

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

**Expression der LRRC52 γ -Untereinheit ($\gamma 2$) und die
 Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung von BK-Kanälen in
Inneren Haarsinneszellen der Maus**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2019

vorgelegt von
Isabelle Lang, geb. Eder
geb. am 18.10.1986 in Neunkirchen

Die vorliegende Arbeit „Expression der LRRC52 γ-Untereinheit (γ2) und die Ca²⁺-unabhängige Aktivierung von BK-Kanälen in Inneren Haarsinneszellen der Maus“ wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jutta Engel in der Fachrichtung Biophysik am Zentrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) der Universität des Saarlandes angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.05.2019

Datum der Disputation: 10.09.2019

Prüfungsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. Dieter Bruns

1. Gutachterin: Prof. Dr. Jutta Engel

2. Gutachterin: Prof. Dr. Carola Meier

3. Prüfer: PD Dr. Stephan Philipp

"

**Jeder Mensch vermag uns viel mehr zu sagen,
als wir zu hören imstande sind.**

"

Ernst Ferstl, österreichischer Schriftsteller, Neunkirchen in Niederösterreich

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iv	
Abbildungsverzeichnis	vii	
Tabellenverzeichnis	ix	
Abkürzungsverzeichnis	1	
Zusammenfassung	3	
Summary	5	
1	Einleitung	7
1.1	Aufbau und Funktion des Ohrs	7
1.1.1	Das Ohr	8
1.1.2	Aufbau und Funktion des Innenohrs	9
1.1.3	Schalltransduktion im Innenohr	11
1.1.4	Reifung der Cochlea	13
1.2	Kaliumselektive Kanäle	14
1.2.1	Spannungs- und calciumabhängige Kaliumkanäle	16
1.2.2	Aufbau von BK-Kanälen	17
1.2.2.1	α-Untereinheit	17
1.2.2.2	β-Untereinheiten	19
1.2.2.3	γ-Untereinheiten	20
1.2.2.3.1	Physiologische Relevanz der γ-Untereinheiten	22
1.2.3	Aktivierungsmechanismus von BK-Kanälen	24
1.2.4	BK-Kanäle in inneren Haarsinneszellen	25
1.2.4.1	Aktivierung der BK-Kanäle durch Interaktion von BKα mit modulatorischen Untereinheiten	27
1.2.5	BKα-defiziente Mauslinie	29
1.3	Spannungsgesteuerte Calciumkanäle	30
1.3.1	Aufbau spannungsgesteuerter Calciumkanäle	31
1.3.2	Calciumkanäle in inneren Haarsinneszellen	31
1.3.3	Auswirkung der Deletion des Ca _v 1.3 Ca ²⁺ -Kanals auf BK-Kanäle in IHZ	32
1.4	Tight Junctions im Corti-Organ	33
1.5	Zielsetzung der Arbeit	34
2	Material und Methoden	36
2.1	Geräte	36
2.2	Chemikalien und Medien	36
2.3	Puffer und Lösungen	38
2.4	Kits	39
2.5.	Enzyme	39
2.6	Mauslinien	40
2.7	Molekularbiologische Methoden	40
2.7.1	Genotypisierung von BKα-defizienten und TyfC-Mauslinien	40
2.7.2	Genotypisierung von Cacna1d-defizienten Mäusen	41
2.7.3	Präparation der Cochlea	42
2.7.4	Gewinnung von Corti-Organen, Haarsinneszellen, Speicheldrüsen- und Hodengewebe zur Transkriptanalyse	43
2.7.4.1	Gewinnung von Corti-Organen	43
2.7.4.2	Gewinnung von inneren Haarsinneszellen	44

2.7.4.3	Gewinnung von Speicheldrüsen- und Hodengewebe	44
2.7.5	Homogenisierung, Zellyse und RNA-Isolierung von Corti-Organen, Haarsinneszellen, Speicheldrüsen- und Hoden-Gewebe	44
2.7.5.1	Homogenisierung, Zellyse und RNA-Isolierung von Haarsinneszellen	44
2.7.5.2	Homogenisierung, Zellyse und RNA-Isolierung von Corti-Organen, Speicheldrüsen- und Hodengewebe	45
2.7.6	Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription, <i>RT</i>)	45
2.7.7	Photometrische DNA-/RNA-Quantifizierung	46
2.7.8	Transkriptanalyse durch <i>nested</i> Polymerase-Kettenreaktion	47
2.7.8.1	Primerdesign	48
2.7.8.1.1	Synthese der Primer zum mRNA-Nachweis von LRRC26 und LRRC52 in der 1. PCR	48
2.7.8.1.2	Synthese der Primer zum mRNA-Nachweis von LRRC26 in der 2. PCR	48
2.7.8.1.3	Synthese der Primer zum mRNA-Nachweis von LRRC52 in der 2. PCR	50
2.7.8.2	Pipettierschema	51
2.7.8.3	<i>Nested</i> PCR-Programme	53
2.7.9	Überprüfung der amplifizierten PCR-Produkte mittels Agarose-Gelektrophorese	54
2.7.10	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	55
2.7.11	Sequenzierung	55
2.8	Proteinbiochemische Methoden	56
2.8.1	Indirekte Immunhistochemie zur Lokalisierung bestimmter Proteine in <i>whole mount</i> Corti-Organen	56
2.8.1.2	Immunhistochemische Validierung des LRRC52-Antikörpers in Hodengewebe	60
2.8.2	<i>In situ Proximity Ligation Assay</i> zur Analyse der Interaktion von BK-Kanälen und LRRC52	61
2.9	Software und Internet-Ressourcen	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Lokalisation von BK-Kanälen in unreifen und ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Mäusen	65
3.1.1	Validierung zweier BK-Antikörper aus Kaninchen und Maus im Corti-Organ an ausgereiften inneren Haarsinneszellen in BK α -defizienten Mäusen	66
3.1.2	Entwicklungsabhängige Lokalisation von BK-Kanälen in inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen	67
3.1.3	Lokalisation von BK-Kanälen und Lage der <i>Tight Junctions</i>	68
3.1.4	Lokalisation von BK- und Ca v 1.3-Kanälen	70
3.2	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in Corti-Organen und inneren Haarsinneszellen vor und nach Hörbeginn	74
3.2.1	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen	75
3.2.2	Überprüfung von LRRC26-, LRRC52- und BK-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen	80
3.2.3	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in unreifen Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen	82
3.2.4	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in unreifen Corti-Organen von	

	TyfC-Mäusen	85
3.2.5	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten Mäusen	88
3.2.5.1	BK- und LRRC52-Transkripte in Hoden von BK α -defizienten Mäusen	88
3.2.5.2	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten Mäusen	90
3.2.6	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen	93
3.2.7	LRRC26- und LRRC52-Transkripte in unreifen inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen	96
3.3	Überprüfung der Lokalisation von LRRC26-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen	99
3.4	Charakterisierung von LRRC52-Protein in unreifen und ausgereiften inneren Haarsinneszellen	101
3.4.1	Validierung des LRRC52-Antikörpers in Hodengewebe	101
3.4.2	Lokalisation von LRRC52 im Corti-Organ von Wildtyp-Mäusen	103
3.4.3	Entwicklungsabhängige Lokalisation von LRRC52-Protein im Corti-Organ von Wildtyp-Mäusen	105
3.4.4	Lokalisation von LRRC52-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von BK α -defizienten Mäusen	107
3.4.5	Überprüfung von LRRC52-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Ca, _v 1.3-defizienten Mäusen	109
3.5	Interaktion von BK-Kanälen und LRRC52-Protein mit Hilfe des <i>in situ Proximity Ligation Assay</i>	112
3.5.1	Räumliche Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen	113
3.5.2	Überprüfung einer räumlichen Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Ca, _v 1.3-defizienten Mäusen	116
4	Diskussion	119
4.1	Maximale Entfernung der apikalen BK-Kanal-Cluster zu extrazellulären präsynaptischen Ca²⁺-Quellen in reifen IHZ	120
4.2	Keine Aktivierung von BK-Kanälen durch intrazelluläre Ca²⁺-Quellen in reifen IHZ	123
4.3	Leucin-rich repeat-containing Proteine in reifen IHZ	125
4.3.1	LRRC-Transkripte in unreifen und reifen Corti-Organen	126
4.3.2	Keine Expression der γ 1-Untereinheit LRRC26 in reifen IHZ	127
4.3.3	Synchrone Expression der γ 2-Untereinheit LRRC52 mit BK-Kanälen am Hals reifer IHZ	128
4.3.4	Abhängigkeit der γ 2-Untereinheit LRRC52 von BK α in zwei verschiedenen BK α -defizienten Mausmodellen	129
4.4	Ausblick	131
5	Literatur	133
6	Anhang	149
6.1	DNA-Längenstandards für Transkriptanalysen mit <i>nested PCR</i>	149
Danksagung		150
Publikationen, Konferenzbeiträge und Forschungsaufenthalte		151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Säugerohrs	8
Abbildung 2: Querschnitt durch einen Gang der Cochlea	9
Abbildung 3: Querschnitt durch ein ausgereiftes Corti-Organ	11
Abbildung 4: Entwicklungsabhängige Änderungen verschiedener biophysikalischer Eigenschaften muriner IHZ	14
Abbildung 5: Schematische Darstellungen der Topologie der porenbildenden Untereinheiten der vier Klassen von Kaliumkanälen	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Topologie einer BK α -Untereinheit (A) sowie eines tetrameren BK α -Kanals (B)	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Topologie einer humanen $\gamma 1$ -Untereinheit	21
Abbildung 8: Entwicklungsabhängiges Auftreten von murinen BK-Strömen	25
Abbildung 9: <i>Scalae</i> - und <i>Tight Junction</i> -Grenzen im Corti-Organ von Säugetieren	33
Abbildung 10: Beispiel einer <i>Cacna1d</i> -Genotypisierung	42
Abbildung 11: Nukleotidsequenz der LRRC26-mRNA	49
Abbildung 12: Nukleotidsequenz der genomischen LRRC26-DNA mit Intron	50
Abbildung 13: Nukleotidsequenz der LRRC52-mRNA	51
Abbildung 14: Prinzip des <i>Proximity Ligation Assays</i>	62
Abbildung 15: Lokalisation von BK-Kanälen in IHZ von BK α -defizienten Mäusen mit zwei verschiedenen primären Antikörpern	66
Abbildung 16: Lokalisation von BK-Kanälen in IHZ von NMRI-Mäusen vor und nach Hörbeginn	67
Abbildung 17: Lokalisation von BK-Kanälen und dem <i>Tight Junction</i> -Marker Claudin-14 in IHZ von NMRI-Mäusen	69
Abbildung 18: Unterschiedliche Expressionsstärke von BK-Kanälen im basolateralen Teil unterhalb der <i>Tight Junctions</i> von IHZ von NMRI-Mäusen	71
Abbildung 19: Lokalisation von BK-Kanälen und Ca _v 1.3-Kanälen in IHZ von NMRI-Mäusen	72
Abbildung 20: Lokalisation von BK-Kanälen und dem ER-Marker Sec62 in IHZ von NMRI-Mäusen	73
Abbildung 21: Nachweis von LRRC26-Transkripten in Speicheldrüsengewebe und ausgereiften Corti-Organen von NMRI-Mäusen	77
Abbildung 22: Überprüfung der <i>nested RT-PCR</i> zur LRRC26- und Ca _v 1.3-Transkriptanalyse	78
Abbildung 23: Nachweis von LRRC52-Transkripten in Hodengewebe und ausgereiften Corti-Organen von NMRI-Mäusen	79
Abbildung 24: Sequenzierelektropherogramm des amplifizierten LRRC52 PCR-Produkts im Corti-Organ nach der <i>nested PCR</i>	81
Abbildung 25: Überprüfung der LRRC52-Sequenzierungsergebnisse mit dem Programm <i>Standard Nucleotide BLAST</i>	81
Abbildung 26: Nachweis von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen	83
Abbildung 27: Nachweis von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen	84
Abbildung 28: Nachweis von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen	86
Abbildung 29: Nachweis von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen	87

