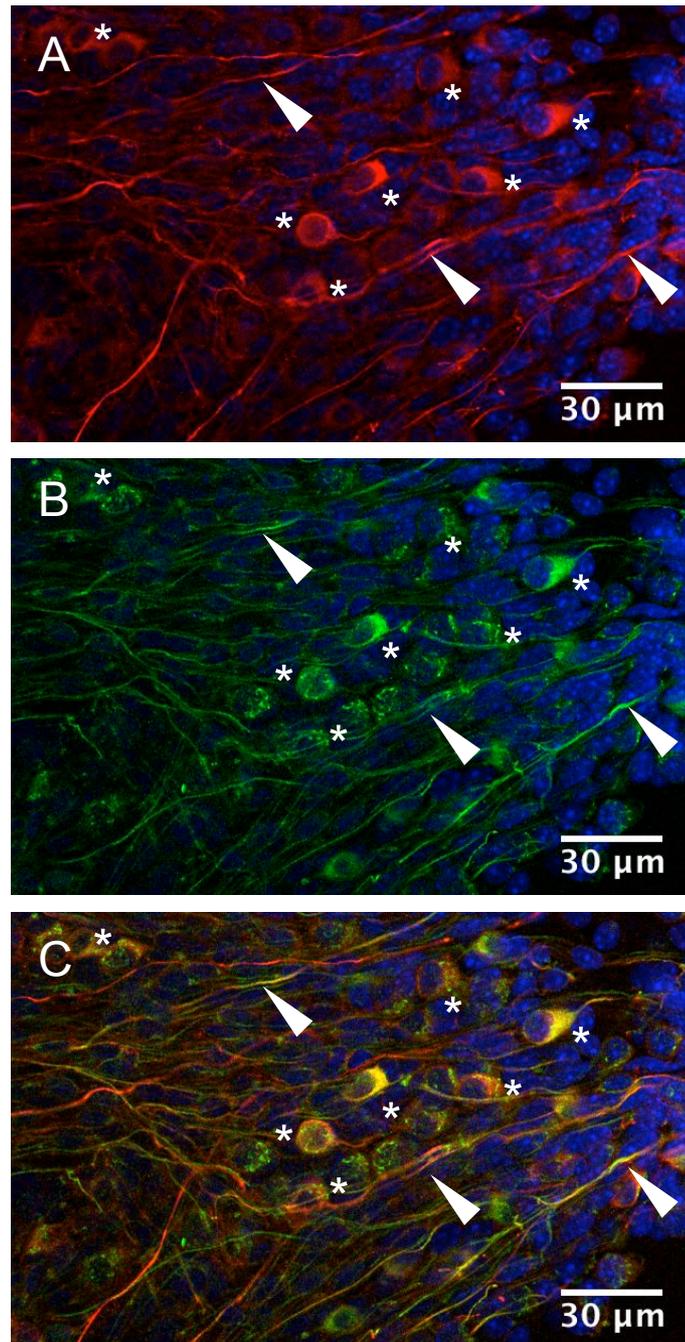


Abbildung 4.7: Doppelfärbung mit anti-Peripherin und anti-Cacna2d3 an Spiralganglien-Neuronen.

Akute whole mount-Präparation der SG-Neurone einer NMRI-Maus an P5. Sowohl anti-Peripherin (rot) als auch anti-Cacna2d3 (S-14; Santa Cruz; grün) markierten bipolare Somata und Neurite. Wie sich beim Durchfokussieren des Präparates zeigte, markierte anti-Cacna2d3 anteilig mehr Neurite. Zellkerne wurden mit DAPI blau markiert. **A**, roter Kanal. Peripherin-positive Somata und Neurite. **B**, grüner Kanal. Cacna2d3-positive Somata und Neurite. **C**, Überlagerungsbild. Kolokalisierte Fluoreszenzsignale an Somata und Neuriten. Pfeilspitzen: deutlich kolokalisiertes Fluoreszenzsignal an verschiedenen Neuriten. Sterne: kolokalisiertes Fluoreszenzsignal an den Somata der SG-Neurone.

Ein weiterer Cacna2d3-Antikörper (Novus Biologicals) wurde in Verbindung mit dem sekundären Antikörper Cy3 auf seine Spezifität hin überprüft. Unter Verwendung von NMRI-Mäusen an P5 bis P7 zeigte sich ein unspezifisches Färbeergebnis mit anti-Cacna2d3-Signal, das am ehesten als Färbehintergrund anzusehen war (Bildaten nicht gezeigt).

4.4 Etablierung eines Zellkultursystems für Spiralganglien-Neurone

Im Zellverband des *whole mount*-Präparates ließen sich die Spiralganglien-Neurone für einen Zeitraum von 1 bis 2 Tagen auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläsern kultivieren. Nach 2 Tagen in Kultur teilten sich nicht-neuronale Zellen der Spiralganglien, vermutlich Fibroblasten und Gliazellen in einem derartigen Maß, dass die vorhandenen Spiralganglien-Neurone „überwuchert“ wurden (Bildaten nicht gezeigt). Das Präparat war zu dick, um es im Lichtmikroskop zu betrachten, und damit für elektrophysiologische Messungen nicht geeignet.

Eine mögliche Lösung dieses Problems stellte die dissoziierte Primärkultur der Spiralganglien-Neurone dar. Dazu wurde nach ausführlicher Literaturrecherche ein Protokoll entwickelt. Im Kapitel Methoden ist unter „3.2.4 Zellkultur“ das im Verlauf dieser Dissertation etablierte Zellkulturprotokoll erläutert.

Bei Immunfluoreszenzfärbungen dissoziierter Spiralganglien-Neurone zeigte sich, dass ein äußerst geringer Anteil der auf den mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern wachsenden Spiralganglien-Neurone Peripherin-positive Typ II Neurone waren (Abbildung 4.8). Etwa eines von 30 der ausgezählten Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur zeigte in einer Immunfluoreszenzfärbung mit anti- β -Tubulin und anti-Peripherin als primären Antikörpern eine Peripherinexpression. Daraufhin wurde bei folgenden Immunfluoreszenzfärbungen an kultivierten und vereinzelt Spiralganglien-Neuronen auf die Darstellung von Typ II Neuronen mit einer anti-Peripherin-Färbung verzichtet. Bei Betrachtung des dissoziierten Spiralganglien-Präparates zeigte sich unter dem Durchlichtmikroskop, dass einem Großteil der Spiralganglien-Neurone auch nach dem Vereinzeln Schwann-Zellen anhaften, die an ihren typisch länglich-deformierten Zellkernen identifiziert wurden (Bildaten nicht gezeigt; zur Morphologie der Schwann-Zellen im differentiellen Interferenzkontrast siehe Abbildung 4.2, Bild F).

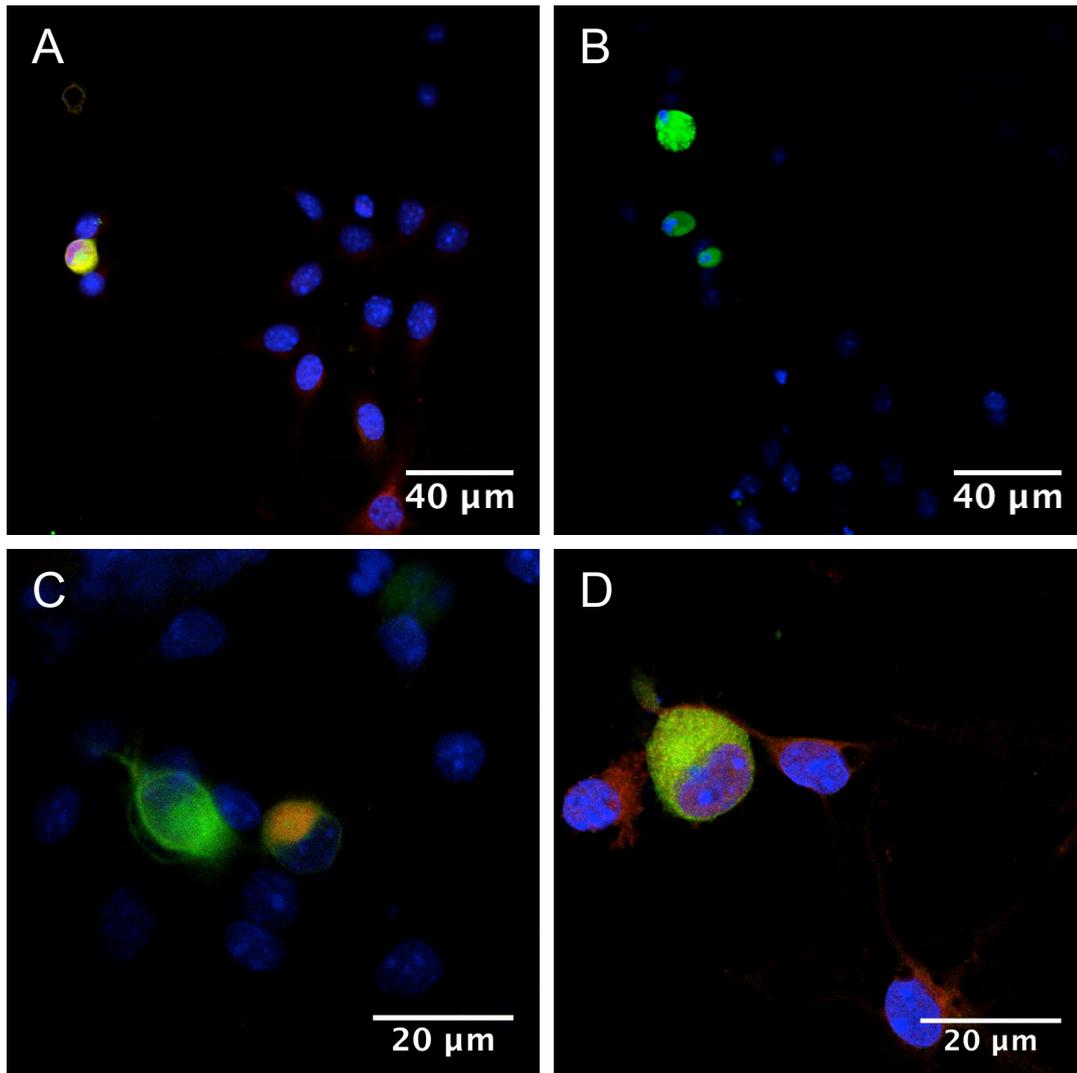


Abbildung 4.8: Immunfluoreszenzfärbung an dissoziierten Spiralganglien-Neuronen in Kultur.

A bis D, dissoziierte SG-Neurone einer neonatalen NMRI-Maus am postnatalen Tag 5 nach 24 Stunden in Kultur. Typ I Neurone sind mit anti- β -Tubulin markiert (grün), Typ II Neurone sind mit anti-Peripherin markiert (rot). Zellkerne wurden mit DAPI blau markiert. Die neuronale Zelldichte ist mit etwa 30 SG-Neuronen pro Deckglas gering. A und C, einige wenige Peripherin-positive Typ II Neurone sind erkennbar (etwa 1 von 30 SG-Neuronen). D, β -Tubulin-positives Typ I Neuron. Bei den umliegenden, deutlich kleineren Zellen handelt es sich am ehesten um Stützzellen aus den Spiralganglien, die in geringem Maße Peripherin-positives Immunsignal zeigen (die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. T. Eckrich zur Verfügung gestellt).