Abbildung 30: Nachweis von BK-, LRRC52- und Ca _v 1.3-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BKα-defizienten-Mäusen	89
Abbildung 31: Nachweis von LRRC26-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BKα-defizienten-Mäusen	91
Abbildung 32: Nachweis von LRRC52-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BKα-defizienten-Mäusen	92
Abbildung 33: Nachweis von BK- und LRRC26-Transkripten in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen	94
Abbildung 34: Nachweis von BK- und LRRC52-Transkripten in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen	95
Abbildung 35: Nachweis von BK- und LRRC26-Transkripten in unreifen IHZ von NMRI-Mäusen	97
Abbildung 36: Nachweis von BK- und LRRC52-Transkripten in unreifen IHZ von NMRI-Mäusen	98
Abbildung 37: Überprüfung eines kommerziellen LRRC26-Antikörpers in IHZ von NMRI-Mäusen	100
Abbildung 38: Validierung des LRRC52-Antiserums #1567 in Kryoschnitten des Hodens drei Monate alter männlicher Wildtyp-Mäuse (129B6F1-Hintergrund)	102
Abbildung 39: Validierung des Prä-Immunserums vor Injektion des LRRC52-Peptidantigens für die Synthese eines Kaninchen-LRRC52-Antikörpers in IHZ von 18 Tage alten NMRI-Mäusen	104
Abbildung 40: Lokalisation des LRRC52-Proteins in IHZ von NMRI-Mäusen	105
Abbildung 41: Lokalisation von BK-Kanälen und LRRC52 in IHZ von NMRI-Mäusen vor und nach Hörbeginn	106
Abbildung 42: Lokalisation von BK-Kanälen und LRRC52 in IHZ von BKα-defizienten Mäusen	108
Abbildung 43: Überprüfung der Lokalisation von BK-Kanälen und LRRC52 in IHZ von Ca _v 1.3-defizienten Mäusen	111
Abbildung 44: Schema des Prinzips des <i>is</i> -PLA	113
Abbildung 45: Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 in IHZ von NMRI-Mäusen	114
Abbildung 46: Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 in IHZ von Ca _v 1.3-defizienten Mäusen	117
Abbildung 47: DNA-Marker 100 bp Plus Blue	149
Abbildung 48: DNA-Marker peqGOLD Ultra Low Range II	149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Programm zur Genotypisierung von <i>Cacna1d</i> ^L -Mäusen	41
Tabelle 2: Erwartete Bandengrößen der <i>Cacna1d</i> -Genotypisierung	41
Tabelle 3: PCR-Mastermix-Ansatz (zur visuellen Überprüfung der PCR-Produkte)	52
Tabelle 4: PCR-Mastermix-Ansatz bei anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte	52
Tabelle 5: <i>Template</i> -Volumina der PCR-Reaktionen	52
Tabelle 6: PCR-Programm zum Nachweis der <i>LRRC</i> - und <i>Cacna1d</i> -Transkripte	53
Tabelle 7: PCR-Programm zum Nachweis der <i>Kcnma1</i> -Transkripte	53
Tabelle 8: Verwendete Primer mit zugehörigen Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten	54
Tabelle 9: Erwartete Bandengrößen der verschiedenen Zielgene	55
Tabelle 10: Übersicht der verschiedenen Fixierlösungen	57
Tabelle 11: Präparation der Zamboni-Fixierlösung	57
Tabelle 12: Puffer für immunhistochemische Färbungen von <i>whole mount</i> Corti-Organen	57
Tabelle 13: Verwendete primäre Antikörper	58
Tabelle 14: Verwendete sekundäre Antikörper	59
Tabelle 15: Puffer für immunhistochemische Färbungen von Hoden-Kryoschnitten	60
Tabelle 16: Puffer für <i>is</i> -PLA an <i>whole mount</i> Corti-Organen	63
Tabelle 17: Verwendete primäre Antikörper	63
Tabelle 18: Software und Internet-Ressourcen	64

Abkürzungsverzeichnis

A	AF	Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor
	ÄHZ	äußere Haarsinneszelle(n)
B	B-XY	extrazelluläre (Bad-) Lösung XY
	BK	spannungs- und calciumabhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit
	bp	Basenpaare
	BP	Blockierpuffer
	BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovin serum albumin</i>)
C	[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
	Ca _v 1.3	spannungsgesteuerter Calciumkanal
	C-Terminus	Carboxyterminus
	Cy3	Fluoreszenzfarbstoff Cyanin3
D	DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
	dBSPL	Dezibel <i>sound pressure level</i>
	(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
	(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure ((<i>complementary</i>) <i>desoxyribonucleic acid</i>)
	DNase	Desoxyribonuklease
	dNTP's	Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	DS	Eselserum (<i>donkey serum</i>)
E	EDTA	Ethyldiamintetraacetat
	EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
F	FACS	Fluoreszenz-markierte Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
G	GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
	GS	Ziegenserum (<i>goat serum</i>)
H	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	IbTx	Iberiotoxin
	IF	Immunfluoreszenz
	IHZ	Innere Haarsinneszelle(n)
	I _{K,f}	Iberiotoxin-sensitive Komponente des BK-Stroms
	I _{K,Ca}	Iberiotoxin-resistente Komponente des BK-Stroms
	<i>is</i> -PLA	<i>in situ Proximity Ligation Assay</i>
K	kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
	kDa	Kilodalton (1000 Dalton)
	KO	gentechnisch verändertes Individuum (<i>Knockout</i>)
L	LRRC	<i>Leucine-rich repeat-containing</i> Proteine
	LOC	Bündel der lateralen olivocochleären Efferenzen (<i>lateral olivocochlear</i>)
	LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	µl	Mikroliter
	M	Molarität, Konzentration in mol pro Liter (mol/l)
	mM	Millimolar
	MET(-Kanäle)	mechano-sensitive Transduktionskanäle (<i>mechanoelectrical transducer channels</i>)
	MIP	Bildstapel (<i>Maximum Intensity Projection</i>)
	MOC	Bündel der medialen olivocochleären Efferenzen (<i>medial olivocochlear</i>)

	mOsm	Milliosmolar
N	n	Nano (10^{-9})
	NA	numerische Apertur
	NDSP	Blockierungspuffer (<i>normal donkey serum buffer</i>)
	NMRI	Wildtyp-Mauslinie (<i>Naval Medical Research Institute</i>)
	N-Terminus	Aminoterminus
P	p	Piko (10^{-12})
	pS	Pikosiemens, elektrischer Leitwert
	Pxy	postnataler Lebenstag xy der Maus
	PAK	Primärantikörper
	PB/S	Phosphat(ge)puffer(te)/ Salzlösung (<i>phosphate buffer/ed saline</i>)
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
	PFA	Paraformaldehyd
	pH	<i>pondus hydrogenii</i> (-log[H ₃ O ⁺])
	PP	Permeabilisierungspuffer
R	(m)RNA	(Vorläufer-) Ribonukleinsäure ((<i>messenger</i>) <i>ribonucleic acid</i>)
	RNase	Ribonuklease
	RNase-Out	Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor
	RP	Reaktionspuffer
	rpm	Umdrehungszahl (<i>revolutions per minute</i>)
	RT	Raumtemperatur (21 °C)
	RT	Reverse Transkription/Transkriptase
S	SAK	Sekundärantikörper
	SGN	Spiralganglien-Neurone
	SHIELD	<i>Shared Harvard Inner Ear Laboratory Database</i> der Harvard University
	SLO1	Synonym für Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (Synonym BK)
	SLO3	pH-sensitiver Kaliumkanal (Synonym KSPER)
T	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
	tg/tg	homozygote transgene Maus
	tg/wt	heterozygote transgene Maus
	TPBS-BSA	Tween-PBS-BSA-Puffer
	TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
	TX-100	Triton X-100
V	V _{1/2}	halbmaximale Aktivierungsspannung (<i>voltage of half-maximum activation</i>)
	VGCC	spannungsgesteuerte Calciumkanäle (<i>voltage-gated calcium channels</i>)
	v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
W	WP	Waschpuffer
	WT/wt	Wildtyp Maus

Zusammenfassung

Die calcium- und spannungsabhängigen *big conductance* (BK) Kaliumkanäle sind an einer Vielzahl physiologischer, aber auch pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Sie werden in vielen unterschiedlichen Gewebstypen, einschließlich der Cochlea, exprimiert. In dieser finden die Schalltransduktion und die Weiterleitung der Signale über den Hörnerven ins Gehirn statt. Die BK-Kanäle sind in den reifen sensorischen inneren Haarsinneszellen (IHZ) für die schnelle Repolarisation des Rezeptorpotentials und die kleinen Membranzeitkonstanten verantwortlich, womit eine schnelle Reaktion auf Änderungen des Membranpotentials möglich ist.

Obwohl die BK-Kanäle in IHZ bereits bei einer Membranspannung von -75 mV mit einer halbmaximalen Aktivierungsspannung von -50 mV öffnen, ist der schnell aktivierende BK-Strom ($I_{K,f}$) unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom über spannungsgesteuerte Calciumkanäle ($\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle) am synaptischen Pol der IHZ. Dieses Paradoxon konnte bislang noch nicht aufgelöst werden. Ziel der Arbeit war es, einen alternativen Aktivierungsmechanismus für BK-Kanäle in Säugern nachzuweisen, der sich von der bekannten BK-Aktivierung mittels Ca^{2+} -Einstrom durch benachbarte $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle in Haarzellen von Vögeln, Reptilien und Amphibien unterscheidet.

Mit konfokaler Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisation der porenbildenden BKα-Untereinheit im Vergleich zu den *Tight Junctions*, den $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in den IHZ von Mäusen untersucht. IHZ weisen zwei räumlich getrennte BKα-Subpopulationen auf, wobei die Hauptpopulation, die als Cluster am Hals der IHZ lokalisiert ist, die größte physiologisch noch sinnvolle Entfernung unterhalb der *Tight Junctions* zu den präsynaptischen $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen aufweist. In der Nähe präsynaptischer $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle konnte nur eine kleine BKα-Subpopulation identifiziert werden. BKα-Kanal-Cluster waren zudem nicht in der Nähe des ERs lokalisiert, welches als mögliche Ca^{2+} -Quelle dienen könnten.

Die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung von BK-Kanälen bei negativen Potentialen kann durch die neu entdeckten γ-Untereinheiten, die *Leucin-rich repeat-containing* Proteine, LRRC26 (γ1) und LRRC52 (γ2), die in heterologen Expressionssystemen die halbmaximale Aktivierungsspannung der BK-Ströme um -140 mV bzw. -100 mV verschieben, ausgelöst werden.

Mit *nested* PCR, Immunfluoreszenzanalysen und dem *in situ Proximity Ligation Assay* (*is-PLA*) wurden unreife und reife Corti-Organe bzw. IHZ von Mäusen auf das Vorliegen von LRRC26 und LRRC52 analysiert. In reifen IHZ konnten mit *nested* PCR Transkripte für LRRC52, nicht jedoch für LRRC26 nachgewiesen werden. Konsistent dazu wurden keine LRRC26-Proteine, aber eine synchrone Hochregulation von LRRC52 und BKα mit Hörbeginn in den IHZ von Wildtyp-Mäusen identifiziert. Darüber hinaus kolokalisierten beide Proteine in

Clustern am Hals der IHZ. Mithilfe des *is*-PLA wurde eine räumliche Nähe von ≤ 40 nm von LRRC52 und BK α nachgewiesen. Zusätzlich wurde in zwei Knockout-Mausmodellen, BK $\alpha^{-/-}$ - und Ca $v1.3^{-/-}$ -Mäusen, denen die BK α -Untereinheit fehlt, die Abwesenheit von LRRC52 in reifen IHZ festgestellt.

Die synchrone entwicklungsabhängige Hochregulation von LRRC52 mit BK α zu Hörbeginn, ihre Kolokalisation in einem Abstand von ≤ 40 nm am Hals der IHZ und die Abhängigkeit der LRRC52-Expression von der Anwesenheit von BK α weisen LRRC52 als $\gamma 2$ -Untereinheit der BK-Kanäle in IHZ aus. Ein funktioneller Nachweis bleibt zukünftigen Experimenten, z.B. der Analyse einer LRRC52-knockout-Maus, vorbehalten.

Summary

The big conductance, voltage and calcium-activated K⁺ (BK) channels participate in a large variety of physiological but also pathophysiological processes. They are expressed in various tissues including the cochlea in both excitable and non-excitable cells. The cochlea transduces sound into transmitter release and converts the information to the auditory brainstem by the acoustic nerve. BK channels are responsible for fast repolarization of the receptor potential and small time constants of the mature inner hair cell (IHC), enabling it to respond very quickly to changes in membrane potential.

Although they activate at around -75 mV with a voltage of half-maximum activation of -50 mV the fast activating BK current ($I_{K,f}$) is largely insensitive to Ca²⁺ influx through presynaptic voltage-gated calcium (Ca_v1.3) channels, a paradox that has not been resolved so far. The aim of this thesis was to identify an alternative activation mechanism for BK channels in mammalian IHCs distinct to the known BK channel activation by Ca²⁺ influx through adjacent Ca_v1.3 channels common to hair cells of birds, reptiles and amphibians.

Using confocal immunohistochemistry, the subcellular localization of the pore-forming BK α subunit with respect to tight junctions, Ca_v1.3 channels and the endoplasmic reticulum (ER) was analyzed in mature IHCs. IHCs show a subcellular spatial segregation of two BK α populations with the large population localized at the IHC neck directly underneath the tight junction ring at the largest possible distance from presynaptic Ca_v1.3 channels. A much smaller population of BK α channels was however identified in proximity to presynaptic Ca_v1.3 channels. BK channel clusters at the IHC neck were not localized close to the ER, which could have served as an internal store for Ca²⁺.

Ca²⁺-independent activation of BK channels at negative potentials can be caused by newly detected γ subunits, the *Leucin-rich repeat-containing* proteins, LRRC26 ($\gamma 1$) and LRRC52 ($\gamma 2$), which upon heterologous expression can shift the voltage of half-maximum activation of the BK current by -140 mV and -100 mV, respectively.

Immature and mature mouse organs of Corti and IHCs were analyzed for LRRC26 and LRRC52 with *nested* PCR, immunofluorescence analysis and *in situ Proximity Ligation Assay (is-PLA)*. In mature IHCs, transcripts for LRRC52 but not for LRRC26 could be detected using a *nested* PCR approach. Consistently, no LRRC26 protein expression was found in IHC of wildtype mice. However, a synchronous developmental up-regulation of LRRC52 with the pore-forming BK α subunit was identified at the onset of hearing resulting in the co-localization of both proteins in clusters at the IHC neck. Furthermore, a close proximity of LRRC52 and BK α within ≤ 40 nm was specified using *is-PLA*. Additionally, LRRC52 was absent from mature IHCs of BK α - and Ca_v1.3-deficient mice, which both lack BK α protein.

Taken together, the synchronous developmental up-regulation of LRRC52 with BK α at the onset of hearing, their co-localization within a distance of ≤ 40 nm at the IHC neck and the

BK α -dependent expression of LRRC52 identify LRRC52 as $\gamma 2$ subunit of BK channels in IHC. Future experiments are needed to functionally proof the role of LRRC52 for the activation of BK channels, e.g. using a LRRC52-knockout mouse model.

1 Einleitung

Unter den fünf klassischen Hauptsinnen mit denen der Mensch seine Umwelt physiologisch wahrnimmt, erlangt das Ohr als erstes seine volle Funktionsfähigkeit. Damit wird die Relevanz eines intakten Gehörs für Lebewesen sehr deutlich. Neben der Vermittlung der auditiven Wahrnehmung ist es zusätzlich für den Erwerb der Sprache und somit auch für die Teilnahme an sozialen Interaktionen über Kommunikation unerlässlich. Durch variierende Betonung ist es dem Menschen außerdem möglich, über das gesprochene Wort Emotionen zu transportieren, sodass nicht nur informative, sondern auch emotionale und soziale Aspekte gesendet und empfangen werden können.

Ist das Hörvermögen eingeschränkt oder fehlt es völlig, können trotz technischer Hilfsmittel, vielfältiger Therapieformen und Gebärdensprache viele dieser Informationen nicht wieder- oder weitergegeben werden. Der Gehörsinn spielt außerdem für die räumliche Orientierung eine essentielle Rolle und ermöglicht die Lokalisation von Geräuschen und Tönen sowohl bei Tag als auch in der Dunkelheit. Zudem hilft er bei der Erkennung und Abwendung von Gefahren im Alltag, wie zum Beispiel dem Hupen im Straßenverkehr. Im Vergleich zu den olfaktorischen, gustatorischen, visuellen und taktilen Wahrnehmungen stellt das Gehör als Schaltzentrale der auditiven Wahrnehmung das empfindlichste Sinnessystem dar (Schmidt et al., 2005). Durch diese Komplexität ist es jedoch sehr störanfällig für genetische Defekte und Entwicklungsstörungen, die oft nicht regenerieren und ursächlich medizinisch behandelt werden können. Aufgrund des Fehlens kurativer Therapien werden zur Zeit lediglich technische Hilfsmittel wie Hörgeräte oder Cochlea-Implantate (CI) zur Verbesserung des Hörvermögens eingesetzt oder das Erlernen der Kommunikation mit Gehörschäden gefördert.

Zur Entwicklung geeigneter Therapieformen ist es somit unerlässlich, das Wissen über den Aufbau und die Funktionsweise des Ohres weiter auszubauen und die molekularen Grundlagen, die für ein intaktes Gehör notwendig sind, aufzudecken. Diese Forschungsarbeiten können zum größten Teil nicht am Menschen durchgeführt werden. Bis auf den Frequenzbereich des Hörens (Mensch: 16 Hz – 20 kHz, Maus: 2 kHz – 64 kHz) sind Aufgaben und Funktionen des Gehörs der Maus dem des Menschen sehr ähnlich. Die Maus wird daher vielfach als Modellorganismus genutzt.

1.1 Aufbau und Funktion des Ohrs

Aufgrund der strukturellen und funktionalen Ähnlichkeiten zum Gehör des Menschen wurde in dieser Arbeit die Maus als Modellorganismus verwendet. In den folgenden Abschnitten wird daher der Aufbau und die Funktionsweise des Säugerohrs erläutert.

1.1.1 Das Ohr

Anatomisch lässt sich das Säugerohr in Außen-, Mittel- und Innenohr unterteilen (siehe Abb. 1). Das Außenohr wird durch die Hörmuschel, die für die Schallortung verantwortlich ist, und den Gehörgang, durch den der Schall zum Mittelohr weitergeleitet wird, aufgebaut. Das Mittelohr setzt sich aus Trommelfell, Paukenhöhle und der gelenkigen Gehörknöchelchen-Kette, bestehend aus Hammer, Amboss und Steigbügel zusammen.

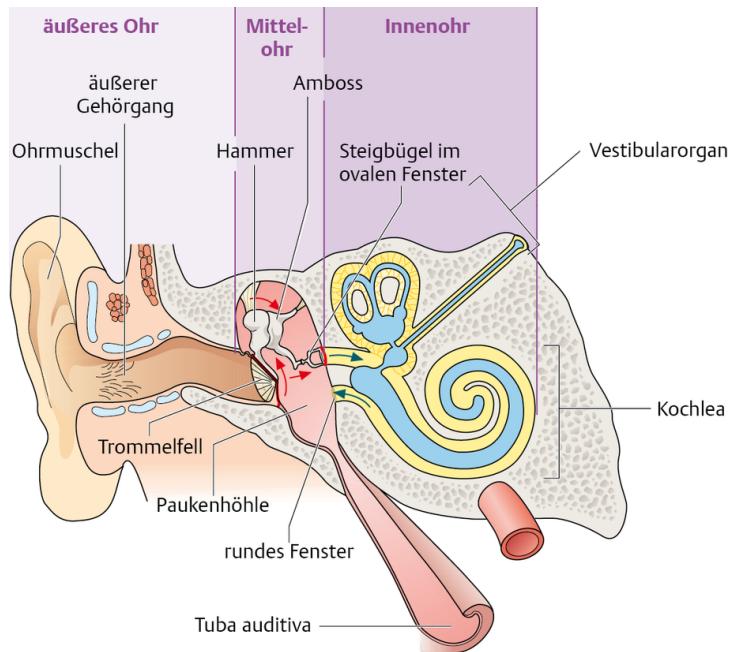


Abbildung 1: Aufbau des Säugerohrs

Die schematische Abbildung zeigt das Außen-, Mittel- und Innenohr. Der Schallreiz wird über das Trommelfell und die für die Impedanzanpassung zuständigen Gehörknöchelchen an die Perilymphe des Innenohrs weitergegeben. Von hier wird der zuvor noch mechanische vorliegende Reiz als elektrische Erregung an die Hörinde geleitet (Behrends et al., 2012).

Das Trommelfell ist eine dünne Membran, die durch Schallwellen in Schwingung gebracht wird und diese an die im luftgefüllten Mittelohr liegenden Gehörknöchelchen überträgt. Am Ende des Mittelohrs ist die Fußplatte des Steigbügels über das ovale Fenster mit dem flüssigkeitsgefüllten Innenohr verbunden. Da im Innenohr die Schallausbreitung anders als in der Luft stattfindet muss eine Impedanzanpassung durch das Mittelohr vorgenommen werden. Hierzu muss der Druck am ovalen Fenster gegenüber dem Druck am Trommelfell erhöht werden. Bei der Druckanpassung die hauptsächlich durch die Flächenunterschiede zwischen dem Trommelfell und der Steigbügelfußplatte (17-fach) bewerkstelligt wird, spielt auch die Hebelwirkung von Hammer, Amboss und Steigbügel (1,3-fach) eine Rolle. Dies führt zu einer 22-fachen Gesamtverstärkung des Drucks am ovalen Fenster und ist notwendig, da die Flüssigkeit des Innenohrs im Vergleich zum Luftwiderstand in der Paukenhöhle des Mittelohrs einen größeren mechanischen Widerstand besitzt. Gäbe es diese Art der Verstärkung nicht würden 98 % des Schalls, statt 40 % wie mit Mittelohr,

reflektiert werden (Geisler, 1998; Huppelsberg und Walter, 2009). Im flüssigkeitsgefüllten Innenohr wird der noch mechanisch vorliegende Schallreiz in elektrische Erregung umgesetzt und über den Hörnerv, *Nervus vestibulocochlearis* (VIII. Hirnnerv), und weitere Schaltstellen im Gehirn bis zur Hörrinde weitergeleitet (Schmidt et al., 2005).

1.1.2 Aufbau und Funktion des Innenohrs

Das Innenohr setzt sich aus der Gehörschnecke (Cochlea) und dem Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan) zusammen. Das Vestibularorgan ist für die Detektion von Linear- und Winkelbeschleunigungen zuständig und spielt somit unter anderem eine Rolle bei der räumlichen Orientierung sowie der Koordination von Bewegungsabläufen. In der knöchernen Cochlea liegt das häutige Labyrinth mit dem eigentlichen Hörorgan, dem Corti-Organ, welches in diesem Abschnitt genauer erläutert wird. Die folgende Darstellung zeigt schematisch den Querschnitt durch einen Gang der Cochlea (Abb. 2).

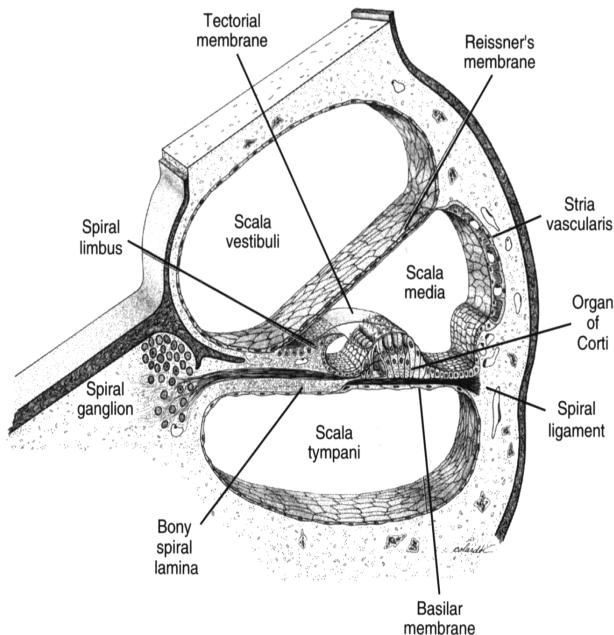


Abbildung 2: Querschnitt durch einen Gang der Cochlea

Um den Modiolus ordnen sich die drei häutigen Gänge spiralförmig innerhalb der Cochlea an. Die Reissner-Membran trennt die *Scala vestibuli* nach unten von der *Scala media*, die durch die Basilarmembran ebenfalls nach unten von der *Scala tympani* getrennt wird. Das Corti-Organ ist auf der Basilarmembran lokalisiert und ragt in die *Scala media*. Die *Stria vascularis* stellt einen stoffwechselaktiven Epithelbereich an der lateralen Wand dar (Geisler, 1998).

Die Cochlea ist in drei flüssigkeitsgefüllte Kompartimente unterteilt und windet sich von basal nach apikal um eine knöcherne Achse, den Modiolus. Die Basilarmembran trennt die *Scala tympani* von der in der Mitte liegenden *Scala media*, die auch *Ductus cochlearis* genannt wird. Oberhalb dieser liegt, separiert durch die Reissner-Membran, die *Scala vestibuli*. Diese

ist durch die Membran des ovalen Fensters und die *Scala tympani* über die Membran des runden Fensters vom Mittelohr getrennt. Beide flüssigkeitsgefüllten Räume gehen an der Spitze der Cochlea, dem Helicotrema, ineinander über (Geisler, 1998). Alle drei Kompartimente sind mit einer Flüssigkeit gefüllt, die *Scala tympani* und die *Scala vestibuli* mit der kaliumarmen Perilymphe und die *Scala media* mit kaliumreicher Endolymphe. Diese wird von einem stoffwechselaktiven Epithelbereich an der lateralen Wand, der *Stria vascularis*, produziert und ähnelt in ihrer Zusammensetzung einer intrazellulären Flüssigkeit (145 mmol/l K^+) (Ferrary et al., 1996; Wangemann, 2006). Die *Scala tympani* und *Scala vestibuli* sind mit einem kaliumarmen Ultrafiltrat des Blutplasmas (145 mmol/l Na^+ , 5 mmol/l K^+) gefüllt, welches den extrazellulären Flüssigkeiten ähnlich ist (Wangemann, 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Ionenzusammensetzungen der Endo- und Perilymphe besitzen die IHZ ein positives endocochleäres Potential von +85 mV (Fettiplace, 2017; Wangemann, 2006), dessen Funktion im nächsten Kapitel genauer erläutert wird. Diese Potentialdifferenz wird aktiv durch Ionenaustauschprozesse an der *Stria vascularis* vermittelt (Takeuchi et al., 2000).

Das für die Erregungsweiterleitung verantwortliche Corti-Organ liegt der Basilarmembran auf und beherbergt die eigentlichen Sinneszellen (s. Abb. 3). Zu ihnen zählen die äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ), die sich in drei Reihen anordnen und deren Sinneshärchen (Stereozilien) in die Tektormembran (TM), eine gallertartige Struktur, die sich vom inneren Sulcus (IS) bis über die Haarzellen erstreckt, integriert sind. Den zweiten Sinneszelltyp bilden die in einer Reihe angeordneten inneren Haarsinneszellen (IHZ), deren Stereozilien frei in die Endolymphe hineinragen. Die Stereozilien (korrekt eigentlich Stereovilli) stellen spezialisierte, haarähnliche Fortsätze mit Aktin-Skelett an den apikalen Zellpolen beider Haarzelltypen dar. Sie besitzen unterschiedliche Längen, von denen die kürzeren Stereozilien über längere Eiweißfilamente, den sogenannten *Tip-links*, an ihrem Apex mit den längeren Sinneshärchen verbunden sind (Pickles et al., 1984). Die *Membrana reticularis* fungiert als Epithelgrenze an den Sinneszellen und den ihnen benachbarten Stützzellen, indem sie den oberen endolymphatischen vom unteren perilymphatischen Raum trennt.

Die zu den Stützzellen gehörenden Pfeilerzellen (PZ) spannen zwischen den äußeren und inneren Haarsinneszellen den Cortischen Tunnel auf (CT), der einen Einfluss auf die Schwingungseigenschaften der Basilarmembran hat. Afferenzen von Typ I Spiralganglion-Neuronen (SGN) sind für die Innervierung der reifen IHZ verantwortlich wohingegen die Fasern des lateral olivocochleären (LOC) Bündels eine efferente Modulation der Afferenzen Typ I bewirken. In ÄHZ dagegen wird die Innervation über Typ II Afferenzen und Efferenzen des medialen olivocochleären (MOC) Bündels bewerkstelligt (Berglund und Ryugo, 1987; Guinan, 2006; Rusznák und Szűcs, 2009; Spoendlin, 1969).