Ziel war es, in der dissoziierten Zellkultur eine lichtmikroskopische Identifizierung der Spiralganglien-Neurone gegenüber anderen Zellen durchzuführen. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Neuronen-spezifischen Antikörper β -Tubulin war hierfür nicht geeignet, weil diese eine Fixierung der Zellen erfordert hätte. Deshalb wurden Primärkulturen vereinzelter Spiralganglien-Neurone von TYFc-Mäusen angelegt, um eventuelle morphologische Unterschiede zwischen

Spiralganglien-Neuronen und umgebenden Zellen aufzudecken (Abbildung 4.9). Zunächst musste geklärt werden, ob deren Fluoreszenz auch unter Kulturbedingungen beständig ist und auch nach der für die Immunfluoreszenzfärbung nötigen PFA-Fixierung nachweisbar bleibt.

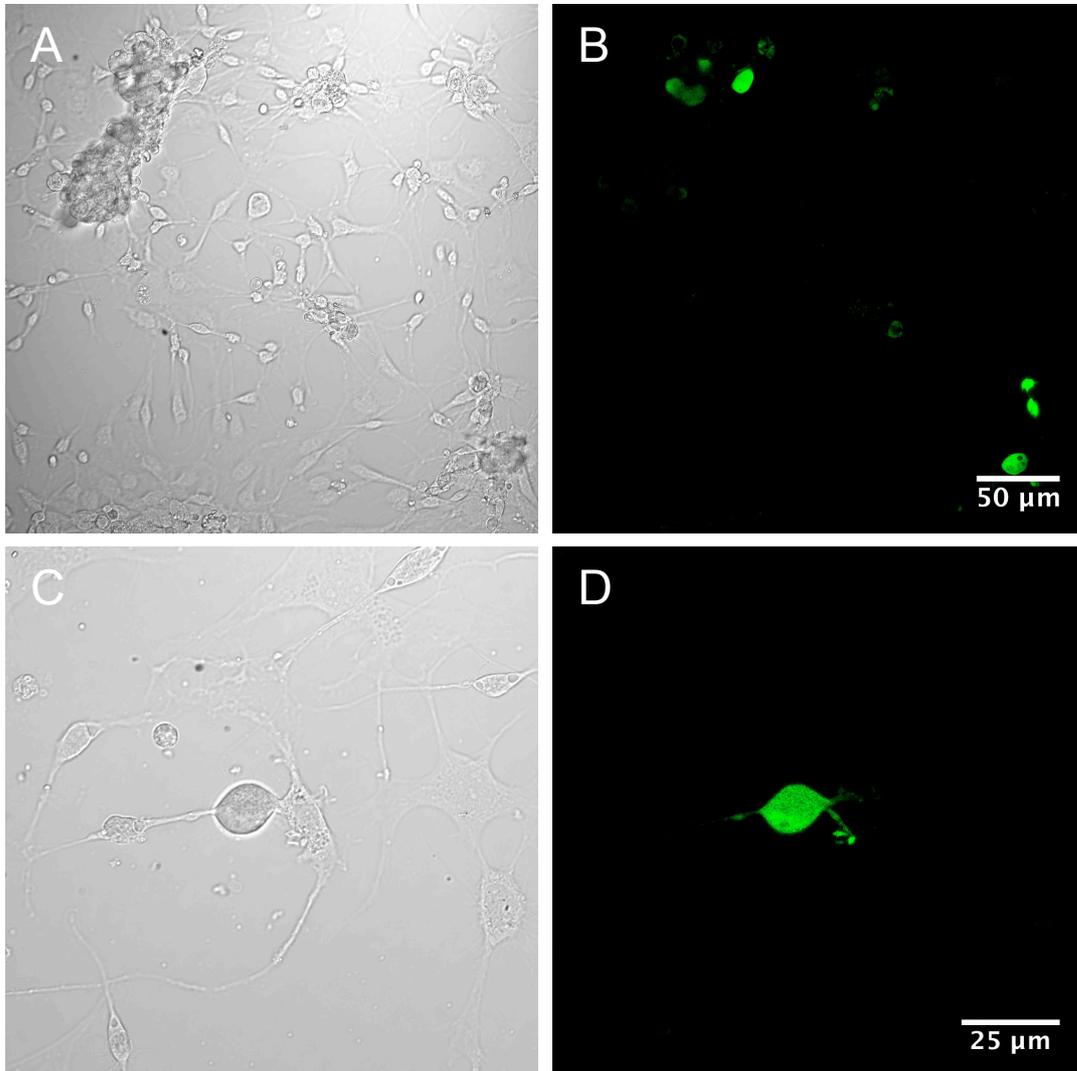


Abbildung 4.9: Live fluoreszierende dissoziierte Spiralganglien-Neurone von TYFc-Mäusen.

A bis D, live-Aufnahmen von fluoreszierenden dissoziierten Spiralganglien-Neuronen einer TYFc-Maus am postnatalen Tag 7 nach 48 Stunden in Kultur. A und C, Durchlichtbilder. B und D, korrespondierendes Fluoreszenzsignal von eYFP (grün). Die Fluoreszenz von eYFP ermöglicht die live-Identifizierung von Spiralganglien-Neuronen unter Kulturbedingungen (die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. T. Eckrich zur Verfügung gestellt).

Es ließ sich feststellen, dass die eYFP-Fluoreszenz auch nach 1 bis 2 Tagen in Kultur nachweisbar bleibt, jedoch nach Fixierung der Zellen beispielsweise mit 2 % PFA nicht mehr vorhanden ist (Bildaten nicht gezeigt). Morphologisch sind die kultivierten Spiralganglien-Neurone durch etwa

15 µm messende Somata gekennzeichnet. Als bipolare Neurone zeigen sie nach längerer Kultur (im genannten Fall 48 Stunden) teilweise aussprossende Neurite. Außerdem erscheint das Zellinnere der Spiralganglien-Neurone im Mikroskopbild im Vergleich zu den umgebenden Zellen stärker lichtbrechend. Teilweise waren auf den Spiralganglien-Neuronen aufsitzende länglich-deformierte Zellkerne erkennbar, die vermutlich zu Schwann-Zellen gehören (Bildraten nicht gezeigt).

In allen bis hier angeführten Versuchen war die Zellausbeute mit etwa 30 Spiralganglien-Neuronen pro Deckglas (entsprechend 30 Spiralganglien-Neuronen pro Cochlea) mit Poly-D-Lysin-Beschichtung sehr gering. Es wurde deshalb im Folgenden versucht, die neuronale Zellausbeute zu verbessern. So wurde darauf geachtet, dass das präparierte Gewebe bis zum Enzymverdau eisgekühlt gelagert wurde, um den Sauerstoffverbrauch der Zellen gering zu halten. Dadurch wurde anaerober Stress vermieden und das Zellüberleben verbessert. Dieser Überlegung folgend wurden die Zellen ausschließlich mit dem vollständigen Kulturmedium gewaschen und nicht wie zuvor mit reinem Neurobasal®-A Medium. Die Bestandteile des Kulturmediums wurden ebenfalls optimiert: das zunächst verwendete Neurobasal®-Medium wurde gegen Neurobasal®-A Medium ausgetauscht und anstelle von L-Glutamin wurde das stabilere GlutaMAX™-I Supplement verwendet. Außerdem wurde das Kulturmedium mindestens 14 bis 16 Stunden vor einer geplanten Kultur angesetzt und leicht geöffnet im Brutschrank inkubiert, damit CO₂ in die Lösung diffundieren konnte. Somit konnte das im Medium entstehende Bicarbonat als zusätzlicher Puffer (zu HEPES) dienen. Dadurch veränderte sich der pH-Wert des Mediums von basischen Werten (pH 7,82) unmittelbar nach dem Ansetzen zu physiologischeren Werten um pH 7,28 nach der Inkubation. Eine Optimierung der Arbeitsbedingungen führte weiterhin zu einem verbesserten Überleben der Spiralganglien-Neurone. Als Beispiel sei die Anschaffung einer schwingungsarmen sterilen Werkbank (Laminar-Flow Reinluftwerkbank, HF 07-12; BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) genannt, die außerdem durch ihren horizontalen Luftstrom eine bessere Ergonomie für die Präparation unter dem Stereomikroskop bot.

In einer nachfolgenden Versuchsreihe bezüglich unterschiedlicher Deckglasbeschichtungen stellte sich heraus, dass bei der dissoziierten Spiralganglien-Kultur eine Beschichtung mit Poly-D-Lysin/Laminin einer reinen Poly-D-Lysin-Beschichtung bezogen auf die Zahl der angewachsenen Neurone überlegen ist (Abbildung 4.10). Es zeigte sich, dass nach Kultivierung über Nacht bis maximal 24 Stunden bei der Poly-D-Lysin-/Laminin-Beschichtung signifikant (484 ± 78 SG-Neurone pro Deckglas, entsprechend $3,9 \pm 0,6$ % der SG-Neurone einer Cochlea) mehr Spiralganglien-Neurone pro Deckglas vorhanden waren als bei alleiniger

Poly-D-Lysin-Beschichtung (307 ± 110 SG-Neurone pro Deckglas, entsprechend $2,5 \pm 0,9$ % der SG-Neurone einer Cochlea). Aufgrund dessen wurden für folgende dissoziierte Kulturen standardmäßig Poly-D-Lysin/Laminin beschichtete Deckgläser verwendet.

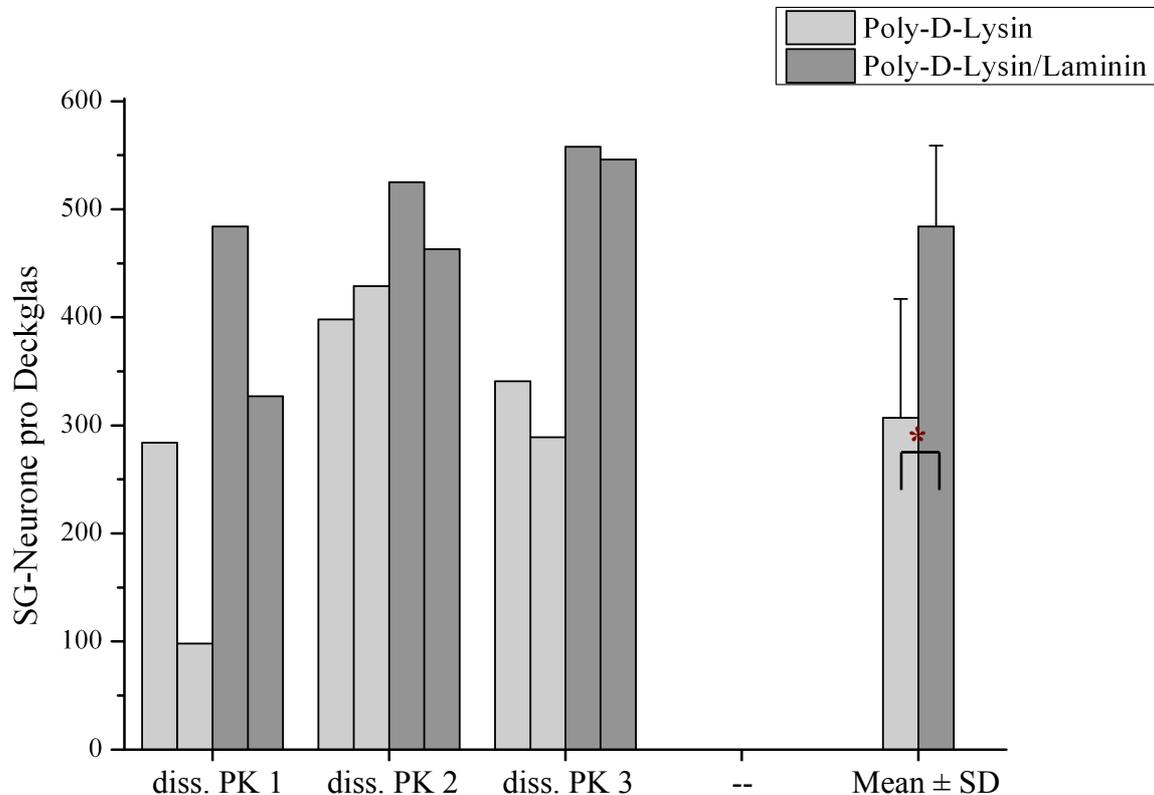


Abbildung 4.10: Überleben von Spiralganglien-Neuronen bei unterschiedlich beschichteten Deckgläsern in der dissoziierten Zellkultur.

Durch Immunfluoreszenz mit anti- β -Tubulin identifizierte SG-Neurone pro Deckglas bei 3 voneinander unabhängigen dissoziierten Kulturansätzen (diss. PK 1 bis 3: dissoziierte Primärkultur 1 bis 3; die einzelnen Säulen zeigen die Anzahl der SG-Neurone auf einem ausgezählten Deckglas) nach Kultivierung über Nacht. Das letzte Säulenpaar zeigt die gemittelte Anzahl der SG-Neurone pro Deckglas (Mean \pm SD: Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$ Deckgläser; $p < 0,05$). Poly-D-Lysin-Beschichtung (hellgraue Balken; 6 Deckgläser) gegen Poly-D-Lysin-/Laminin-Beschichtung (dunkelgraue Balken; 6 Deckgläser). Die Poly-D-Lysin-/Laminin-Beschichtung verbessert das Überleben der SG-Neurone signifikant.

In einem weiteren Versuch wurde das Überleben der Spiralganglien-Neurone bei Zugabe der beiden Wachstumsfaktoren *Fibroblast Growth Factor 2* und *Glial cell-Derived Neurotropic Factor* (FGF 2: 10 ng/ml und GDNF: 100 pg/ml) mit einer Kontrolle ohne diese Wachstumsfaktoren verglichen (Abbildung 4.11).

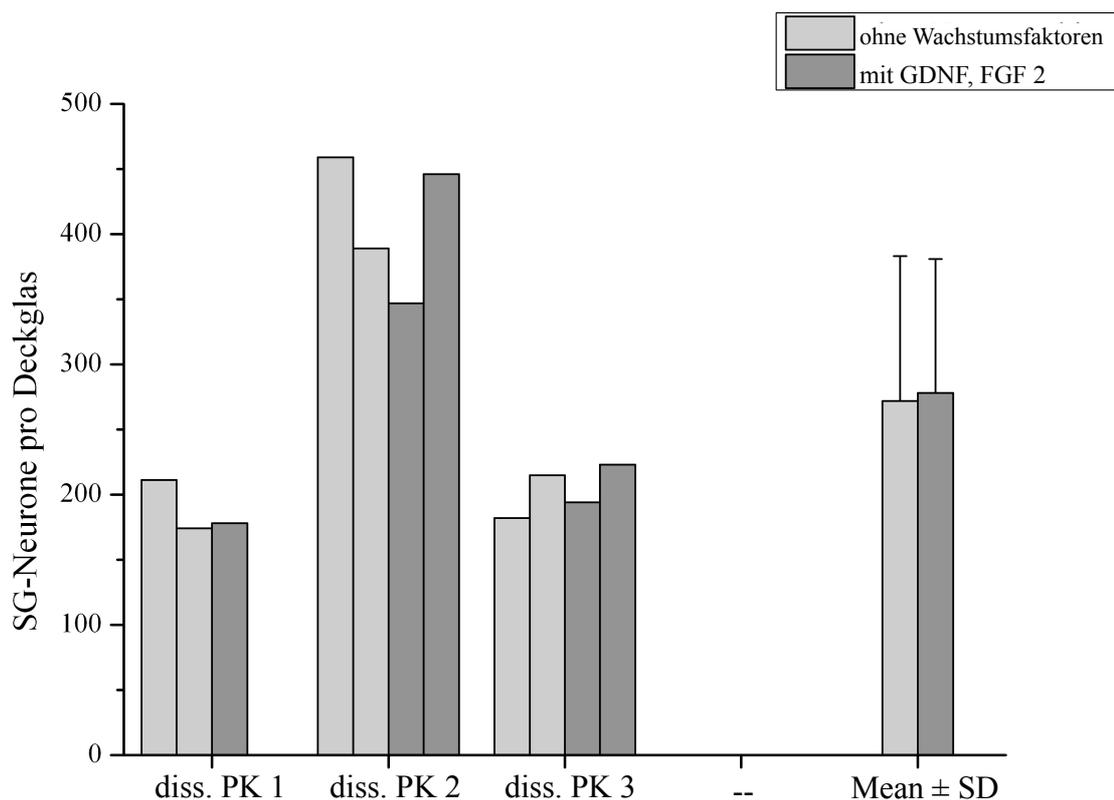


Abbildung 4.11: Überleben von Spiralganglien-Neuronen bei Zugabe von Wachstumsfaktoren in der dissoziierten Zellkultur.

Durch Immunfluoreszenz mit anti- β -Tubulin identifizierte SG-Neurone pro Deckglas bei 3 voneinander unabhängigen dissoziierten Kulturansätzen (diss. PK 1 bis 3: dissoziierte Primärkultur 1 bis 3; die einzelnen Säulen zeigt die Anzahl der SG-Neurone auf einem ausgezählten Deckglas) nach Kultivierung über Nacht. Das letzte Säulenpaar zeigt die gemittelte Anzahl der SG-Neurone pro Deckglas (Mean \pm SD: Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 5$ bis 6 Deckgläser; $p < 0,05$). Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren (hellgraue Balken; 6 Deckgläser) gegen Zugabe von 10 ng/ml FGF 2 und 100 pg/ml GDNF (dunkelgraue Balken; 5 Deckgläser). Die Zugabe der genannten Wachstumsfaktoren führt nicht zu einem signifikant verbesserten Überleben der Spiralganglien-Neurone.

In dem beschriebenen Versuch konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben der Spiralganglien-Neurone unter einer der genannten Bedingungen festgestellt werden. In der Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren (272 ± 111 SG-Neurone pro Deckglas, entsprechend $2,2 \pm 1,0$ % der SG-Neurone einer Cochlea) war die Anzahl der überlebenden Spiralganglien-Neurone pro Deckglas nur geringfügig kleiner als in der Gruppe, die zusätzlich mit GDNF und FGF 2 behandelt wurde (278 ± 103 SG-Neurone pro Deckglas, entsprechend $2,3 \pm 0,8$ % der

SG-Neurone einer Cochlea). Um herauszufinden, ob ein positiver Effekt der Wachstumsfaktoren nach längerer Kultivierungszeit nachweisbar ist, wurden die Spiralganglien-Neurone unter den gleichen Ausgangsbedingungen wie im Versuch zuvor doppelt so lange, das heißt maximal 48 Stunden kultiviert. Es offenbarte sich, dass die Wachstumsfaktoren einen eher gegenteiligen Effekt hatten: In der Kontrolle (110 ± 84 SG-Neurone pro Deckglas, entsprechend $0,9 \pm 0,7$ % der SG-Neurone einer Cochlea) waren deutlich mehr Spiralganglien-Neurone vorhanden als bei Zugabe von GDNF und FGF 2 (46 ± 36 , SG-Neurone pro Deckglas, entsprechend $0,4 \pm 0,3$ % der SG-Neurone einer Cochlea).

5 Diskussion

5.1 Differentielle Proteinexpression in Spiralganglien-Neuronen

Die im Rahmen der vorliegenden Versuche gemachten Beobachtungen bezüglich der Proteinexpression beider Typen von Spiralganglien-Neuronen sind hier zur Übersicht nochmals dargestellt (Abbildung 5.1).

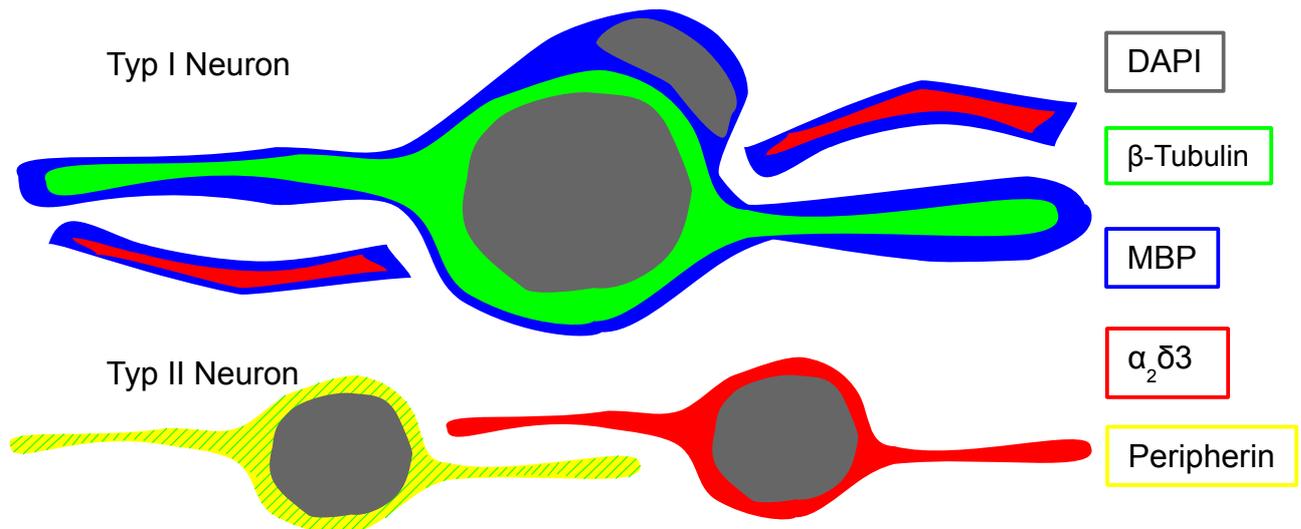


Abbildung 5.1: Differentielle Proteinexpression in Typ I und Typ II Neuronen.

Die Zellkerne sind jeweils mit DAPI (dunkelgrau) markiert. Typ I Neuron zeigen eine starke Expression von β -Tubulin (grün). Demgegenüber zeigen Typ II Neurone eine allenfalls geringe Expression (grün schraffiert). Die Myelinisierung der Typ I Neurone lässt sich über die Expression von MBP (blau) an den Schwann-Zellen belegen, die den Neuronen aufsitzen und an ihren länglichen Zellkernen identifiziert werden können. Während bei den Typ I Neuronen lediglich eine Subpopulation von Fasern Expression von $\alpha_2\delta_3$ (rot) zeigt, ist diese bei den Typ II Neuronen sowohl an den Somata als auch an den Neuriten deutlich ausgeprägt und mit der Peripherin-Expression (gelb) kolokalisiert.

Tabelle 5.1: Vergleich der Immunreaktivität von Typ I und Typ II Neuronen.

Die Immunreaktivität der genutzten Antikörper ist für beide Typen von Spiralganglien-Neuronen gegenübergestellt. Zeichenerklärung: „+“ → positiv; „+++“ → deutlich positiv; „(+)" → schwach positiv; „-“ → negativ.