1.1.3 Schalltransduktion im Innenohr

Wird die Membran des ovalen Fensters durch einen akustischen Schallreiz und die dadurch entstehenden Schwingungen der Gehörknöchelchen des Mittelohrs in Richtung der Cochlea ausgelenkt wird die Perilymphe in der *Scala vestibuli* verschoben und es entsteht schließlich eine sogenannte Wanderwelle auf der Basilarmembran. Die Schwingungen der Basilarmembran erreichen dabei bei hohen Tönen ihre maximale Amplituden an der Basis und haben bei tiefen Tönen ihre stärksten Auslenkungen im apikalen Bereich. Der Grund dafür sind die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Basilarmembran entlang der Cochlea, die zum Apex hin flexibler, dünner und breiter wird. Jede Tonfrequenz kann dadurch einer örtlich genau definierten Nervenfaser zugeordnet werden, sodass schon in der Cochlea eine tonotope Schallverarbeitung stattfindet (Geisler, 1998). In der folgenden Abbildung ist der Querschnitt durch ein ausgereiftes Corti-Organ abgebildet (Abb. 3).

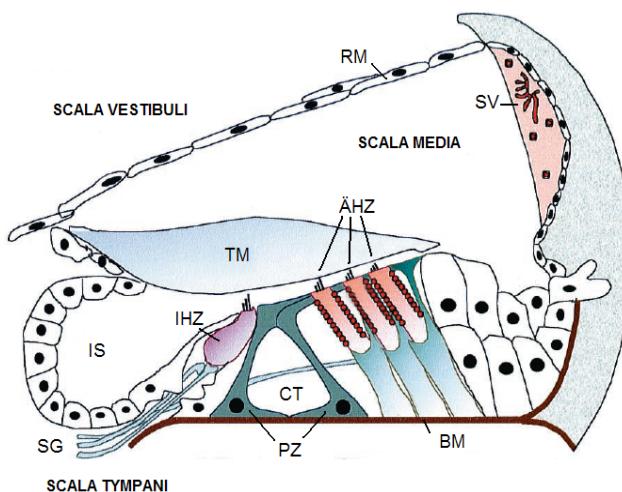


Abbildung 3: Querschnitt durch ein ausgereiftes Corti-Organ

Die Sinneszellen (ÄHZ: äußere Haarsinneszellen; IHZ: innere Haarsinneszellen) sind von Stützzellen umgeben und liegen der Basilarmembran (BM) auf. Die Pfeilerzellen (PZ) spannen den Cortischen Tunnel (CT) auf. Die Stereozilien der IHZ ragen frei in die Endolymphe, die Sinneshärchen der ÄHZ in die Tektormembran (TM). Die Reissner-Membran (RM) trennt *Scala vestibuli* und *Scala media*. Spiralganglien-Neurone (SG; Abkürzung einmalig nur in dieser Abbildung, ansonsten als SGN bezeichnet) leiten den Reiz über weitere Schaltstellen im Gehirn zur Hörrinde weiter. IS: innerer Sulcus, SV: *Stria vascularis* (Ashmore et al., 2000).

Durch die Wanderwelle werden die Basilarmembran mit dem darauf lokalisierten Corti-Organ, die Tektormembran und die Reissner-Membran in Bewegung versetzt und damit eine Scherbewegung zwischen der Tektormembran und der Basilarmembran ausgelöst. Dabei kommt es zur Auslenkung der Stereozilien der ÄHZ und IHZ mit anschließender Straffung der *Tip links* dieser Sinneshärchen. Mechano-sensitive Transduktionskanäle (MET-Kanäle) an der Basis der *Tip links* bewirken anschließend durch einen K⁺-Einstrom eine Depolarisation der Haarsinneszellen (HZ) (Hudspeth, 1989; Pickles und Corey, 1992). Durch das endocochleäre Potential von +85 mV und die hohe

Kaliumkonzentration in der Endolymphe (145 mM) wird die dafür notwendige große treibende Kraft für den passiven Einstrom von K⁺-Ionen in die negativ gegenüber der Endolymphe geladenen HZ (etwa -70 mV) aufgebaut, sodass diese bestrebt sind einen Ausgleich dieser Spannungsdifferenz herzustellen (Fettiplace, 2017; Wangemann, 2006).

In den ÄHZ kommt es durch die Depolarisation zu einer Konformationsänderung der in der lateralen Zellwand gelegenen Motorproteine Prestin, die dadurch ihre Fläche verringern und somit eine Kontraktion, also eine Längenänderung, der ÄHZ (Elektromotilität) zur Folge hat (Brownell et al., 1985; Zenner et al., 1985; Zheng et al., 2000). Die Fähigkeit der synchronisierten Größenänderung durch die Oszillation von bis zu 1000 Hz bewirkt somit eine 100-fache Signalverstärkung, die eine erhöhte Auslenkung der Basilarmembran zur Folge hat (Huppelsberg und Walter, 2009). So ist auch das Hören von Tönen mit niedrigen oder mittleren Schalldruckpegeln möglich. Bei Deletion des Proteins Prestin steigt die Hörschwelle der betroffenen Mäuse um 40 bis 60 dB SPL, was die essentielle Rolle von Prestin in der Reizverstärkung beweist (Liberman et al., 2002).

Die eigentlichen Sinneszellen stellen jedoch die IHZ dar, welche den mechanischen Reiz in Form der Stereozilien-Auslenkung in Transmitterfreisetzung transduzieren, die ein exzitorisch postsynaptisches Potential, ein sogenanntes EPSP, also ein nunmehr elektrisches Signal an der postsynaptischen Faser auslöst. An dieser Reizumwandlung und -weiterleitung sind mehrere verschiedene Prozesse beteiligt. Hierbei kommt es durch die Bewegung der endolymphatischen Flüssigkeit zwischen der Tektorialmembran und dem apikalen Pol der IHZ zu einer Auslenkung der Stereozilien, die durch die Motilität der ÄHZ zusätzlich verstärkt wird (Ashmore et al., 2000; Brownell et al., 1985). Dadurch wird, wie auch in den ÄHZ, ein Transduktionsstroms ausgelöst der durch einen K⁺-Einstrom eine Depolarisation der IHZ bewirkt. Dies führt jedoch, anders als in den ÄHZ, unter anderem zur Öffnung schnell aktivierender, spannungsabhängiger Calciumkanäle des Typs Ca_v1.3 und somit zu einem Ca²⁺-Einstrom (Platzer et al., 2000).

Anschließend kommt es an den, am basalen Zellpol und in unmittelbarer Nähe zu den Calciumkanälen gelegenen, Synapsen zur Ausschüttung des Transmitters Glutamat (Fuchs et al., 2003; Puel, 1995; Ruel et al., 1999). Dieser spezielle Synapsentyp wird als Ribbonsynapse bezeichnet und unterscheidet sich in seiner Struktur stark von anderen Synapsen. So besitzen Ribbonsynapsen eine elektronendichte Proteinstruktur und sind mit der präsynaptischen Haarzell-Membran fest verankert. Zusätzlich binden sie ständig Vesikel, die für eine fortwährende Erregbarkeit der Haarsinneszellen durch Transmitterausschüttung unerlässlich sind .

Durch die Glutamat-Freisetzung wird an der Post-Synapse der Haarsinneszelle zunächst ein EPSP und in geringer räumlicher und zeitlicher Entfernung ein Nervenaktionspotential

generiert, das über die afferente Hörbahn mit zahlreichen Verarbeitungsstufen zum auditorischen Kortex, in dem auch der Höreindruck entsteht, geleitet wird (Hudspeth, 1989). adulte IHZ generieren ein, von der Reizstärke abhängiges, graduiertes Rezeptorpotential (Kros et al., 1998). Dadurch können fein abgestufte Schwingungsänderungen der Stereozilien in eine fein abgestufte Ausschüttung von Transmittern an der Synapse umgewandelt und damit eine präzise Schallverarbeitung ermöglicht werden. Die Depolarisation aktiviert außerdem Kaliumkanäle, die eine Repolarisation der IHZ bewirken. Dabei öffnen sich zuerst die schnell aktivierenden calcium- und spannungsabhängigen BK-Kanäle und etwas zeitversetzt auch die spannungsabhängigen Kaliumkanäle K_v (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003; Oliver et al., 2003; Housley et al., 2006). Damit verlieren IHZ (und ÄHZ) die depolarisierenden K^+ -Ionen aus der Schallanregung passiv (d.h. ohne ATP-Verbrauch) entlang ihres elektrochemischen Gradienten durch spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle an die kaliumarme Perilymphe, da K^+ bestrebt ist sein Gleichgewichtspotential von etwa -85 mV wieder herzustellen.

1.1.4 Reifung der Cochlea

Die Haarsinneszellen sind beim Menschen bereits vor der Geburt komplett ausgereift und vermitteln somit schon ab Geburt einen funktionsfähigen Höreindruck. Der Hörbeginn bei Mäusen liegt dagegen am Tag 12 (Ehret, 1985), sodass diese taub zur Welt kommen. Erst am postnatalen Tag 18 (P18) ist die Reifung muriner innerer Haarzellen vollendet. Damit stellen Mäuse ein optimales Modell dar, um die Entwicklung der IHZ zu untersuchen. Bei dem Reifungsprozess in den ersten drei postnatalen Wochen sind die auffälligsten Veränderungen bis zum Hörbeginn weitestgehend abgeschlossen.

Unreife IHZ generieren in dieser Phase ohne jegliche Stimulation von außen spontan Calcium-Aktionspotentiale (s. Abb. 4, *Spont APs*, rot). Dieser Spontanaktivität liegt eine alternierende Aktivität von Calcium- und Kaliumkanälen zugrunde (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003b). Die spontanen Aktionspotentiale bewirken sehr wahrscheinlich eine Transmitterfreisetzung an den Synapsen, die das Signal an die, schon ab der Geburt ausgebildeten, Spiralganglien-Afferenzen weitergeben (Pujol et al., 1998).

Nach Hörbeginn (s. Abb. 4, P12, *Onset of Hearing*) werden diese spontanen Aktionspotentiale durch die Expression weiterer Typen von Kaliumkanälen, wie beispielsweise dem calcium- und spannungsabhängigen Kaliumkanal BK (s. Abb. 4, $I_{K,f}$, grün), wieder abgestellt. Dieser Mechanismus ist höchst wahrscheinlich für die Reifung der Hörbahn essentiell und stellt dabei unter anderem sicher, dass die richtige Verschaltung zu den SGNs aufgebaut wird (Beutner et al., 2001; Glowatzki und Fuchs, 2002; Kros et al., 1998; Pujol et al., 1998).

In der folgenden Abbildung ist das entwicklungsabhängige Vorliegen unterschiedlicher Ionenströme verschiedener Ionenkanäle schematisch dargestellt (Abb. 4).

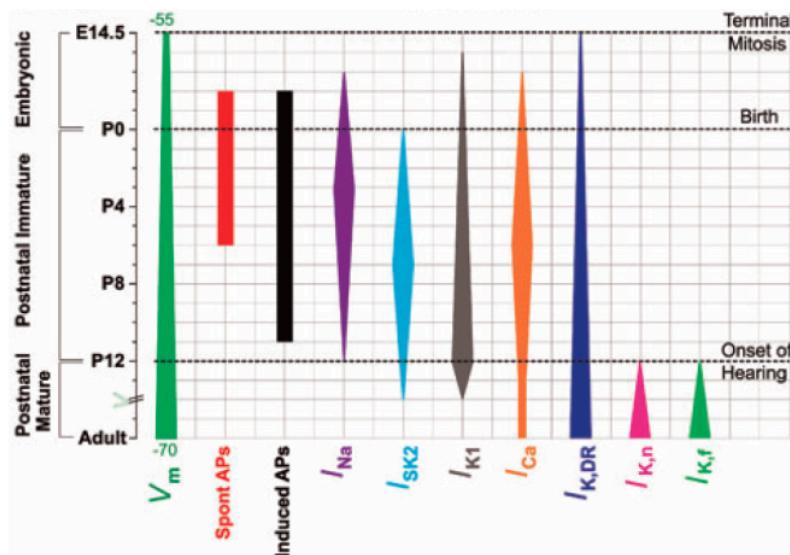


Abbildung 4: Entwicklungsabhängige Änderungen verschiedener biophysikalischer Eigenschaften muriner IHZ

Die Länge und Ausprägung der vertikalen Linien spiegeln die entwicklungsabhängigen Veränderungen im Vorhandensein unterschiedlicher Ionenströme verschiedener Ionenkanäle sowie die Änderungen des Membranpotentials (V_m) in apikalen IHZ vor und nach Hörbeginn (Onset of Hearing) wider. Spont APs: spontane Ca^{2+} -Aktionspotentiale, I_{Na} : Natrium-Strom, I_{SK2} : calciumabhängiger K^+ -Strom mit geringer Einzelkanalleitfähigkeit (SK2-Kanäle), I_{K1} : einwärts gleichrichtender K^+ -Strom, I_{Ca} : spannungsabhängiger Ca^{2+} -Strom ($\text{Ca}_{v1.3}$ -Kanäle), $I_{K,DR}$: klassischer verzögter gleichrichtender K^+ -Strom, $I_{K,n}$: spannungsabhängiger verzögter gleichrichtender K^+ -Strom (KCNQ4-Kanäle), $I_{K,f}$: spannungs- und calciumabhängiger K^+ -Strom mit hoher Einzelkanalleitfähigkeit. Der Tag der Geburt (P0, Birth) entspricht hierbei dem pränatalen Tag 19,5 (E 19,5; (Marcotti, 2012)).

1.2 Kaliumselektive Kanäle

Kaliumkanäle sind integrale Membranproteine, die einen Fluss von einfach positiv geladenen Kaliumionen durch Membranen ermöglichen. Sie bilden die größte und vielfältigste Familie von Ionenkanälen und kommen in praktisch allen Bakterien- oder Säugetierzellen vor (Sigworth, 2003). Kaliumkanäle sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie der Hormonsekretion (Rudy, 1988), der Apoptose (Yu et al., 1997), der Proliferation (Comes et al., 2015) sowie der neuronalen Erregbarkeit (Jeevaratnam et al., 2017) beteiligt.