Antikörper	Typ I Neuron	Typ II Neuron
anti-β-Tubulin	+++	(+)
anti-Peripherin	-	+++
anti-Cacna2d3 (Santa Cruz)	+ einzelne Neurite (Subpopulation)	+++ alle Somata und Neurite
anti-MBP (Covance)	+ einzelne aufsitzende Zellen, sowie um die Neurite	-

5.2 Identifizierung der Spiralganglien-Neurone

Eine der Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, war, wie die verschiedenen Typen von Neuronen im Spiralganglion unterschieden werden können. Über Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass der monoklonale anti-β-Tubulin-Antikörper aus der Maus der Firma Covance (MMS-435P) und der polyklonale anti-Peripherin-Antikörper aus dem Kaninchen der Firma Merck Millipore (NG1780586) geeignete Antikörper zur Darstellung von Spiralganglien-Neuronen sind (Barclay et al., 2010; Chen et al., 2011; Flores-Otero und Davis, 2011; Reid et al., 2004). β-Tubulin ist ein Protein, das spezifisch in den Mikrotubuli von Neuronen vorkommt und somit Teil des Zytoskeletts in diesen Zellen (Information gemäß Covance, 2013: <https://store.crpinc.com/pdfdatasheet.aspx?catalogno=MMS-435P>). Es fiel auf, dass anti-β-Tubulin eine geringere Affinität zu Peripherin-positiven Typ II als zu Typ I Neuronen besitzt. Bei Peripherin handelt es sich um ein Typ III Intermediärfilament (Gruppe der Desmine), das insbesondere in sympathischen, motorischen und sensorischen Neuronen exprimiert wird und somit ebenfalls Teil des Zytoskeletts von Neuronen ist (Information gemäß Merck Millipore, 2013: <http://www.millipore.com/catalogue/item/ab1530#>). Typ I Neurone zeigten keine anti-Peripherin-Immunreaktivität (Abbildung 4.1; Hafidi, 1998). Die Unterschiede in der Fähigkeit der Antikörper, Spiralganglien-Neurone zu markieren, deutet somit auf einen unterschiedlichen Aufbau des Zytoskeletts der Spiralganglien-Neuron-Subtypen hin. Hinweise darauf finden sich beispielsweise in einer Veröffentlichung von Anniko et al. (1987), in der 2 Gruppen von fetalen humanen Spiralganglien-Neuronen anhand ihrer unterschiedlich starken Immunreaktivität bezüglich

Neurofilament identifiziert werden konnten. Neurofilament ist ebenfalls ein Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts und wird den Ergebnissen der genannten Studie folgend unterschiedlich stark in den beiden Typen von Spiralganglien-Neuronen exprimiert. Die hier vorgestellten Daten sprechen dafür, dass Typ I Neurone praktisch kein Peripherin exprimieren. Hingegen zeigen Typ II Neurone eine reduzierte Expression von β -Tubulin.

5.3 Eigenschaften und Spezifität des anti-Cacna2d3-Antikörpers von Santa Cruz

Im Rahmen der Immunfluoreszenzversuche zeigte sich bei Verwendung der primären Antikörper anti- β -Tubulin und anti-Cacna2d3 (S-14; Santa Cruz) an etwa jedem fünften bis zehnten Spiralganglien-Neuron ein deutlich stärkeres anti-Cacna2d3- als anti- β -Tubulin-Signal im jeweiligen Fluoreszenzkanal. An einigen Neuriten war ausschließlich ein anti-Cacna2d3-Signal detektierbar. Der Großteil der Somata der Spiralganglien-Neurone war ausschließlich β -Tubulin-positiv und zeigte allenfalls eine schwache Immunreaktivität gegenüber dem anti-Cacna2d3-Antikörper. Ein äquivalentes Muster zeigte sich bei Verwendung der primären Antikörper anti- β -Tubulin als Marker für Typ I Neurone (Barclay et al., 2010; Flores-Otero und Davis, 2011) und anti-Peripherin als Marker für Typ II Neurone (Barclay et al., 2010; Huang et al., 2007;

Mou et al., 1998). Dabei waren etwa 5 bis 10 % der Spiralganglien-Neurone Peripherin-positiv und somit Typ II Neurone. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob die stark Cacna2d3-positiven Spiralganglien-Neurone möglicherweise Typ II Neurone sind. Dies konnte in einem weiteren Immunfluoreszenzversuch mit anti-Cacna2d3 und anti-Peripherin als primären Antikörpern gezeigt werden, bei dem die Fluoreszenzsignale der genannten Antikörper kolokalisiert waren. In diesem Versuch waren die Fluoreszenzsignale beider Antikörper insbesondere an den Zellkörpern überlappend, während bei einem Anteil der Neurite ausschließlich anti-Cacna2d3-Signal detektiert wurde. Zu erklären ist dies damit, dass im basalen Abschnitt des Spiralganglions die $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle mit einer Dominanz gegenüber den übrigen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten exprimiert wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit über quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion von SG-cDNA nachgewiesen werden (4.2 Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene). Aufgrund dessen kann ihre Expression nicht auf Typ II Neurone beschränkt sein. Neurite, die zwar Cacna2d3, jedoch kein Peripherin exprimieren sind somit mit hoher Wahrscheinlichkeit Neurite von Typ I Neuronen und damit zahlreicher vorhanden. Nichtsdestotrotz scheint im Soma von Typ II Neuronen die

$\alpha_2\delta_3$ -Proteinexpression verstärkt. Sowohl Typ I als auch Typ II Neurone zeigen somit in unterschiedlichem Ausmaß Immunreaktivität gegenüber anti-Cacna2d3.

Der anti-Cacna2d3-Antikörper von Santa Cruz zeigte auch bei der Anwendung an $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen das gleiche Bild wie in Kontroll-Mäusen. Ausgehend von dieser Tatsache erscheint es zweifelhaft, ob dieser Antikörper spezifisch das Volllängenprotein der $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle erkennt. Die mRNA dieser Untereinheit umfasst 3710 bp, wobei die kodierende Region von 98 bis 3373 bp reicht (Information gemäß National Center for Biotechnology Information NM_009785.1, 2013: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/-NM_009785.1; UniProt Q9Z1L5, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Z1L5>). Bei der Generierung der $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus wurde allerdings erst ab Exon 15 das Mutationskonstrukt eingeführt (Neely et al., 2010; Information gemäß Mouse Genome Informatics, 2013: <http://www.informatics.jax.org/>; UniProt: Q9Z1L5, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Z1L5>). Mit anderen Worten kann der Anteil der mRNA, der in Leserichtung vor dem eingefügten Konstrukt liegt, ungehindert translatiert werden. Da ein Großteil, unter anderem die δ -Untereinheit und damit der Membrananker fehlt, sollte das entstehende Protein funktionslos sein und nicht an die korrekte Stelle in der Zellmembran transportiert werden können. Möglicherweise wird das noch produzierte verkürzte Protein intrazellulär vom Antikörper erkannt. Dies ist insofern wahrscheinlich, da laut Informationen des Herstellers Santa Cruz das Peptidantigen, das zur Herstellung des Antikörpers verwendet wurde, 15 Aminosäuren lang ist und innerhalb der Region von 350 bis 400 Aminosäuren des Volllängenproteins des humanen CACNA2D3 liegt (persönliche Mitteilung von Dervedde, Valeska, Firma Santa Cruz, 2013). Dieser Abschnitt fällt in der genomischen DNA in einen Bereich zwischen den Exons 10 bis 12 und liegt damit vor der Insertionsstelle des Mutationskonstrukts im Exon 15 (Information gemäß National Center for Biotechnology Information NM_018398.2, 2013: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/54112396>; sowie UniProt Q8IZS8, 2013: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IZS8>). Es ist unwahrscheinlich, dass das stark verkürzte $\alpha_2\delta_3$ -Protein korrekt posttranslational in Neuriten transportiert wird. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Proteinbiosynthese nicht auf den Zellkörper beschränkt sein muss, sondern auch in Neuriten stattfindet (zur Übersicht siehe: Jung und Holt, 2011; Jung et al., 2012). Die in den Neuriten detektierte anti-Cacna2d3-Immunreaktivität könnte somit von direkt vor Ort produziertem verkürzten Protein stammen.

5.4 Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene

Über die Expression der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Calciumkanäle in Spiralganglien wurden noch keine Daten veröffentlicht. Im Hinblick auf geplante elektrophysiologische Untersuchungen von Calciumströmen an dissoziierten Kulturpräparaten und auf das Vorhandensein eines $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mausmodells bot es sich an, zunächst die Expression der in Spiralganglien vorkommenden $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten ($\alpha_2\delta$ 1 bis 3) zu quantifizieren (Abbildung 4.4). Da es nicht möglich war, eine Zelltypen-spezifische Isolation allein der Spiralganglien-Neurone durchzuführen, waren in den Proben alle Zellen der Spiralganglien enthalten. Spannungsgesteuerte Calciumkanäle sollten jedoch allein von den Spiralganglien-Neuronen exprimiert werden. Gemäß einer Veröffentlichung von Chen et al., 2011 werden $Ca_v2.1$, $Ca_v2.3$ und $Ca_v3.1$ sowohl von Spiralganglien-Neuronen als auch von Satellitenzellen exprimiert. Der Expressionsnachweis erfolgte über Immunfluoreszenzfärbung. Bei kritischer Betrachtung der von Chen et al. vorgestellten Daten fällt auf, dass die Immunfluoreszenzfärbung zytosolisch lokalisiert ist, obwohl ein positiver Nachweis eher an der Plasmamembran erwartet werden würde. Es erfolgt weiterhin kein Nachweis der Spezifität der Antikörper in Mäusen mit Defizienz für die jeweilige Ca_v -Untereinheit (Chen et al., 2011). Somit ist zweifelhaft, ob $Ca_v2.1$, $Ca_v2.3$ und $Ca_v3.1$ tatsächlich von Satellitenzellen exprimiert werden.

In Bezug auf die in der vorliegenden Arbeit erhobenden Daten ist Folgendes festzustellen: In der apikal/medialen Hälfte der Cochlea war weder bei den Kontroll- noch bei den $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen eine Präferenz für eine der Untereinheiten $\alpha_2\delta$ 1 bis 3 erkennbar. In der basalen/midbasalen Hälfte der Cochlea waren in Kontroll-Mäusen alle 3 neuronalen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten exprimiert mit einer signifikant stärkeren Expression von $\alpha_2\delta_3$ gegenüber $\alpha_2\delta_1$ und tendenziell auch gegenüber $\alpha_2\delta_2$. In der basalen Cochlea der $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus war im Vergleich zu den Kontrollen die $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit stärker exprimiert. Mit einem p-Wert von 0,062 ist der genannte Expressionsunterschied zwar nicht signifikant, dies ist aber wahrscheinlich auf die geringe Anzahl von Proben kombiniert mit einer recht großen Variabilität zurückzuführen. Da der Großteil der Spiralganglien-Neurone Typ I Neurone sind (Barclay et al., 2010; Geisler, 1998), ist davon auszugehen, dass die genannten Expressionsunterschiede der Isoformen insbesondere auf das verstärkte Vorkommen von $\alpha_2\delta_3$ in Typ I Neuronen zurückzuführen sind.

Wegen der aufgeführten Transkriptzahlen (4.2 Expression von $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in Spiralganglien auf mRNA-Ebene) wird die Frage aufgeworfen, weshalb im Gewebe der $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus noch $\alpha_2\delta_3$ -Transkripte nachgewiesen werden. Dies ist damit zu erklären, dass aufgrund der

Konstruktion der $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Maus (2.6.1 $\alpha_2\delta_3$ -defizientes Mausmodell) und der Position der $\alpha_2\delta_3$ -spezifischen Primer für die TaqMan® quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (Schlick, 2009; Schlick et al., 2010; Tabelle 3.10) auch im Gewebe von $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen Transkripte erkannt werden konnten. Während die Mutationskassette erst ab Exon 15 in das Genom des Mausmodells eingefügt ist, binden die Primer der quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion an die Exone 5 bis 6 des murinen CACNA2D3-Gens (Information gemäß National Center for Biotechnology Information NM_009785.1, 2013: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_009785.1; National Center for Biotechnology Information, Primer-BLAST, 2013: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=13646-42148&job_key=JSID_01_279415_130.14.18.128_9003&CheckStatus=Check). Obwohl also eine veränderte mRNA vom Cacna2d3-Gen abgelesen wird, scheint von den Zellen der Spiralganglien im basalen Abschnitt der Cochlea erkannt zu werden, dass diese mRNA zu einem nicht funktionalen Protein führt. Ansonsten ist nicht zu erklären, dass die verkürzte mRNA von $\alpha_2\delta_3$ gegenüber der Kontrolle signifikant verringert und die mRNA von $\alpha_2\delta_2$ erhöht ist. Die dargestellten Veränderungen im Vorkommen der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten lassen somit auf eine kompensatorisch verstärkte Expression der $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit in basalen Spiralganglien-Neuronen von $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäusen schließen. Diese führt jedoch nicht zu einem Ausgleich der genetisch bedingten Störung des auditorischen Phänotyps (Pirone et al., 2013, eingereicht).

5.5 TYF-Mäuse

2 der getesteten TYF-Sublinien zeigten eYFP-Fluoreszenz in den Spiralganglien-Neuronen: TYFc und TYFe. Der Nachweis der Fluoreszenz war schon vor dem Hörbeginn, dem postnatalen Tag 12, möglich. Aus einer früheren Veröffentlichung über diese Sublinien (Winter et al., 2007) geht hervor, dass in respiratorischen Neuronen des Hirnstamms der Nachweis der eYFP-Expression erst am postnatalen Tag 6 gelang und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, am postnatalen Tag 4. Somit scheinen die Neurone der Hörbahn die eYFP-Fluoreszenz früher zu exprimieren. Damit bietet sich diese Mauslinie als wertvolles Instrument für Kulturen neonataler Spiralganglien-Neurone an. Die Kulturpräparate müssen nicht mehr fixiert und mit Antikörpern gefärbt werden, um die Spiralganglien-Neurone eindeutig zu identifizieren. Vielmehr ist dies bei lebenden Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops möglich. Für zukünftige Versuche bietet es sich an, die TYFc- und TYFe-Sublinien in andere Mauslinien, wie beispielsweise die $\alpha_2\delta_3$ -defizienten Mäuse einzukreuzen, um so die Identifizierung der Spiralganglien-Neurone etwa für Patch-Clamp-Messungen an dissoziierten Primärkulturen zu erleichtern.

5.6 Myelinisierung der murinen Spiralganglien-Neurone

Die Spiralganglien-Neurone vom Typ I der Ratte sind bis zum postnatalen Tag 7 praktisch nicht myelinisiert. Erst später bildet sich eine Myelinhülle, welche zunächst aus lockeren Promyelinlamellen besteht, die während der weiteren Entwicklung zunehmend fester werden (Romand und Romand, 1985). Die Myelinisierung beginnt zwischen den postnatalen Tagen 4 bis 6 zunächst peripher an den Neuriten und setzt sich dann zwischen den postnatalen Tagen 6 bis 8 an den neuronalen Zellkörpern fort (Romand und Romand, 1985). Typ II Neurone sind dagegen gar nicht myelinisiert (Hafidi, 1998; Reid et al., 2004; Rusznák und Szűcs, 2009). Unter Bedingungen, bei denen adulte Spiralganglien-Neurone von Ratten längere Zeit (7 Tage) in Kultur sind, lösen sich die Schwann-Zellen spontan von den Neuronen ab, wodurch die neuronalen Zellkörper für elektrophysiologische Messungen zugänglich werden (Ripoll und Rebillard, 1997). Diese Untersuchungen wurden auch an anderen Spezies gemacht und ergaben ähnliche, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse: Einigen Quellen zufolge zeigen die Spiralganglien-Neurone von Mäusen zwischen den postnatalen Tagen 0 bis 8 keine Myelinisierung (zur Übersicht siehe Adamson et al., 2002; Hansen et al., 2001; Lin et al., 1998). Dem stehen die Beobachtungen gegenüber, die im Verlauf dieser Arbeit gemacht wurden (Abbildung 4.2). Die Spiralganglien-Neurone von neonatalen Mäusen zeigen im Alter von 2 (dem frühesten untersuchten Zeitpunkt)

bis 7 Tagen eine deutliche Myelinisierung der Neurite und Somata. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen *Myelin Basic Protein* gezeigt werden (Chen et al., 2011). MBP ist peripher an der extrazellulären Grenzschicht des Myelins lokalisiert (Information gemäß Dako, 2013: <http://www.dako.com/de/download.pdf?objectid=106938003>). Zudem waren den Spiralganglien-Neuronen „aufsitzende“ Schwann-Zellen im differentiellen Interferenzkontrast erkennbar (Abbildung 4.2; Bild F). Diese blieben größtenteils auch nach dem Vereinzeln der Zellen für die Kultivierung bestehen.

Neben ihrer Hauptaufgabe, der elektrischen Isolation von Typ I Neuronen, besteht eine weitere physiologische Aufgabe der Schwann-Zellen in der Cochlea darin, Wachstumsfaktoren herzustellen und zu sezernieren. Damit unterstützt eine intakte Myelinhülle nicht nur die Regeneration von Neuriten nach einem Trauma (Hansen et al., 2001), sondern auch die Entwicklung der Spiralganglien-Neurone (Davies, 1998). Vor diesem Hintergrund betrachtet wirkt sich die in der Kultur erhaltene Myelinhülle protektiv auf das Überleben der Spiralganglien-Neurone aus, da den Neuriten während der Präparation Schaden zugefügt wird. Um die Spiralganglien-Neurone vom Modiolus frei zu präparieren, müssen die zentralen Neurite durchtrennt werden. Außerdem nehmen die peripheren Neurite bei der Entfernung der Haarzellen Schaden. Für zukünftige elektrophysiologische Untersuchungen ist es von besonderer Relevanz eine Möglichkeit zu finden, die Myelinhüllen zu entfernen, ohne dabei die zelluläre Integrität der Spiralganglien-Neurone zu verletzen. Dies könnte beispielsweise über das Entfernen durch Abreißen oder Absaugen der Schwann-Zellen von den Somata der Spiralganglien-Neurone im elektrophysiologischen Präparat unmittelbar vor einem Versuch geschehen (Lin und Chen, 2000).

5.7 Optimierung des Zellkulturprotokolls

Die Spiralganglien-Neurone liegen eng eingehüllt im knöchernen Rosenthal-Kanal der Cochlea (Rusznák und Szűcs, 2009). Im neonatalen Alter (P2 bis P8) sind sie von einer Knorpelhülle umgeben (zur Übersicht siehe Adamson et al., 2002). Eigene Erfahrungen mit der Präparation dieser Zellen haben gezeigt, dass insbesondere im tief basalen Teil der Cochlea die Spiralganglien-Neurone im Alter von wenigen Tagen meist nicht erhalten werden können. Dies liegt wohl daran, dass der Reifungsprozess der Cochlea von basal nach apikal fortschreitet, weshalb dort die Lamina spiralis ossea meist schon zu fest ist, um sie mit Pinzetten abpräparieren zu können (Geisler, 1998). Bei der Präparation geht folglich ein Teil der Spiralganglien-Neurone verloren. Bezogen auf den Präparationserfolg gilt Ähnliches auch für den Bereich der Cochleaspitze, das

Helicotrema. Dort ist der Rosenthal-Kanal deutlich schmaler als basal, weshalb die Feinheit der feinsten Pinzetten und die Auflösung des Präparationsmikroskops kaum ausreichen, um die Strukturen deutlich voneinander zu trennen. Somit ergibt sich, dass weniger als 100 % der Spiralganglien-Neurone einer Cochlea für die Versuche im Rahmen der Zellkultur verwendet werden konnten.

Mäuse besitzen etwa 12.350 Spiralganglien-Neurone pro Cochlea (Ehret, 1983). Letztendlich befanden sich nach 24 Stunden in Kultur in der Versuchsreihe zu den verschiedenen Deckglasbeschichtungen auf den mit Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Deckgläsern noch durchschnittlich 484 ± 78 Spiralganglien-Neurone einer Cochlea (Abbildung 4.10). Somit waren nach 24 Stunden noch $3,9 \pm 0,6$ % aller Spiralganglien-Neurone vorhanden. Dies war die beste erreichte Überlebensrate. Bei den Tests, ob sich bei Zugabe von Wachstumsfaktoren (GDNF: 100 pg/ml, FGF2: 10 ng/ml) das Überleben der Spiralganglien-Neurone verbessert, mussten Enzyme (Collagenase, Trypsin, Dnase I) jeweils aus einer neuen Charge zur Dissoziation benutzt werden (Abbildung 4.11). Dabei wurde festgestellt, dass die Anzahl der überlebenden Spiralganglien-Neurone nach 24 Stunden in Kultur auf 272 ± 111 pro Cochlea in der Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren verringert war. Dies ist am ehesten auf den Einfluss der neuen Enzymchargen zurückzuführen. Prozentual betrachtet wurde die Anzahl der überlebenden Spiralganglien-Neurone gemessen an der besten Überlebensrate etwa um die Hälfte reduziert ($2,2 \pm 1$ % im genannten Fall gegenüber $3,9 \pm 0,6$ %).

Hegarty et al. (1997) konnten für die Primärkultur dissoziierter Spiralganglien-Neurone von 5 Tage alten Ratten nach 48 Stunden in Kultur ein Überleben von 0,15 % der Spiralganglien-Neurone einer Cochlea zeigen. Dabei nutzten sie ein vergleichbares Protokoll. So erfolgte die Präparation der Cochlea in eisgekühlter phosphatpufferter Salzlösung. Die Spiralganglien-Neurone wurden dabei in eisgekühlter HBSS-Lösung (inklusive Ca^{2+} und Mg^{2+}) gesammelt. Anschließend erfolgte der enzymatische Gewebeverdau. Als Komponenten der Lösung seien hier die Enzyme Collagenase, Trypsin und DNase I genannt, die in HBSS-Lösung (Ca^{2+} und Mg^{2+} frei) gelöst wurden. Nach 25 Minuten Inkubation wurde der Enzymverdau durch Zugabe von FCS gestoppt. Die folgende mechanische Vereinzelung geschah mit an der Spitze angeschmolzenen Pasteurpipetten aus Glas. Nach 3 Waschschritten mit serumfreien *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-Lösung) folgte ein Waschschrift mit fertigem Kulturmedium. Anschließend wurden die Zellen auf Poly-Ornithin und Laminin beschichtete Kulturschalen ausplattiert, wo sie für 4 Stunden adhärirten, bevor Kulturmedium zugefügt wurde (Hegarty et al., 1997).