Darüber hinaus sind sie für die Aufrechterhaltung und die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials einer Zelle essentiell, welches sich am K^+ -Konzentrationsgradienten orientiert und ungefähr dem K^+ -Gleichgewichtspotential (GGW-Potential) entspricht. Zur Berechnung des K^+ -GGW-Potentials kann die Gleichung nach Nernst verwendet werden, die das thermodynamische Gleichgewicht eines Ions über eine semipermeable Membran beschreibt. In Nervenzellen von Säugetieren entspricht die intrazelluläre K^+ -Konzentration ungefähr 155 mM, die extrazelluläre etwa 5 mM, wodurch

sich ein K^+ -GGW-Potential von ungefähr -85 mV ergibt. Die elektrochemische Triebkraft, die sich als Differenz aus dem Ruhemembranpotential (Nervenzelle Säugetier: -70 mV) und dem GGW-Potential für eine bestimmte Ionenart ergibt und aussagt wie stark die entsprechenden Ionen in welche Richtung strömen, liegt für K^+ -Ionen bei ungefähr +15 mV und bewirkt damit einen K^+ -Ausstrom aus der Zelle. Das K^+ -GGW-Potential kann mit der Gleichung von Goldman-Hodgkin-Katz, die alle Ionen die am Membranpotential beteiligt sind berücksichtigt, präzisiert werden (Goldman, 1943).

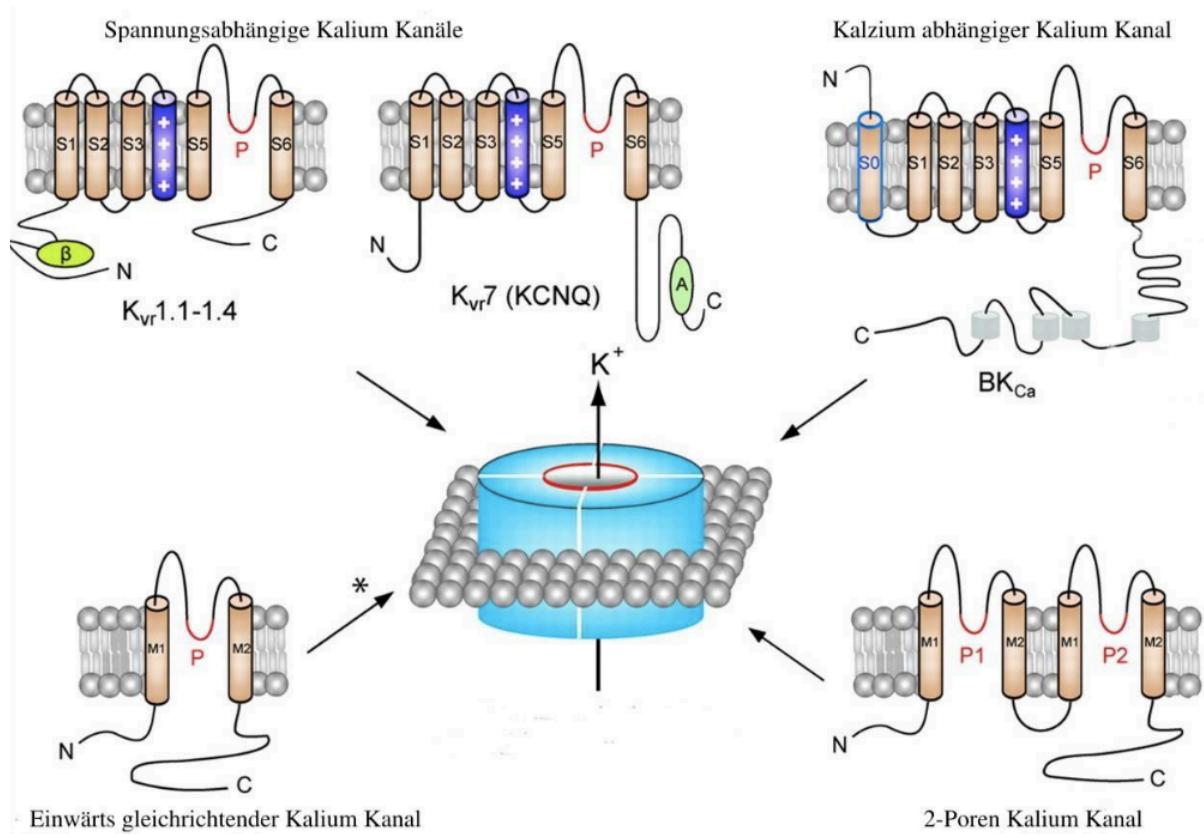


Abbildung 5: Schematische Darstellungen der Topologie der porenbildenden Untereinheiten der vier Klassen von Kaliumkanälen

Die Segmente S1 bis S6 bzw. M1 bis M2 stellen die Transmembrandomänen dar. P, P1, P2 bezeichnen die Sequenzbereiche in den extrazellulären Schleifen, die nach der Anordnung der Untereinheiten als Tetramer die Kanalpore bilden. N bildet den Amino- und C den Carboxy-Terminus ab (Benarroch, 2009).

Aufgrund ihrer Topologie werden die Kaliumkanäle in vier Hauptklassen unterteilt (Abb. 5). Hierzu gehören die Zwei-Poren Kaliumkanäle (K_{2P}), die Einwärtsgleichrichter ($K^+ channel inward rectifier$, K_{ir}) sowie die spannungs (K_v)- und die calciumabhängigen (K_{Ca}) Kaliumkanäle. Die zu den K_{2P} -gehörenden Leckstromkanäle und die einwärts gleichgerichteten Kaliumkanäle sind vor allem an der Regulation des Ruhemembranpotentials beteiligt (Reimann und Ashcroft, 1999). Zu den K_v -Kanälen gehören unter anderem auch die im Innenohr exprimierten und für die autosomal dominante Form der Taubheit, *DFNA2*, verantwortlichen, KCNQ4-Kanäle (Kubisch et al., 1999). Diese sind für

das negative Ruhemembranpotential von etwa -70 mV in den IHZ hauptverantwortlich (Kros und Crawford, 1990; Marcotti et al., 2003b). Innerhalb der calciumabhängigen Kaliumkanäle unterscheidet man Kanäle mit geringer (10-20 pS; SK (*small conductance*) -Kanäle), mittlerer (25-100 pS; IK (*intermediate conductance*)-Kanäle) und hoher Einzelkanalleitfähigkeit (100-300 pS; BK (*big conductance*) -Kanäle) (Kaczorowski et al., 1996; Salkoff et al., 2006), die zusätzlich unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften sowie unterschiedliche Aktivierungsspannungen besitzen. BK-Kanäle nehmen eine Sonderstellung ein, da deren Aktivierung durch die Veränderung in der Membranspannung zusätzlich durch eine lokale Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration moduliert werden kann.

1.2.1 Spannungs- und calciumabhängige Kaliumkanäle

Die spannungs- und calciumabhängigen (*big conductance*) Kaliumkanäle (BK-Kanäle) gehören zu einer Unterfamilie der Kaliumkanäle, der sogenannten Slo-Familie, deren Mitglieder charakteristisch eine außergewöhnlich hohe Leitfähigkeit aufweisen. Zusätzlich zum Slo1-Typ, der durch die BK-Kanäle repräsentiert wird, gibt es noch die Kaliumkanäle des Typs Slo2 (Santi et al., 2006) und Slo3 (spermienpezifischer Kaliumkanal, KSPER) (Zeng et al., 2011). Der BK-Kanal wird in der Literatur auch mit den Synonymen $K_{\text{Ca}}1.1$, MaxiK, Slowpoke oder Slo1 bezeichnet.

BK-Kanäle sind ubiquitär im Säugetier-Organismus exprimiert und spielen bei vielen physiologischen Abläufen eine entscheidende Rolle. In erregbaren Zellen sind sie unter anderem an der neuronalen Erregbarkeit und der auditorischen Wahrnehmung (Pyott et al., 2007) beteiligt. Außerdem sind BK-Kanäle für die Kontrolle der mechanischen Spannung in der glatten Muskulatur essentiell (Knaus et al., 1995; Wallner et al., 1999), bei der es durch die Hemmung der BK-Kanäle zu einer Depolarisation in den Muskelzellen und damit zu einer Muskelkontraktion kommt (Anwer et al., 1993; Brayden und Nelson, 1992). Eine lokal erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), die durch *calcium-induced calcium release* (CICR) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ausgelöst wird, kann außerdem BK-Kanäle in der glatten Muskulatur von Arterien aktivieren, die ihrerseits eine Hyperpolarisation dieser Zellen und damit eine Entspannung des Muskels bewirkt (Nelson et al., 1995). Außerdem spielen BK-Kanäle auch im Hippocampus eine wichtige Rolle (Hicks und Marrion, 1998) und sind bei Fröschen an der neuromuskulären Transmitterfreisetzung beteiligt (Robitaille und Charlton, 1992). Ergänzend dazu wurden auch in den Axonen und Nervenendigungen im zentralen Nervensystem der Ratte über Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung bereits BK-Kanäle identifiziert (Knaus et al., 1996).

Die Aktivierung von BK-Kanälen führt in erregbaren Zellen ganz allgemein zu einer Repolarisation, wodurch ein Prozess angestoßen wird, der als negative Rückkopplung

bezeichnet wird und unter anderem den durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vermittelten Calciumeinstrom beendet (Vergara et al., 1998).

BK-Kanäle sind außerdem in nicht-erregbaren Zellen wie beispielsweise den Chromaffinzellen der Nebenniere exprimiert, wo sie bei der K^+ -Sekretion und damit für die K^+ -Homöostase wichtig sind (Holtzclaw et al., 2011; Solaro und Lingle, 1992).

Eine effiziente Blockierung von BK-Kanälen wird durch positiv geladene Kationen wie beispielsweise Cäsium und Barium erreicht (Vergara und Latorre, 1983). BK-Kanäle sind darüber hinaus sensitiv gegenüber dem Nervengift Tetraethylammonium (TEA) (Kros und Crawford, 1990; Vergara et al., 1984) und dem Pilz-Indolalkaloid Paxillin (Knaus et al., 1994). Die Skorpionsgifte Charybdotoxin (ChTx) (Kros et al., 1998; Miller et al., 1985) und Iberiotoxin (IbTx) (Galvez et al., 1990; Kros et al., 1998) bewirken ebenfalls eine selektive Hemmung von BK-Kanälen.

1.2.2 Aufbau von BK-Kanälen

1.2.2.1 α -Untereinheit

Im Jahr 1991 wurde der BK-Kanal zum ersten Mal aus der cDNA des *Slowpoke1*-Gens von *Drosophila* kloniert (Atkinson et al., 1991; Butler et al., 1993; Elkins et al., 1986; Latorre und Brauchi, 2006; Soom et al., 2008). Die in den verschiedenen Spezies nachfolgend detektierten BK-Gensequenzen weisen eine hohe Sequenzhomologie untereinander auf, wie beispielsweise auch das humane Äquivalent *Kcnma1* (Butler et al., 1993; Fodor und Aldrich, 2009; Shipston, 2001). Von diesen einzelnen konservierten Spezies-spezifischen Genen werden alle bisher bekannten cDNA-Varianten der porenbildenden BK α -Untereinheit gebildet.

Die BK-Kanäle sind aus einem Tetramer aus vier porenbildenden α -Untereinheiten (Shen et al., 1994), die aus jeweils sieben Transmembrandomänen (TMD) bestehen (S0-S6), aufgebaut (Abb. 6). Im Gegensatz zu den K_v -Kanälen, die aus sechs TMD aufgebaut sind, besitzen die BK-Kanäle also eine zusätzliche S0-TMD und weisen damit einen extrazellulären N-Terminus auf (Wallner et al., 1996). Die Segmente S0 bis S4 sind in dieser Darstellung als „*voltage-sensor domain*“ (VSD) dargestellt, wovon die vierte positiv-geladene TMD (S4) als tatsächlicher Spannungssensor dient. Das fünfte und sechste Segment bilden zusammen mit dem dazwischenliegenden und in allen porenbildenden Kaliumkanälen konservierten Kaliumselektivitätsfilter die eigentliche Kanalpore („*pore-gate domain*“, PGD) (Doyle et al., 1998).

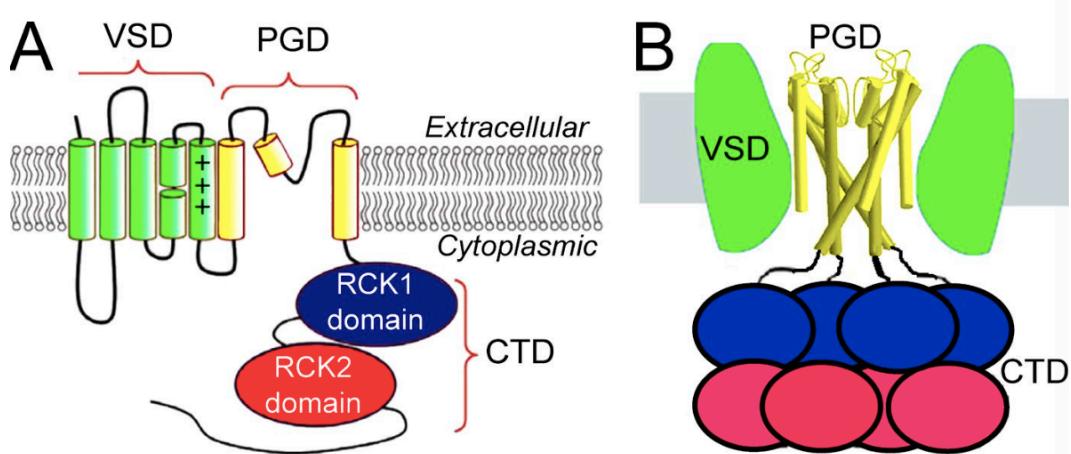


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Topologie einer BK α -Untereinheit (A) sowie eines tetrameren BK α -Kanals (B)

A, Topologieschema einer einzelnen porenbildenden BK α -Untereinheit mit drei verschiedenen Domänen. Die „*voltage-sensor*“-Domäne (VSD; grün) wird aus den Segmenten S0-S4 gebildet, wovon die positiv geladene S4-TMD als Spannungssensor dient. Die 5. und 6. TMD mit der dazwischenliegenden Kernschleife spannen die „*pore-gate*“-Domäne (PGD, gelb) auf. Der zytoplasmatische C-Terminus (CTD) enthält die beiden hydrophoben Sequenzen, die sogenannten *regulators of conductance for K⁺* (RCK1 domain, RCK2 domain; zwei RCK-Domänen pro Untereinheit; (Rothberg, 2012), die für die Bindung von Ca²⁺-Ionen zuständig sind. **B**, Schematische Darstellung eines tetrameren BK-Kanals mit VSD, PGD und der oktameren Anordnung der RCK-Domänen im CTD (Zhou et al., 2017).

Die Abhängigkeit von Calcium stellt eine Besonderheit der BK-Kanäle dar, die durch spezielle Strukturen innerhalb der α -Untereinheiten bedingt ist. So besitzen sie eine über 800 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne (CTD), die zwei Drittel des Gesamtproteins ausmacht und vier weitere hydrophobe Segmente (S7 bis S10) enthält (Adelman et al., 1992; Butler et al., 1993; Meera et al., 1997; Swartz, 2004; Wu et al., 2010). Im C-Terminus liegen darüber hinaus zwei Regionen, sogenannte *regulators of conductance for K⁺* (RCK), die durch negativ geladene Aspartatreste eine hohe Affinität gegenüber Ca²⁺-Ionen aufweisen (Jiang et al., 2001; Schreiber und Salkoff, 1997; Schreiber et al., 1999; Yuan et al., 2010). Trotz der geringen Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen (Fodor und Aldrich, 2006) weisen die RCK1- und die, oft auch als „*calcium-bowl*“-bezeichnete (Schreiber und Salkoff, 1997), RCK2-Domäne deutliche Ähnlichkeit in ihrer dreidimensionalen Struktur auf (Yuan et al., 2010). Diese strukturellen Gegebenheiten sind dafür verantwortlich, dass die BK-Kanäle auf unterschiedliche Spannungen sowie [Ca²⁺]_i reagieren können und sind demnach für die Aktivierung des Kanals von entscheidender Bedeutung (Latorre et al., 1982; Schreiber et al., 1999). Konformationsänderung der BK α -Untereinheiten, die auf die Aktivierung des Spannungssensors bzw. auf die Aktivierung durch Ca²⁺-Ionen zurückzuführen ist, führt zur Öffnung der Kanalpore und damit zu einem Ausstrom von K⁺-Ionen (Magleby, 2003; Niu et al., 2004; Xia et al., 2002).

Die funktionale Diversität der BK-Kanäle in Säugetieren wird durch alternatives Spleißen der *Kcnma1*-mRNA an bislang sechs bekannten Stellen im C-Terminus und einer im N-Terminus bedingt, sodass in verschiedenen Geweben und Zellen Kanäle mit unterschiedlichen biophysikalischen Funktionen vorliegen (Fodor und Aldrich, 2009; Latorre et al., 2017). Diese können beispielsweise eine Veränderung der Sensitivität der BK-Kanäle gegenüber Ca^{2+} -Ionen hervorrufen (Tseng-Crank et al., 1994). Alternatives Spleißen spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Lokalisation der Kanäle in die Plasmamembran oder in intrazelluläre Organellen (Singh et al., 2012; Zarei et al., 2004).

Auch post-transkriptionale Modifikationen wie die Phosphorylierung des BK-Kanals in nativen Zellen sind an der biophysikalischen Variabilität der Kanäle beteiligt. In der glatten Muskulatur und in Neuronen werden BK-Kanäle beispielsweise durch das Anfügen von Phosphatresten durch die cAMP-abhängige Kinase aktiviert, wohingegen sie die Aktivität in der Hypophyse inhibiert (Contreras et al., 2013).

Die Assoziation der porenbildenden α -Untereinheit mit einer variablen Anzahl an verschiedenen modulatorischen β - oder γ -Untereinheiten baut darüber hinaus die physiologische und biophysikalische Vielseitigkeit der BK-Kanäle weiter aus und wird in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

1.2.2.2 β -Untereinheiten

BK α -Kanäle in Säugetieren können durch vier verschiedene, gewebsspezifisch exprimierte β -Untereinheiten, $\beta 1$ bis $\beta 4$ (*Kcnmb1-4*), bestehend aus ungefähr 191 Aminosäuren, moduliert werden (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Knaus et al., 1994; Li et al., 2016a). Alle vier β -Untereinheiten sind aus jeweils zwei membran durchspannenden Domänen, die über eine extrazelluläre Schleife verbunden sind, aufgebaut und weisen damit einen zytoplasmatischen C- als auch N-Terminus auf (Orio et al., 2002). Es wird vermutet, dass die Interaktion der α - und β -Untereinheit der BK-Kanäle über die S0-TMD im extrazellulären N-Terminus der α -Untereinheit und der extrazellulären Schleife der β -Untereinheit erfolgt (Wallner et al., 1999).

Die $\beta 1$ -Untereinheit wurde zum ersten Mal im Jahr 1994 beschrieben (Knaus et al., 1994) und liegt in der glatten Muskulatur, in den sensorischen Haarzellen des Innenohrs und in verschiedenen Neuronen vor (Orio et al., 2002). In den Chromaffinzellen der Nebenniere (Xia et al., 1999) und im Gehirn (Hicks und Marrion, 1998; Pyott, 2004) sind vornehmlich $\beta 2$ -Untereinheiten anzutreffen. Das Vorkommen von $\beta 3$ -Untereinheiten wurde vor allem in Hoden, der Milz und dem Pankreas detektiert (Xia et al., 2000) das der $\beta 4$ -Untereinheit im Gehirn, dem Detrusormuskel der Blase und im Hoden (Brenner et al., 2000; Chen und Petkov, 2009).

In heterologen Expressionssystemen wurde für die gleichzeitige Proteinbiosynthese der BK α -Untereinheit zusammen mit jeweils einer der vier β -Untereinheiten einen Einfluss auf die Calcium-Sensitivität und die Kinetik der BK-Kanäle aufgezeigt. Die humanen Isoformen $\beta 1$ und $\beta 2$ bewirken hierbei eine verringerte Aktivierung sowie Inaktivierung der BK α -Kanäle und eine Erhöhung der Calcium-Sensitivität, sodass die Aktivierungsspannung der BK α -Untereinheiten bei einer zytosolisch erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ von 1 μM und höher um entsprechend etwa -80 mV bzw. -60 mV verschoben ist (Cox und Aldrich, 2000; McManus et al., 1995; Nimigean und Magleby, 2000; Orio und Latorre, 2005; Wallner et al., 1999; Xia et al., 1999).

Die vier verschiedenen Spleißvarianten der $\beta 3$ -Untereinheit ($\beta 3a-d$) führen meist zu einer schnelleren aber unvollständigen Inaktivierung der BK-Kanäle und für die Maus-Isoform zu einer Verschiebung der Aktivierungsspannung um -30 mV bei einer $[Ca^{2+}]_i$ von 0 und 1 μM (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Xia et al., 2000; Zeng et al., 2008, 2007).

Die $\beta 4$ -Untereinheit bewirkt dagegen eine verringerte Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung und eine Verringerung der Spannungssensitivität von etwa +35 mV in Abwesenheit von Calcium sowie eine Erhöhung um etwa -25 mV bei einer hohen $[Ca^{2+}]_i$ von über 1 μM (Brenner et al., 2000; Contreras et al., 2013; Wang et al., 2006). $\beta 4$ löst durch die Interaktion seiner positiv geladenen Aminosäureresten in seiner extrazellulären Schleife mit den negativ geladenen Aminosäureresten der α -Untereinheit zusätzlich eine Resistenz der BK-Kanäle gegenüber ChTx und IbTx aus, indem es deren Bindung an die Kanäle verhindert (Meera et al., 2000; Weiger et al., 2000). Die $\beta 4$ -Untereinheit bedingt darüber hinaus die Oberflächenexpression von SLO3, bewirkt jedoch keine Aktivierungsverschiebung der pH-Abhängigkeit der KSPER-Kanäle (Yang et al., 2011).

BK-Kanäle sind außerdem in der Lage, mit ein bis vier β -Untereinheiten zu interagieren, was zu einer abgestuften Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der BK-Kanäle führt und dadurch zusätzlich die biophysikalische Variabilität der BK-Kanäle erhöht (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Wang et al., 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass die BK-Kanal-Komplexe nicht aus den gleichen vier α - oder β -Untereinheiten aufgebaut sein müssen und es noch immer unklar ist, unter welchen Bedingungen die vier jeweiligen Untereinheiten identisch sind und unter welchen verschieden.

1.2.2.3 γ -Untereinheiten

Innerhalb der letzten Jahre gelang die Identifikation weiterer Strukturen, welche die BK-Kanäle auf eine andere Weise modulieren als die bereits bekannten β -Untereinheiten. Aufgrund dieser funktionalen wie auch ihrer strukturellen Unterschiede zu den β -Untereinheiten wurden die Mitglieder dieser Proteinfamilie als neue γ -Untereinheiten klassifiziert (Hoshi et al., 2013; Yan und Aldrich, 2012; Zhang und Yan, 2014).

Die Mitglieder dieser *leucin-rich repeat containing* (LRRC)-Proteinfamilie, LRRC26 ($\gamma 1$), LRRC52 ($\gamma 2$), LRRC55 ($\gamma 3$) und LRRC38 ($\gamma 4$), sind aus einer TMD, einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und einem langen extrazellulären N-Terminus mit dem wiederkehrenden Leucin-reichen Motiv (LRR-Domäne) aufgebaut und besitzen eine Größe von ungefähr 35 kDa (Abb. 7) (Yan und Aldrich, 2010, 2012). Das im N-Terminus liegende Signalpeptid ist für die Translokation der LRR-Domäne in den Extrazellularraum zuständig. Die extrazelluläre LRR-Domäne wird beim Menschen von sechs, bei der Maus von fünf, 24 bis 25 Aminosäuren langen LRR-Motiven, die von jeweils einer cystein-reichen Region am N-Terminus (LRRNT) und in Richtung der C-terminalen Endigung (LRRCT) flankiert werden, aufgespannt. LRRC-Proteine sind darüber hinaus teilweise glykosyliert (human $\gamma 1$: eine N-, human $\gamma 2$: vier N-, Maus $\gamma 2$: fünf N-Glykosylierungsstellen). Die Aminosäuresequenzen der LRRC-Proteine weisen jedoch untereinander nur eine Ähnlichkeit von 35-40 % auf, was auf die Unterschiede in den „nicht-LRR“-Regionen zurückzuführen ist (Latorre et al., 2017; Zhang und Yan, 2014).

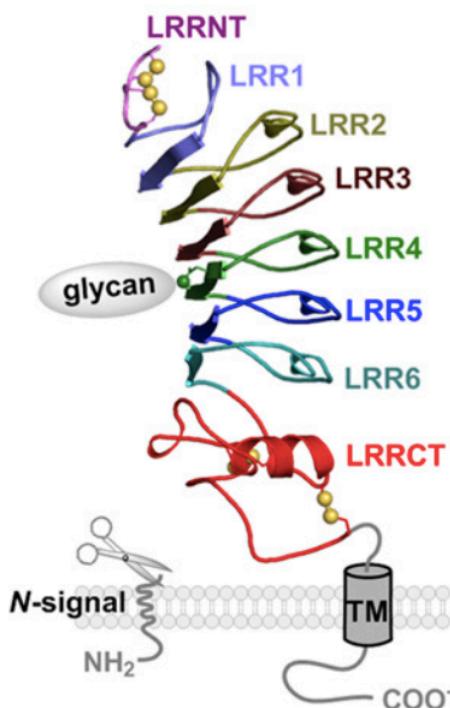


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Topologie einer humanen $\gamma 1$ -Untereinheit
 Die γ -Untereinheiten sind aus einer Transmembrandomäne (TM), einem kurzen zytoplasmatischen C-Terminus (COO-) und einem langen extrazellulären N-Terminus mit dem wiederkehrenden Leucin-reichen Motiv (LRR-Domäne) aufgebaut. Die LRR-Domäne ist N-glykosyliert und besteht aus sechs Leucin-reichen Sequenzen (LRR1-6), die von zwei Cystein-reichen Regionen flankiert werden (LRRNT und LRRCT). Nach der Abspaltung des Signalpeptids (N-signal) lokalisiert der lange N-Terminus auf der extrazellulären Membranseite. In den LRRNT- und LRRCT-Sequenzen ist die Ausbildung potentieller Disulfidbrücken möglich (gelb markierte Kugeln). Über ein Stickstoffatom der Aminosäure Asparagin (grün markierte Kugel) wird die Verknüpfung der N-Glykosylierung vermittelt (Yan und Aldrich, 2012).