Im Unterschied zu dem von Hegarty verwendeten Protokoll wurde in der vorliegenden Arbeit Neurobasal®-A als Basis des Kulturmediums verwendet. Neurobasal®-A stellt in seiner Zusammensetzung eine Weiterentwicklung der DMEM-Lösung dar (Information gemäß Invitrogen, 2013: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/21103049>). Durch die Zugabe von B27® SerumFree Supplement und GlutaMAX™-I Supplement (Balazs, 2006) sowie den Antibiotika Penicillin und Streptomycin entsteht ein Kulturmedium, das speziell auf die Bedürfnisse (neonataler) neuronaler Zellen angepasst ist (Brewer et al., 1993; zur Übersicht siehe Konur und Ghosh, 2005; Vieira et al., 2007; Information gemäß Invitrogen, 2013: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/21103049>). Ein positiver Aspekt der Zugabe von B27® SerumFree Supplement ist, dass durch die enthaltenen antioxidativen Komponenten Katalase, Glutathion, Superoxiddismutase und Vitamin E (α -Tocopherol-Acetat, DL α -Tocopherol) oxidativer Stress für die Spiralganglien-Neurone reduziert wird (Information gemäß Invitrogen, 2013: <http://de-de.invitrogen.com/-site/de/de/home/support/Product-Technical-Resources/media-formulation.250.html>). Außerdem ist dem Medium in dieser Form bereits Insulin als endogener Wachstumsfaktor zugesetzt. Um möglichst stabile Umgebungsbedingungen für die vereinzelt Spiralganglien-Neurone zu schaffen, erfolgten alle Waschschrte im Gegensatz zum von Hegarty genutzten Protokoll mit vorgewärmtem Kulturmedium. Außerdem wurde als Beschichtung für die Deckgläser eine Mischung von Poly-D-Lysin (statt Poly-Ornithin) und Laminin (Vieira et al., 2007; Wei et al., 2007) verwendet, weil dies die Anzahl der Spiralganglien-Neurone pro Deckglas im Vergleich zur alleinigen Poly-D-Lysin-Beschichtung signifikant erhöhte (Abbildung 4.10).

Wie zuvor erläutert, lag trotz dieser Maßnahmen das Überleben der Spiralganglien-Neurone nach Kultivierung bis maximal 24 Stunden zwischen $2,2 \pm 1$ und $3,9 \pm 0,6$ %. Das eingeschränkte Überleben der Spiralganglien-Neurone lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen: (i) präparationsbedingte Schäden; (ii) übermäßige Wirkung der Enzyme; (iii) Schäden durch die mechanische Vereinzelung; (iv) Fehlen der natürlichen Stimulation durch die Umgebungszellen, (v) eventuelle Hypoxie des Gewebes und damit auch Hypoxie der Spiralganglien-Neurone während der Präparation. Der präparationsbedingt ausgelöste Stress für die Spiralganglien-Neurone lässt sich nur in geringem Umfang reduzieren. Die Prozedur führt zwangsläufig immer zu einem Abreißen der peripheren und zentralen Neurite und zum Einstrom von Calcium in die Zellen. Es wurde bei der hier vorgestellten Arbeit darauf geachtet, die Präparationszeit möglichst kurz zu halten, da schon nach 20 Minuten die Afferenzen der Cochlea durch oxidativen Stress geschädigt werden können (Pujol et al., 1992). Des Weiteren wurden feinste Pinzetten verwendet, die eine möglichst geringe

Gewebeauflagefläche bei gleichzeitig präzisiertem Griff ermöglichen. Außerdem wurde zur Präparation eine für das Innenohr physiologische Lösung genutzt. Die B01-Lösung ist in ihrer Ionenzusammensetzung an die Perilymphe angeglichen. Zudem wurde sie zuvor auf Eis gekühlt, um den Energieverbrauch der Spiralganglien-Neurone zu verringern. Während des Enzymverdaus wurde HBSS-Lösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} genutzt, damit die genannten Ionen nicht durch die geschädigten Neurite oder die eventuell permeabel gewordene Zellmembran in die Spiralganglien-Neurone gelangen, wo sie Apoptose auslösen könnten.

Diejenigen Spiralganglien-Neurone, die während des Vereinzeln und Ausplattierens geschädigt werden, sollten innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden der Kultur zugrunde gehen (Hansen et al., 2001). Aufgrund dessen sollte die Zahl der überlebenden Spiralganglien-Neurone nach 24 bis 48 Stunden in Kultur nur noch langsam abfallen, das heißt annähernd konstant bleiben (Hansen et al., 2001). Ausgehend von dieser Aussage können die Zahlen für das neuronale Überleben bei Hegarty mit denen der vorliegenden Arbeit in Relation gesetzt werden: nach 48 Stunden waren bei Hegarty noch 0,15 % der Spiralganglien-Neurone einer Cochlea vorhanden (Hegarty et al., 1997) gegenüber $2,2 \pm 1$ bis $3,9 \pm 0,6$ % der Spiralganglien-Neurone, die in den hier dargestellten Versuchen nach maximal 24 Stunden erhalten werden konnten. Dies entspricht einer etwa 30-fach höheren Zahl von überlebenden Spiralganglien-Neuronen. Höhere Überlebensraten von Spiralganglien-Neuronen als hier vorgestellt haben Vieira et al. (2007) veröffentlicht: Bei der dissoziierten Primärkultur adulter (P30 bis P73) muriner Spiralganglien-Neurone überlebten nach 4 Tagen noch 6 % der Spiralganglien-Neurone einer Cochlea, etwa doppelt so viele wie in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Die Autoren verwendeten die Enzyme Dispase und Collagenase I. Die hohe Überlebensrate erstaunt insofern, da es sich hierbei um Primärkulturen dissoziierter adulter Spiralganglien-Neurone handelt, bei denen die Überlebensrate üblicherweise geringer ist als bei neonatalen Spiralganglien-Neuronen (Lv et al., 2010, 2012; Wei et al., 2007). Es muss angemerkt werden, dass der Nachweis von Spiralganglien-Neuronen über einen anti- β -Tubulin-Antikörper (monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen β III-Tubulin der Firma Covance) und eine Diaminobenzidin-Farbreaktion durchgeführt wurde. Diese Farbreaktion ist dem Nachweis durch Immunfluoreszenz unterlegen (siehe Abbildungen in Hafidi et al., 2005). Außerdem wurden keine Negativkontrollen gezeigt (Vieira et al., 2007). Möglicherweise wurde von den Autoren aufgrund der verwendeten Identifizierungsmethode die Zahl der vorhandenen Spiralganglien-Neurone überschätzt.

Alle bis hierhin vorgestellten Neuronenzahlen beziehen sich jeweils auf Kulturbedingungen, bei denen der Kultur keinerlei exogene Wachstumsfaktoren wie NT 3, BDNF, GDNF oder FGF 2 zugeführt wurden. Es blieb also die Frage offen, ob der Zusatz von Wachstumsfaktoren das Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur verbessern kann.

5.8 Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur bei Zugabe von Wachstumsfaktoren

In einer Veröffentlichung von Wei et al. (2007) wird der positive Effekt der beiden Wachstumsfaktoren GDNF und FGF 2 auf das Überleben adulter muriner Spiralganglien-Neurone in einer dissoziierten Primärkultur thematisiert. Die Autoren testeten den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Zahl der überlebenden Spiralganglien-Neurone sowohl einzeln als auch in unterschiedlichen Kombinationen. Dabei zeigte sich der stärkste positive Effekt auf das Überleben der Spiralganglien-Neurone bei Zugabe von 100 pg/ml GDNF und 10 ng/ml FGF 2. Nach einer Woche waren in der Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktoren noch 3,2 % der Spiralganglien-Neurone einer Cochlea vorhanden, während die Zugabe der genannten Wachstumsfaktoren zu einem Anteil überlebender Spiralganglien-Neurone von 14,6 % einer Cochlea führte (Wei et al., 2007). Dissoziierte Präparate wurden in der vorliegenden Dissertation nicht über einen länger als 48 Stunden dauernden Zeitraum kultiviert. So erfolgte in dieser Arbeit der Zusatz von GDNF und FGF 2 in den von Wei et al. (2007) verwendeten Konzentrationen. Das Auszählen der Spiralganglien-Neurone erfolgte jedoch schon nach Kultivierung über Nacht (3.2.4.9 Etablierung der Zellkulturversuche zur Verbesserung des Überlebens der Spiralganglien-Neurone). In dem betrachteten Zeitraum war kein Effekt der Zugabe der Wachstumsfaktoren nachweisbar (Abbildung 4.11). Dies könnte darin begründet sein, dass GDNF und FGF 2 über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden wirken und der Zeitraum von 14 bis maximal 24 Stunden nicht ausreichte, um einen nachweisbaren Effekt zu erzielen. Als Konsequenz wurde nachfolgend die Kultivierungszeit auf maximal 48 Stunden verdoppelt. In dem betrachteten Zeitraum verschlechterte sich wider Erwarten das Überleben der Spiralganglien-Neurone auf durchschnittlich $0,4 \pm 0,3$ % bei Zugabe der genannten Wachstumsfaktoren. In der Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren waren noch $0,9 \pm 0,7$ % der Spiralganglien-Neurone vital. Diese Werte liegen deutlich über den von Hegarty et al. (1997) veröffentlichten Zahlen (0,15 % nach 2 Tagen ohne Wachstumsfaktoren). Andererseits ist das Überleben der Spiralganglien-Neurone deutlich geringer als in der von Wei et al. (2007) vorgestellten Publikation (3,2 % Überleben nach 1 Woche in der Kontrollgruppe, 14,6 % bei Zugabe von Wachstumsfaktoren). Bei Verwendung eines ähnlichen

Kulturmediums (Neurobasal ®-A, B27 ® SerumFree Supplement [2%], L-Glutamin [0.5mM] und Penicillin [100U/ml]) und identischer Deckglasbeschichtung (Poly-D-Lysin/Laminin) könnte dieser Effekt möglicherweise auf unterschiedliche Wirksamkeit der Wachstumsfaktoren zurückzuführen sein. Die Wachstumsfaktoren stammen verglichen mit der Publikation von Wei et al. (2007) teilweise sowohl von anderen Herstellern als auch aus anderen Chargen (Wei et al., 2007; Tabelle 3.10) und könnten somit eine unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen. Weiterhin ist zu überlegen, ob das Alter der verwendeten Mäuse einen Einfluss auf das Versuchsergebnis nimmt. So konnten

Wei et al. (2007) den protektiven Effekt der Wachstumsfaktoren bei adulten Mäusen nachweisen, während diese Ergebnisse bei neonatalen Mäusen (P5; Abbildung 4.11) wider Erwarten nicht reproduziert werden konnten. Über in-situ-Hybridisierung wurde bei neonatalen Ratten gezeigt, dass deren Spiralganglien-Neurone GDNF-Rezeptoren exprimieren (Ylikoski et al., 1998). Unter diesem Gesichtspunkt ist es wahrscheinlich, dass eine GDNF-Wirkung auch in neonatalen murinen Spiralganglien-Neuronen besteht. Dasselbe gilt für FGF 2: In einer Arbeit von Hossain und Morest (2000) wurde gezeigt, dass FGF 2 bei embryonalen Mäusen eine wichtige Rolle bei der Migration und initialen Differenzierung von Spiralganglien-Neuronen spielt. Da das murine Hörorgan postnatal weiter ausreift (Pickles, 1988) und ein positiver FGF 2-Effekt bei adulten Mäusen gezeigt werden konnte (Wei et al., 2007) ist es wahrscheinlich, dass der über FGF 2 vermittelte Effekt nach der Geburt weiter anhält. Aufgrund des unerwarteten Ergebnisses (tendenziell geringeres Überleben der Spiralganglien-Neurone bei Zugabe der Wachstumsfaktoren nach 48 Stunden Kultur) sollte dieser Versuchsteil zukünftig wiederholt werden. Dabei könnte eine größere Zahl an Einzelversuchen durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede an Versuchstagen auszugleichen. Weiterhin könnten die Wachstumsfaktoren in anderen Konzentrationen verwendet werden. Auch die zum Aufbrechen des Gewebeverbandes genutzten Enzyme (Collagenase, Trypsin und DNase I) sollten beim Start einer neuen Versuchsreihe ausgetauscht werden.

5.9 Variabilität im Überleben der Spiralganglien-Neurone in der dissoziierten Zellkultur

Generell war die Variabilität der Überlebensraten der Spiralganglien-Neurone in den hier vorgestellten Versuchen recht hoch. Beispielsweise schwankte das mittlere Überleben zwischen $2,2 \pm 1$ und $3,9 \pm 0,6$ % bei einer Kultivierungsdauer von 14 bis maximal 24 Stunden ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (Abbildung 4.10; Abbildung 4.11). Bei einer Kultivierung über 48 Stunden lag das Überleben der Spiralganglien-Neurone nur noch bei $0,9 \pm 0,7$ %, obwohl gemäß Hansen et

al. (2001) ähnliche Überlebensraten wie nach 24 Stunden zu erwarten wären. Es ist insofern wahrscheinlich, dass zum jetzigen Zeitpunkt schwer kontrollierbare Faktoren wie die Enzymwirkung Einfluss auf das Überleben der Spiralganglien-Neurone nehmen. Die Qualität des enzymatischen Aufbrechens des Gewebes kann durch die jeweilige Enzymcharge, wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Enzymlösung sowie unterschiedliche Umgebungstemperatur beeinflusst werden. Ein anderer Aspekt ist beim mechanischen Vereinzeln zu beachten: Durch das Anschmelzen der Pipettenspitzen ergeben sich unterschiedliche Öffnungsdurchmesser und teilweise glattere oder auch schärfere Ränder, an denen die Spiralganglien-Neurone geschert und verletzt werden können. Ein Ziel zukünftiger Versuche ist es deshalb, die einzelnen Arbeitsschritte so weit zu standardisieren, dass der Einfluss dieser Faktoren möglichst gering oder zumindest kontrollierbar wird.

5.10 Klinische Relevanz

In der heutigen alternden Gesellschaft wird die mit dem Alter auftretende Schwerhörigkeit, die sogenannte Presbyakusis, zu einem immer wichtigeren Thema. Teilweise ist dieser Hörverlust auf einen natürliche Alterungsprozesse zurückzuführen, teilweise aber auch bedingt durch die steigende Belastung durch Umweltlärm. Von der Presbyakusis, die zu 60 % genetisch bedingt ist (Liu und Yan, 2007), sind insbesondere Männer stärker betroffen (Van Eyken et al., 2007). Schwerhörigkeit oder Hörverlust im Allgemeinen ist nicht allein ein Problem der alternden Gesellschaft, sondern betrifft oft schon Kinder. So kommt beispielsweise 1 von 1000 Kindern mit starker Schwerhörigkeit oder Taubheit zur Welt. Von diesen Fällen sind etwa 60 % genetisch und 40 % durch äußere Faktoren, etwa Infektionen, Jodmangel oder Entwicklungsstörungen bedingt (Probst et al., 2008). Nach Ort und Art der Schädigung des Gehörs erfolgt eine Unterscheidung in eine Schallleitungs- und eine Schallempfindungsschwerhörigkeit. Bei ersterer ist die Schallweiterleitung bis zu den Sinneszellen beeinträchtigt, beispielsweise bei einer Versteifung der Gehörknöchelchenkette. Von einer Schallempfindungsschwerhörigkeit spricht man, wenn das Corti-Organ selbst betroffen ist (Probst et al., 2008). Abhängig davon, ob es sich um eine Schallleitungs- oder eine Schallempfindungsschwerhörigkeit handelt, kann ein Hörverlust heutzutage in vielen Fällen effektiv, teilweise aber noch unzureichend mit Hörhilfen, sei es in Form von konventionellen Hinter-dem-Ohr Hörgeräten, knochenverankerten Hörgeräten (BAHA, *Bone Anchored Hearing Aid*), hörverbessernden Operationen (Tympanoplastiken) oder Cochleaimplantaten versorgt werden. Letztgenannte sind Hilfsmittel der Wahl bei höchstgradiger Schwerhörigkeit, insbesondere wenn die

Haarzellen im Corti-Organ betroffen sind. Die Elektrode des Cochleaimplantats dient als Bypass für die Haarzellen, weil die Neurite der Spiralganglien-Neurone direkt von ihr stimuliert werden können (Wei et al., 2007). Alle diese hörverbessernden Maßnahmen setzen intakte Spiralganglien-Neurone voraus. Das Hauptproblem bei dieser Art des Hörsatzes ist, dass eine Schädigung der Sinneszellen des auditorischen Systems im Verlauf häufig dazu führt, dass die nachgeschalteten Spiralganglien-Neurone ebenfalls degenerieren (Incesulu und Nadol, 1998; Khan et al., 2005; Lv et al., 2012). Zum Einen kann dieser Effekt auf mangelnde elektrische Stimulation durch die Haarzellen zurückgeführt werden, zum Anderen auf reduzierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Corti-Organ. Die Degeneration der Spiralganglien-Neurone ist weiterhin von interindividuellen und noch nicht genauer charakterisierten Faktoren abhängig. So sind einige Fallberichte publiziert, bei denen es trotz jahrzehntelanger Taubheit durch beidseitige Implantation von Cochleaimplantaten gelang, einen binauralen Höreindruck wiederherzustellen (McNeill et al., 2012; Portmann et al., 2007).

Mit der Etablierung eines Zellkultursystems können verschiedene Ziele verfolgt werden. Einerseits ist es möglich durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium das neuronale Überleben und Neuritenwachstum zu studieren und auf diese Art Beschichtungen für die Elektroden des Cochleaimplantats zu entwickeln, damit die degenerierten Neurite gezielt auf diese zuwachsen und ein direkter Kontakt der einzelnen Komponenten gewährleistet wird. Möglicherweise kann durch die Applikation geeigneter Wachstumsfaktoren direkt ins Innenohr die Degeneration der Spiralganglien-Neurone primär vermieden oder ihre Regeneration gefördert werden. Andererseits können im dissoziierten Präparat elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Wenn genaueres Wissen über die Verteilung von Ionenkanälen und deren elektrische Eigenschaften erlangt wird, könnten zukünftig leistungsfähigere Cochleaimplantate entwickelt werden. Mit dem Ziel die Qualität des durch das Cochleaimplantat vermittelten Höreindrucks zu verbessern, könnten die Spiralganglien-Neurone gezielt und fein moduliert elektrisch angeregt werden. Von Seiten der Diagnostik könnten Tiermodelle dazu dienen klinisch bekannte, pathophysiologisch jedoch noch nicht verstandene Formen der Degeneration von Spiralganglien-Neuronen zu studieren um mögliche zelluläre und molekulare Krankheitsmechanismen aufzudecken oder um andererseits protektive Faktoren zu identifizieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Adamson, C.L., Reid, M.A., Mo, Z.-L., Bowne-English, J., Davis, R.L. (2002). Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. *The Journal of Comparative Neurology* 447, 331–350.
2. Anniko, M., Thornell, L.E., Virtanen, I. (1987). Cytoskeletal organization of the human inner ear. *Acta Otolaryngol Suppl* 437, 5–76.
3. Arikath, J., Campbell, K.P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Current Opinion in Neurobiology* 13, 298–307.
4. Ashmore, J.F., Géléoc, G.S.G., Harbott, L. (2000). Molecular mechanisms of sound amplification in the mammalian cochlea. *PNAS* 97, 11759–11764.
5. Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., et al. (2011). Loss of $Ca_v1.3$ (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature Neuroscience* 14, 77–84.
6. Balazs, R. (2006). Trophic effect of glutamate. *Curr Top Med Chem* 6, 961–968.
7. Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S.L., Letts, V.A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K.M., Kusumi, K., et al. (2001). Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 21, 6095–6104.
8. Barclay, M., Julien, J.-P., Ryan, A.F., Housley, G.D. (2010). Type III intermediate filament peripherin inhibits neuritogenesis in type II spiral ganglion neurons in vitro. *Neurosci Lett* 478, 51–55.
9. Bauer, C.S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., Kadurin, I., Ranjan, Y.S., Fernandez-Alacid, L., Millar, N.S., et al. (2009). The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha_2\delta-1$ to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha_2\delta$ ligand pregabalin. *J. Neurosci.* 29, 4076–4088.
10. Bauer, C.S., Tran-Van-Minh, A., Kadurin, I., Dolphin, A.C. (2010). A new look at calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits. *Current Opinion in Neurobiology* 20, 563–571.
11. Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., et al. (2010). *Duale Reihe Physiologie* (Stuttgart: Thieme).
12. Von Békésy, G. (1960). *Experiments in Hearing* (New York: Mc Graw Hill Inc.).
13. Brandt, N., Kuhn, S., Münkner, S., Braig, C., Winter, H., Blin, N., Vonthein, R., Knipper, M., Engel, J. (2007). Thyroid hormone deficiency affects postnatal spiking activity and expression of Ca^{2+} and K^{+} channels in rodent inner hair cells. *J. Neurosci.* 27, 3174–3186.

14. Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567–576.
15. Catterall, W.A., Seagar, M.J., Takahashi, M. (1988). Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 263, 3535–3538.
16. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57, 411–425.
17. Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
18. Chen, W.C., Davis, R.L. (2006). Voltage-gated and two-pore-domain potassium channels in murine spiral ganglion neurons. *Hearing Research* 222, 89–99.
19. Chen, W.C., Xue, H.Z., Hsu, Y. (Lucy), Liu, Q., Patel, S., Davis, R.L. (2011). Complex distribution patterns of voltage-gated calcium channel α -subunits in the spiral ganglion. *Hearing Research* 278, 52–68.
20. Cole, R.L., Lechner, S.M., Williams, M.E., Prodanovich, P., Bleicher, L., Varney, M.A., Gu, G. (2005). Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta ($\alpha_2\delta$) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *The Journal of Comparative Neurology* 491, 246–269.
21. Davies, A.M. (1998). Neuronal survival: Early dependence on Schwann cells. *Current Biology* 8, R15–R18.
22. Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C.S., Pratt, W.S., Dolphin, A.C. (2010). The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1654–1659.
23. Davis, H. (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hearing Research* 9, 79–90.
24. Dickman, D.K., Kurshan, P.T., Schwarz, T.L. (2008). Mutations in a *Drosophila* $\alpha_2\delta$ voltage-gated calcium channel subunit reveal a crucial synaptic function. *J. Neurosci.* 28, 31–38.
25. Dolphin, A.C. (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 237–244.
26. Dolphin, A.C. (2012). Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 542–555.
27. Echterler, S.M., Nofsinger, Y.C. (2000). Development of ganglion cell topography in the postnatal cochlea. *The Journal of Comparative Neurology* 425, 436–446.
28. Ehret, G. (1983). Peripheral anatomy and physiology II. In Willot, J.F. (Ed.) *The Auditory Psychobiology of the Mouse*, (Springfield: Charles C. Thomas), pp. 169–200.