Die LRRC-Proteine werden wie die β -Untereinheiten gewebespezifisch exprimiert und sind vermutlich für die verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften der BK-Kanäle mitverantwortlich. Die $\gamma 1$ -Untereinheit ist in elektrisch erregbaren Zellen wie den arteriellen Myozyten von Ratten (Evanson et al., 2014) sowie in sekretorischen Epithelzellen, wie den Tränendrüsen, den Ohrspeicheldrüsen und im Dickdarm lokalisiert (Yang et al., 2017). In einer Studie von Egland et al. wurde bereits im Jahr 2006 in der Prostata und den Speicheldrüsen eine starke Proteinbiosynthese von $\gamma 1$ sowie in Pankreas und im Dünn- und Dickdarm eine etwas geringere $\gamma 1$ -Biosynthese festgestellt. Für Brust-, Prostata-, Dickdarm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs wurde in diesen Untersuchungen ebenfalls ein Vorliegen von $\gamma 1$ beschrieben (Egland et al., 2006; Liu et al., 2012). Aufgrund der Kolokalisation von $\gamma 1$ mit Zytokeratinen und Intermediärfilamenten erhielt dieses zusätzlich den Namen *cytokeratin-associated protein in cancer* (CAPC) (Egland et al., 2006). Die $\gamma 2$ -Untereinheit liegt vor allem in den Hoden und im Skelettmuskel vor (Yan und Aldrich, 2012) und konnte zuvor bereits als γ -Untereinheit des pH-sensitiven SLO3 (oder KSPER)-Kaliumkanals in menschlichen Spermien identifiziert werden (Yang et al., 2011; Zeng et al., 2011). $\gamma 3$ -Untereinheiten sind vor allem im neuronalen System anzutreffen, wohingegen die $\gamma 4$ -Untereinheit in Cerebellum, Thymus, Nebenniere, Skelettmuskel und Hoden nachgewiesen wurde (Evanson et al., 2014; Yan und Aldrich, 2012; Zhang und Yan, 2014).

1.2.2.3.1 Physiologische Relevanz der γ -Untereinheiten

Zu den Auswirkungen der vier LRRC-Proteine auf die BK-Kanäle gehört vor allem eine von der jeweiligen Untereinheit abhängige Verschiebung der Aktivierungsspannung von BK-Kanälen zu negativen Potentialen (Hoshi et al., 2013; Yan und Aldrich, 2010, 2012; Zhang und Yan, 2014). BK α -Ströme aktivieren in heterologen Expressionssystemen und bei virtueller Abwesenheit von $[Ca^{2+}]_i$ erst bei etwa +100 mV (Thurm et al., 2005; Yan und Aldrich, 2012). In nicht-erregbaren Prostatakrebszellen (*Lymph Node Carcinoma of the prostate*, LNCaP) wurde erstmals eine durch $\gamma 1$ ausgelöste Verschiebung der Aktivierung des BK-Stroms in Richtung des Ruhemembranpotentials bei einer sehr geringen Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen (Yan und Aldrich, 2010). Nach heterologer Expression von α - und β -Untereinheiten in HEK-Zellen, denen spannungsgesteuerte Calciumkanäle für eine intrazelluläre Calciumerhöhung fehlen, wurde die halbmaximale Aktivierungsspannung der BK-Kanäle in Anwesenheit von LRRC26 um -140 mV, von LRRC52 um -100 mV, von LRRC55 von -50 mV und von LRRC38 um -20 mV verschoben (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Li et al., 2016b; Yan und Aldrich, 2012, 2010). Diese unterschiedlich starken Auswirkungen der LRRC-Proteine auf die BK-Aktivierungsspannungen sind für die Namensgebung verantwortlich: LRRC26 wird mit $\gamma 1$, LRRC52 mit $\gamma 2$, LRRC55 mit $\gamma 3$ und

LRRC38 mit $\gamma 4$ bezeichnet. Durch die oben genannten Eigenschaften können BK-Kanäle, die mit γ -Untereinheiten assoziiert sind, nicht nur in nicht-erregbaren Zellen unter physiologischen Bedingungen aktivieren, sondern öffnen sich in erregbaren Zellen unabhängig von $[Ca^{2+}]_i$ auch bei negativen Membranspannungen (Yan und Aldrich, 2012; Zhang und Yan, 2014).

In nativen Zellen wurde für die $\gamma 1$ -Untereinheit bereits eine Kolokalisation mit BK-Kanälen in der Plasmamembran arterieller Myozyten von Ratten detektiert, was zu einer Erhöhung der Spannungs- und Calciumsensitivität der BK-Kanäle und damit zu einer Erweiterung der Blutgefäße führt (Evanson et al., 2014). Für die vermeintliche spermien-spezifische Expression von $\gamma 2$ wurde bei bestimmten pH-Konzentrationen zwar eine Verschiebung der Aktivierungsspannung des pH-sensitiven KSPER-Stroms zu negativen Potentialen nachgewiesen (Yang et al., 2011), eine Kolokalisation oder gar funktionale Interaktion mit BK-Kanälen wurde dagegen noch nicht nachgewiesen. Die physiologische Relevanz der $\gamma 3$ - und $\gamma 4$ -Untereinheiten konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden.

Über die Stöchiometrie von α - und γ -Untereinheiten gibt es bislang noch keine Erkenntnisse. Durch die heterologe Expression verschiedener $\alpha:\gamma 1$ -Verhältnisse in *Xenopus* Oozyten ist bisher lediglich bekannt, dass γ -Untereinheiten einen „alles-oder-nichts“-Einfluss auf BK-Kanäle ausüben (Gonzalez-Perez et al., 2014). Entgegen der abgestuften Effekte der Assoziation der α -Untereinheit mit ein bis vier β -Untereinheiten (Wang et al., 2002) wird der vollständige modulatorische Effekt hier durch das Vorhandensein von nur einer $\gamma 1$ -Untereinheit zusammen mit der α -Untereinheit ausgelöst. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die heterolog exprimierten BK α -Kanäle sowohl $\beta 2$ als auch $\gamma 1$ enthielten (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Gonzalez-Perez et al., 2014). Ob die Gene dieser Untereinheiten jedoch in nativen Zellen funktional exprimiert werden bleibt weiterhin unklar. Die Modulation der BK-Kanäle durch $\gamma 1$ -Untereinheiten wird vermutlich über eine 20-fache Erhöhung der allosterischen Kopplung zwischen dem Spannungssensor und der Kanalpore bewirkt (Yan und Aldrich, 2010). Mithilfe von heterologen BK γ -Proteinchimären wurden die verschiedenen modulatorischen Effekte auf BK-Kanäle durch die unterschiedlichen Sequenzen der γ -Untereinheiten genauer untersucht und eine kurze Region in der TMD und deren angrenzenden intrazellulären und positiv geladenen Aminosäuren als strukturelle Ursache identifiziert (Li et al., 2015).

Die γ -Untereinheiten könnten ein interessantes diagnostisches und pharmakologisches *target* für medizinische Fragestellungen darstellen, da die Proteinbiosynthese für LRRC-Proteine in verschiedenen Krebszellen sehr stark ist (Egland et al., 2006; Liu et al., 2012; Yan und Aldrich, 2010) und gleichzeitig auch eine erhöhte Aktivierung von BK-Kanäle in Gliomen, Prostata- und Knochentumoren festgestellt wurde (Bloch et al., 2007; Cambien et al., 2008; Weaver et al., 2004).

1.2.3 Aktivierungsmechanismus von BK-Kanälen

Wie bereits erwähnt, können BK-Kanäle unter physiologischen Bedingungen sowohl durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ als auch durch ein depolarisiertes Membranpotential aktiviert werden (Cui et al., 2009; Latorre et al., 1989). Für die Öffnung des Kanals ist ein umgekehrt proportionales Zusammenspiel zwischen den oben genannten Bedingungen von entscheidender Bedeutung und hängt damit vom Status des Calcium- und des Spannungssensors ab.

Die Aktivierung der BK-Kanäle wird in einem von Horrigan et al. entwickelten Modell mit einer zweistufigen Konformationsänderung erklärt. So sind die Kanalöffnung und die Aktivierung des Spannungssensors zwar unabhängig voneinander, sie können sich jedoch über einen allosterischen Mechanismus beeinflussen (Cui et al., 1997, 2009; Horrigan und Aldrich, 1999). Die Aktivierung des Spannungssensors durch eine Membrandepolarisation führt hierbei zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, die wiederum den Spannungssensor empfindlicher für Membrandepolarisationen macht. Umgekehrt führt die Aktivierung des Spannungssensors zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Affinität des Calciumsensors, sodass durch die Ca^{2+} -Bindung ihrerseits die Aktivierung des Spannungssensors erhöht wird (Xia et al., 2002). Die Wahrscheinlichkeit einer Öffnung der Kanalpore steigt demnach mit höheren Ca^{2+} -Konzentrationen und/oder höheren Depolarisationen, sodass der BK-Kanal auch als Koinzidenzdetektor bezeichnet wird (Hoshi et al., 2013). Normalerweise ist eine $[Ca^{2+}]_i$ von über 10 μM bis in den millimolaren Bereich notwendig, um BK-Kanäle erfolgreich zu aktivieren. Die Ca^{2+} -Ionen binden hierbei an die entsprechenden BK-Sequenzabschnitte und bewirken eine Verschiebung der spannungsabhängigen Parameter zu negativeren Potentialen. Damit ist eine Öffnung der BK-Kanäle also auch unter physiologischen Bedingungen, also bei Spannungen nahe dem Ruhemembranpotential, möglich (Cox et al., 1997). Andersherum ist durch die allosterische Aktivierung der Kanäle in erregbaren Zellen somit auch ohne Aktivierung der Spannungssensoren eine Öffnung der BK-Kanäle bei positiven Membranspannungen möglich (Horrigan und Aldrich, 1999; Horrigan et al., 1999).

Da die Spannungsabhängigkeit der BK-Kanal-Öffnung stark von der $[Ca^{2+}]_i$ abhängt, sind die BK-Kanäle häufig in der Nähe spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (*voltage-gated Ca²⁺ channels*, VGCC) lokalisiert, deren Ca^{2+} -Einstrom wiederum eine erleichterte Öffnung der BK-Kanäle bewirkt (Lu et al., 2006). BK-Kanäle liegen deshalb oftmals mit anderen Ionenkanälen (Berkefeld et al., 2006; Fakler und Adelman, 2008) und/oder Enzymen (Alioua et al., 2002; Lu et al., 2006) in sogenannten makromolekularen Proteinkomplexen vor. Eine räumliche Nähe von BK-Kanälen zu allen VGCC-Unterfamilien und deren möglichen molekularen Interaktionen wurden bereits in verschiedenen heterologen Expressionsstudien sowie teilweise im Rattengehirn nachgewiesen. Hierzu gehören die L-Typ-Calciumkanäle

$\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ und der P/Q-Typ-Kanal $\text{Ca}_v2.1$ in Hirnschnitten (Berkefeld et al., 2006; Grunnet und Kaufmann, 2004; Vivas et al., 2017), der N-Typ-Kanal $\text{Ca}_v2.2$ in Hippocampusschnitten (Loane et al., 2007; Marrion und Tavalin, 1998) und der T-Typ-Kanal $\text{Ca}_v3.2$ in der Prostatakrebszelllinie LNCaP (Gackière et al., 2013).

1.2.4 BK-Kanäle in inneren Haarsinneszellen

Die als calcium- und spannungsabhängig beschriebenen BK-Kanäle liegen in den IHZ von Mäusen und Ratten ab Hörbeginn, also ab einem Alter von 12 Tagen (Ehret, 1985), vor und stellen damit eine Besonderheit von reifen IHZ dar. Mithilfe elektrophysiologischer und immunhistochemischer Analysen konnte die entwicklungsabhängige Proteinbiosynthese an Mäusen in einem Alter von P10 mit einem geringen BK-Strom und wenig Immunreaktivität, von P14 mit einer intensiveren Immunreaktivität und einem mittelstarken BK-Strom bis hin zu P20 mit hohen BK-Stromwerten und intensiven BK-Kanal Clustern nachgewiesen werden (Pyott, 2004). Ab der dritten postnatalen Woche erreicht der BK-Kanal seine persistierende Maximalstromamplitude (Abb. 8). Die für die schnell aktivierenden K^+ -Ströme ($I_{\text{K},f}$) verantwortlichen BK-Kanäle schalten durch ihre massive Hochregulation und in Zusammenarbeit mit den KCNQ4-Kanälen die postnatale Phase der Spontanaktivität in IHZ ab. Die IHZ werden dadurch in sensorische Zelltypen umgewandelt und sind nun in der Lage, ein Schall-gekoppeltes, graduiertes Rezeptorpotential zu bilden (Kros et al., 1998; Langer et al., 2003), sodass sie, wie andere Sinneszellen auch, mit einer fein abgestuften Transmitterausschüttung auf unterschiedlich starke Reizintensitäten reagieren können.

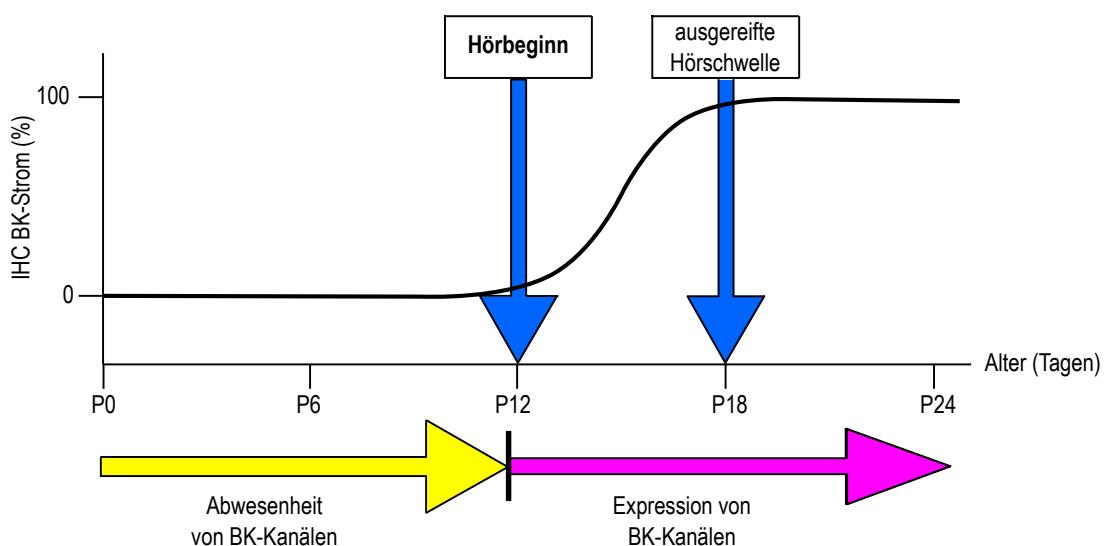


Abbildung 8: Entwicklungsabhängiges Auftreten von murinen BK-Strömen

Vor Hörbeginn (P12) ist kein calcium- und spannungsabhängiger BK-Strom vorhanden. Der BK-Strom wird um P12 hochreguliert und erreicht einen konstanten Maximalstrom ab Beginn der dritten postnatalen Woche. P0= Tag der Geburt (in Anlehnung an (Kros et al., 1998)).