29. Ehret, G. (1985). Behavioural studies on auditory development in mammals in relation to higher nervous system functioning. *Acta Otolaryngol Suppl* 421, 31–40.
30. Van Eyken, E., Van Camp, G., Van Laer, L. (2007). The complexity of age-related hearing impairment: Contributing environmental and genetic factors. *Audiology and Neurotology* 12, 345–358.
31. Flores-Otero, J., Davis, R.L. (2011). Synaptic proteins are tonotopically graded in postnatal and adult type I and type II spiral ganglion neurons. *J Comp Neurol* 519, 1455–1475.
32. Geisler, C. (1998). *From Sound to Synapse- Physiology of the mammalian ear* (New York: Oxford University Press).
33. Hafidi, A., Després, G., Romand, R. (1993). Ontogenesis of type II spiral ganglion neurons during development: peripherin immunohistochemistry. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11, 507–512.
34. Hafidi, A. (1998). Peripherin-like immunoreactivity in type II spiral ganglion cell body and projections. *Brain Research* 805, 181–190.
35. Hafidi, A., Beurg, M., Dulon, D. (2005). Localization and developmental expression of BK channels in mammalian cochlear hair cells. *Neuroscience* 130, 475–484.
36. Hansen, M.R., Zha, X.-M., Bok, J., Green, S.H. (2001). Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons *In Vitro*. *J. Neurosci.* 21, 2256–2267.
37. Hegarty, J.L., Kay, A.R., Green, S.H. (1997). Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and is additive with that by neurotrophins or cAMP and requires elevation of $[Ca^{2+}]_i$ within a set range. *J. Neurosci.* 17, 1959–1970.
38. Holzapfel, B., Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in Unserer Zeit* 37, 120–126.
39. Hossain, W.A., Morest, D.K. (2000). Fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) promote migration and neurite growth of mouse cochlear ganglion cells in vitro: Immunohistochemistry and antibody perturbation. *Journal of Neuroscience Research* 62, 40–55.
40. Huang, L.-C., Thorne, P.R., Housley, G.D., Montgomery, J.M. (2007). Spatiotemporal definition of neurite outgrowth, refinement and retraction in the developing mouse cochlea. *Development* 134, 2925–2933.
41. Hudspeth, A.J. (1989). How the ear's works work, Published Online: 05 October 1989; Doi:10.1038/341397a0 *341*, 397–404.
42. Huppelsberg, J., Walter, K. (2009). Auditorisches System und Gleichgewichtssinn. In *Kurzlehrbuch Physiologie*, (Stuttgart: Thieme), pp. 337–352.
43. Incesulu, A., Nadol, J.B., Jr (1998). Correlation of acoustic threshold measures and spiral ganglion cell survival in severe to profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 107, 906–911.

44. Johnson, S.L., Eckrich, T., Kuhn, S., Zampini, V., Franz, C., Ranatunga, K.M., Roberts, T.P., Masetto, S., Knipper, M., Kros, C.J., et al. (2011). Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat Neurosci* 14, 711–717.
45. De Jongh, K.S., Warner, C., Catterall, W.A. (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* 265, 14738–14741.
46. Jung, H., Holt, C.E. (2011). Local translation of mRNAs in neural development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2, 153–165.
47. Jung, H., Yoon, B.C., Holt, C.E. (2012). Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 308–324.
48. Khan, A.M., Handzel, O., Burgess, B.J., Damian, D., Eddington, D.K., Nadol, J.B. (2005). Is word recognition correlated with the number of surviving spiral ganglion cells and electrode insertion depth in human subjects with cochlear implants? *The Laryngoscope* 115, 672–677.
49. Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Münkner, S., Knipper, M., Engel, J. (2007). Persistence of $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J. Neurosci.* 27, 6442–6451.
50. Konur, S., Ghosh, A. (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46, 401–405.
51. Kros, C.J., Ruppertsberg, J.P., Rüscher, A. (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394, 281–284.
52. Kuhn, S., Knirsch, M., Rüttiger, L., Kaspersek, S., Winter, H., Freichel, M., Flockerzi, V., Knipper, M., Engel, J. (2009). Ba^{2+} currents in inner and outer hair cells of mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel subunits β_3 or β_4 . *Channels* 3, 366–376.
53. Liberman, M.C., Gao, J., He, D.Z.Z., Wu, X., Jia, S., Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419, 300–304.
54. Lin, K.-H., Oleskevich, S., Taschenberger, H. (2011). Presynaptic Ca^{2+} influx and vesicle exocytosis at the mouse endbulb of Held: a comparison of two auditory nerve terminals. *J Physiol* 589, 4301–4320.
55. Lin, X., Chen, S., Tee, D. (1998). Effects of quinine on the excitability and voltage-dependent currents of isolated spiral ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 79, 2503–2512.
56. Lin, X., Chen, S. (2000). Endogenously generated spontaneous spiking activities recorded from postnatal spiral ganglion neurons in vitro. *Developmental Brain Research* 119, 297–305.
57. Liu, X.Z., Yan, D. (2007). Ageing and hearing loss. *J. Pathol.* 211, 188–197.
58. Liu, H.-Y., Chi, F.-L., Gao, W.-Y. (2008). Taurine modulates calcium influx under normal and ototoxic conditions in isolated cochlear spiral ganglion neurons. *Pharmacol Rep* 60, 508–513.
59. Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L. (2010). *Pharmakologie und Toxikologie* (Stuttgart: Thieme).

-
60. Lv, P., Wei, D., Yamoah, E.N. (2010). K_v7-type channel currents in spiral ganglion neurons: Involvement in sensorineural hearing loss. *J. Biol. Chem.* 285, 34699–34707.
61. Lv, P., Sihm, C.-R., Wang, W., Shen, H., Kim, H.J., Rocha-Sanchez, S.M., Yamoah, E.N. (2012). Posthearing Ca²⁺ currents and their roles in shaping the different modes of firing of spiral ganglion neurons. *J. Neurosci.* 32, 16314–16330.
62. McNeill, C., Noble, W., Purdy, S.C., O'Brien, A., Sharma, M. (2012). Bilateral cochlear implants in long-term and short-term deafness. *Cochlear Implants International* 13, 50–53.
63. Mou, K., Adamson, C.L., Davis, R.L. (1998). Time-dependence and cell-type specificity of synergistic neurotrophin actions on spiral ganglion neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 402, 129–139.
64. Neely, G.G., Hess, A., Costigan, M., Keene, A.C., Goulas, S., Langeslag, M., Griffin, R.S., Belfer, I., Dai, F., Smith, S., et al. (2010). A genome-wide *Drosophila* screen for heat nociception identifies $\alpha_2\delta_3$ as an evolutionary-conserved pain gene. *Cell* 143, 628–638.
65. Pickles, J.O. (1988). *An Introduction to the Physiology of Hearing* (Birmingham: Academic Press).
66. Pickles, J.O., Comis, S.D., Osborne, M.P. (1984). Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hearing Research* 15, 103–112.
67. Pirone, A., Kurt, S., Zuccotti, A., Rüttiger, L., Pilz, P., Brown, D., Franz, C., Schweizer, M., Rust, M.B., Rübtsamen, R., et al. (2013). $\alpha_2\delta_3$ is essential for normal structure and function of auditory nerve synapses and is a novel candidate for auditory processing disorders. Eingereicht.
68. Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca²⁺ Channels. *Cell* 102, 89–97.
69. Portmann, D., Felix, F., Negrevergne, M., Bourdin, M., Lagourgue, P., Coulomb-Faye, F., Polanski, F.J. (2007). Bilateral cochlear implantation in a patient with long-term deafness. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 128, 65–68.
70. Probst, R., Gerhard Grevers, Iro, H. (2008). *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde* (Stuttgart: Thieme).
71. Puel, J.-L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Progress in Neurobiology* 47, 449–476.
72. Pujol, E., Popper, A., Fay, R. (1998). Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea. In *Development of the Auditory System*, (New York: Springer), pp 146–192.
73. Pujol, R., Puel, J.L., Eybalin, M. (1992). Implication of non-NMDA and NMDA receptors in cochlear ischemia. *Neuroreport* 3, 299–302.
-

74. Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.-L., Codd, E.E., D'Andrea, M.R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta$ -4 subunit. *Mol Pharmacol* 62, 485–496.
75. Raphael, Y., Altschuler, R.A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin* 60, 397–422.
76. Rask-Andersen, H., Liu, W., Erixon, E., Kinnefors, A., Pfaller, K., Schrott-Fischer, A., Glueckert, R. (2012). Human cochlea: Anatomical characteristics and their relevance for cochlear implantation. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 295, 1791–1811.
77. Reid, M.A., Flores-Otero, J., Davis, R.L. (2004). Firing patterns of type II spiral ganglion neurons in vitro. *J. Neurosci.* 24, 733–742.
78. Ripoll, C., Rebillard, G. (1997). A simple technique to efficiently dissociate primary auditory neurons from 5 day-old rat cochleas. *J. Neurosci. Methods* 73, 123–128.
79. Roehm, P.C., Xu, N., Woodson, E.A., Green, S.H., Hansen, M.R. (2008). Membrane depolarization inhibits spiral ganglion neurite growth via activation of multiple types of voltage sensitive calcium channels and calpain. *Mol Cell Neurosci* 37, 376–387.
80. Romand, R., Romand, M.R. (1985). Qualitative and quantitative observations of spiral ganglion development in the rat. *Hear. Res.* 18, 111–120.
81. Rusznák, Z., Szűcs, G. (2009). Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 457, 1303–1325.
82. Schlick, B. (2009). Diversity of Ca^{2+} channels in mouse brain and cultured hippocampal neurons revealed by qRT-PCR. Department of Physiology and Medical Physics Innsbruck Medical University.
83. Schlick, B., Flucher, B.E., Obermair, G.J. (2010). Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167, 786–798.
84. Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M. (2010). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (Heidelberg: Springer).
85. Schmitz, S. (2009). *Der Experimentator: Zellkultur* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
86. Striessnig, J., Koschak, A. (2008). Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca^{2+} channels with gene-knockout models. *Channels* 2, 233–251.
87. Vieira, M., Christensen, B.L., Wheeler, B.C., Feng, A.S., Kollmar, R. (2007). Survival and stimulation of neurite outgrowth in a serum-free culture of spiral ganglion neurons from adult mice. *Hearing Research* 230, 17–23.

- 88.** Wei, D., Jin, Z., Järlebark, L., Scarfone, E., Ulfendahl, M. (2007). Survival, synaptogenesis, and regeneration of adult mouse spiral ganglion neurons in vitro. *Developmental Neurobiology* *67*, 108–122.
- 89.** Winter, S.M., Hirrlinger, J., Kirchhoff, F., Hülsmann, S. (2007). Transgenic expression of fluorescent proteins in respiratory neurons. *Respiratory Physiology & Neurobiology* *159*, 108–114.
- 90.** Ylikoski, J., Pirvola, U., Virkkala, J., Suvanto, P., Liang, X.-Q., Magal, E., Altschuler, R., Miller, J., Saarna, M. (1998). Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hearing Research* *124*, 17–26.
- 91.** Zenner, H.P., Zimmermann, U., Schmitt, U. (1985). Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear. Res.* *18*, 127–133.
- 92.** Zheng, J., Shen, W., He, D.Z.Z., Long, K.B., Madison, L.D., Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* *405*, 149–155.
- 93.** Zilberstein, Y., Liberman, M.C., Corfas, G. (2012). Inner hair cells are not required for survival of spiral ganglion neurons in the adult cochlea. *J. Neurosci.* *32*, 405–410.

7 Dank

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Jutta Engel, Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe mitarbeiten zu können sowie für die exzellente Betreuung in den verschiedenen Phasen der Dissertation.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die in den annähernd 3 Jahren, die ich mit ihnen verbringen durfte, immer weiter gewachsen ist: Annelore, Barbara, Niels und Stefan, die mir über den Anfang geholfen haben; Jenny, Steffi, Tobi, Angela und Kerstin, die später dazu gestoßen sind und teilweise unersetzlich wurden.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Kooperationspartnern dieses Projekts:

Professor Dr. Gerald Obermair und Roman Egger, Sektion für Physiologie, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck für die Durchführung und Auswertung der qRT-PCR.

Prof. Dr. Frank Kirchhoff, Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar für die Bereitstellung der TYF-Mäuse.

Die Studienstiftung Saar hat mich während 2 Jahren mit einem Saarland-Stipendium unterstützt. Nicht nur der Studienstiftung, sondern auch Prof. Dr. Bernhard Schick, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, der maßgeblich zum Erhalt des Stipendiums beigetragen hat, gilt mein aufrichtiger Dank.

Zum Schluss ein riesiges Danke an meine Familie für ihre fortwährende unerschöpfliche Unterstützung und Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen, die im Verlauf der letzten Jahre zu lösen waren.

8 Lebenslauf