Die Aktivierungszeitkonstanten der BK-Kanäle in IHZ sind selbst spannungsabhängig und liegen zwischen 0,2 und 0,7 ms, sind damit im Vergleich zu anderen Ionenkanälen also sehr schnell (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). An der IHZ kommt es aufgrund der großen Leitfähigkeit der BK-Kanäle zu einer schnellen Repolarisation des Rezeptorpotentials sowie einer auf die Hälfte bis ein Drittel verringerten Membranzeitkonstante. Aufgrund der großen BK-Leitfähigkeit können die durch die MET-Kanäle in die Zelle einströmenden depolarisierenden K^+ -Ionen schnell wieder ausströmen, sodass dadurch das Ruhemembranpotential der IHZ wieder hergestellt werden kann (Marcotti et al., 2004; Oliver et al., 2006).

In IHZ gibt es außerdem Hinweise darauf, dass sich der BK-Gesamtstrom aus zwei unterschiedlichen spannungsaktivierten Komponenten zusammensetzt. Zusätzlich zur bereits bekannten Iberiotoxin-sensitiven Komponente $I_{K,f}$, wurde in IHZ von Mäusen eine sehr kleine und relativ schnell aktivierende Iberiotoxin-resistente Komponente identifiziert, die durch den $Ca_v1.3$ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom aktiviert und mit $I_{K,Ca}$ bezeichnet wurde (Marcotti et al., 2004). Diese besitzt außerdem eine wesentlich langsamere Aktivierungszeitkonstante die sich für $I_{K,Ca}$ von 2 bis 11 ms im basalen Teil bis hin zu 12 bis 48 ms im apikalen Bereich der Cochlea erstreckt, wohingegen sie für die große BK-vermittelte Strom-Komponente $I_{K,f}$ von 0,2 bis 0,7 ms reicht (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Welche molekulare Grundlage den beiden unterschiedlichen Stromkomponenten zugrunde liegt, konnte bislang noch nicht aufgedeckt werden.

In den IHZ von Vögeln, Reptilien und Amphibien wird die Frequenzkodierung über eine lokal unterschiedlich starke Proteinbiosynthese von $Ca_v1.3$ - und BK-Kanälen bewerkstelligt, sodass einzelne HZ entlang des sensorischen Epithels für spezielle Tonfrequenzen zuständig sind (Art und Fettiplace, 1987a; Fuchs und Evans, 1990; Hudspeth und Lewis, 1988; Pyott und Duncan, 2016; Roberts et al., 1990). Die Kombination aus der Aktivierung der $Ca_v1.3$ -Kanäle, den verschiedenen BK-Spleißvarianten mit daraus resultierenden verschiedenen kinetischen Eigenschaften und der Größe des Ca^{2+} -Einstroms hat einen sogenannten *electric tuning* Mechanismus hervorgebracht, mit dem verschiedene Schallfrequenzen aufgelöst werden können (Navaratnam et al., 1997; Pyott und Duncan, 2016; Ramanathan et al., 1999, 2000; Rosenblatt et al., 1997). Die BK-Kanäle in den IHZ von Vögeln, Reptilien und Amphibien sind darüber hinaus mit $Ca_v1.3$ -Kanälen kolokalisiert und werden durch deren Schall-induzierten Ca^{2+} -Einstrom aktiviert, sodass es zur Repolarisation der IHZ kommt (Art und Fettiplace, 1987a; Pyott und Duncan, 2016; Roberts et al., 1990).

Im Gegensatz dazu besitzen Säugetiere durch eine evolutionär neu entwickelte mechanisch abgestimmte Cochlea, in der zusätzlich motile äußere Haarsinneszellen als cochleärer Verstärker eine Rolle spielen, einen ausgeprägten Hörsinn mit einem weitaus größeren

Frequenzbereich als bei Vögeln, Reptilien oder Amphibien (Manley et al., 2004). Bei Säugetieren findet eine sogenannte “Orts-Frequenz”-Kodierung statt, bei der durch eine Tonfrequenz jene IHZ am stärksten aktiviert werden, die auf demjenigen Bereich der Basilarmembran aufsitzen, der durch die Schallwellen-induzierte Wanderwelle im Innenohr die stärkste Auslenkung erfährt (Békésy und Wever, 1960). Dementsprechend arbeiten die BK-Kanäle in den IHZ von Säugern auf andere Weise als in denen anderer Vertebraten und weisen offenbar auch keine funktionale Kopplung mehr zu $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen auf. So ist das BK α -Protein hier hauptsächlich am Hals der IHZ lokalisiert und ist damit mehrere Mikrometer entfernt von den Clustern präsynaptischer $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle (Fell et al., 2016; Rutherford, 2015; Wong et al., 2014). Passend dazu ist bereits bekannt, dass der schnell-aktivierende $I_{K,f}$ unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} -Einstrom durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle ist (Kros und Crawford, 1990; Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Ungewöhnlicherweise aktivieren BK-Kanäle in IHZ jedoch bereits bei sehr negativen Spannungen, nämlich bei -75 mV, mit einer halbmaximalen Aktivierungsspannung von ungefähr -50 mV.

Sowohl die negative Aktivierungsspannung als auch die Ca^{2+} -Unabhängigkeit deuten daraufhin, dass BK-Kanäle als rein spannungsabhängige Kanäle in IHZ fungieren und damit auch unter physiologischen Spannungen funktionsfähig sind (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Die molekularen Ursachen für den negativen Aktivierungsbereich der BK-Kanäle konnten bislang noch nicht aufgeklärt werden.

1.2.4.1 Aktivierung der BK-Kanäle durch Interaktion von BK α mit modulatorischen Untereinheiten

BK-Kanäle kommen in den IHZ aller Vertebraten vor und weisen durch alternatives Spleißen ihrer Untereinheiten sowie durch die unterschiedliche Kanalzusammensetzung aus diesen Untereinheiten in heterologen Expressionssystemen eine Vielzahl unterschiedlicher biophysikalischer Merkmale auf. Unterschiedliche BK α -Spleißvarianten sowie deren Interaktion mit verschiedenen modulatorischen Untereinheiten, für die in heterologen Expressionssystemen bereits eine Verschiebung der Aktivierungsspannung von BK-Kanälen nachgewiesen wurde, könnten auch in den IHZ von Säugern für die ungewöhnliche negative Aktivierung der BK-Kanäle in Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verantwortlich sein.

So wurde in den IHZ von Hühnern beispielsweise bereits gezeigt, dass eine Assoziation der BK α -Untereinheit mit der β -Untereinheit die Calciumsensitivität erhöht und die Aktivierungsspannung zu negativeren Potentialen verschiebt (Ramanathan et al., 1999, 2000). Bei Schildkröten und Küken sind zudem unterschiedliche Spleißvarianten der BK α -Untereinheit zusammen mit einer graduierten Proteinbiosynthese der β -Untereinheiten entlang der tonotopen Achse des Corti-Organs für die funktionale Heterogenität der

BK-Kanälen und den Mechanismus des „*electric tuning*“ verantwortlich (Fettiplace und Fuchs, 1999).

In IHZ von Säugetieren wurden zwar bereits verschiedene C-terminale *Kcnma1*-Spleißvarianten gefunden, die in die Aktivierung der BK-Kanäle involviert sein könnten, jedoch war deren Expressionslevel sehr gering und auch ihre subzelluläre Lokalisation bleibt weiterhin unklar (Langer et al., 2003; Sakai et al., 2011). Die physiologische Bedeutung dieser Spleißvarianten konnte im Säugetier bislang ebenfalls noch nicht aufgeklärt werden. Lediglich zwei orthologe C-terminalen Spleißvarianten wurden in IHZ von Küken bereits mithilfe elektrophysiologischer Messungen untersucht (Michael T et al., 1997). In dieser Studie wurde kein Unterschied im Aktivierungsverhalten der BK-Kanäle durch diese beiden Spleißvarianten festgestellt. Da die Aminosäuresequenzen von BK-Kanälen der Ratte und dem Küken eine Sequenzhomologie von 87-100 % aufweisen wird vermutet, dass die Spleißvarianten der Ratte ähnliche Charakteristika aufweisen (Langer et al., 2003).

Die Expression verschiedener BK α -Spleißvarianten in der Cochlea während der Entwicklung, deutet außerdem darauf hin, dass sie für das intrazelluläre *targeting* der BK-Kanäle und/oder deren Anordnung mit weiteren Proteinen zu Multiproteinkomplexen, wie es bereits für spannungsabhängige K $^{+}$ -Kanäle beschrieben wurde, verantwortlich sein könnten (Kim et al., 2010). Verschiedene Spleißvarianten könnten somit der Grund für das entsprechende *trafficking* von BK-Kanälen zum Hals in den IHZ und zum synaptischen Pol in den ÄHZ sein (Pyott und Duncan, 2016). Daher wird vermutet, dass die BK α -Spleißvarianten keinen Einfluss auf das Aktivierungsverhalten der BK-Kanäle haben und andere Ursachen für die negative BK-Aktivierungsspannung in IHZ verantwortlich sind.

Beispielweise könnten auch die verschiedenen β -Untereinheiten die BK-Kanäle in IHZ von Säugetieren modulieren. In IHZ von Ratten wurden tatsächlich Transkripte für $\beta 1$ und $\beta 4$, nicht aber für $\beta 2$ identifiziert; $\beta 3$ wurde nicht untersucht (Langer et al., 2003). Für $\beta 4$ wurden in dieser Studie jedoch nur Transkripte in unreifen IHZ gefunden, wohingegen für $\beta 1$ eine synchrone Hochregulation mit BK α -Transkripten mit Hörbeginn nachgewiesen wurde. Die IHZ von $\beta 1/\beta 4$ -defizienten Doppel-KO-Mäusen weisen jedoch normale BK-Ströme und eine normale Lokalisation des BK α -Proteins auf (Pyott et al., 2007), was darauf hin deutet, dass weder $\beta 1$ noch $\beta 4$ für die negative Aktivierungsspannung der BK-Ströme in IHZ von Säugetieren verantwortlich sind. Mäuse, denen die $\beta 1$ -Untereinheit fehlt, besitzen außerdem einige Monate ein normales Hörvermögen und einen normalen cochleären Phänotyp (Rüttiger et al., 2004).

Die in diesem Abschnitt genannten Befunde weisen darauf hin, dass weder die BK α -Spleißvarianten noch die verschiedenen β -Untereinheiten für die negative Aktivierungsspannung von BK α in den IHZ in Abwesenheit von $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich sind.

Es muss also einen weiteren Mechanismus geben, durch den die BK-Kanäle in IHZ von Säugetieren unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} -Einstrom bei negativen Spannungen aktivieren. Die neu entdeckten LRRC-Proteine könnten in IHZ als γ -Untereinheiten den calcium- und spannungsabhängigen BK-Kanal in einen rein spannungsabhängigen Kanal umwandeln, der somit auch unter physiologischen Spannungen funktionsfähig wäre und damit die negative Aktivierung von BK-Kanälen in Abwesenheit von Ca^{2+} erklären. Durch die $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten wird jeweils zusammen mit der α -Untereinheit in heterologen Expressionssystemen die größte Verschiebung der BK-Aktivierungsspannung von 140 mV ($\gamma 1$) bzw. 100 mV ($\gamma 2$) in Richtung negativer Potentiale bewirkt, wodurch diese als potentielle Interaktionspartner der BK-Kanäle in den IHZ von Säugetieren fungieren könnten (Yan und Aldrich, 2012). Die $\gamma 1$ -Untereinheit gilt hierbei als wahrscheinlichster Kandidat, da darüber hinaus bereits eine funktionale Assoziation dieser mit den BK-Kanälen in nativen Zellen, nämlich arteriellen Myozyten (Evanson et al., 2014) sowie Tränen-, Ohrspeichel- und Speicheldrüsen (Yang et al., 2017) nachgewiesen wurde. Auch die bereits als γ -Untereinheit des BK-Kanal-verwandten SLO3-Kaliumkanals identifizierte $\gamma 2$ -Untereinheit stellt einen potentiellen Interaktionspartner für BK-Kanäle dar (Yang et al., 2011; Zeng et al., 2011). In nativen Zellen wurde jedoch bislang noch keine Interaktion zwischen $\gamma 2$ und BK α identifiziert. Das Vorliegen beider γ -Untereinheiten in murinen IHZ wurde in dieser Arbeit genauer untersucht.

1.2.5 BK α -defiziente Mauslinie

Um die Funktionen bestimmter Gene zu untersuchen, werden in der Forschung genetisch veränderte Organismen verwendet, in denen beispielsweise spezifische Gene ausgeschaltet werden (*Knockout*, KO). Analysen solcher KO-Individuen sind auch aus medizinischer Sicht von besonderem Interesse, da beispielsweise Funktionsstörungen von K^+ -Kanälen an einer Vielzahl neurologischer Beschwerden beteiligt sind. Eine Mutation in der *Kcnma1*-Sequenz führt beispielsweise zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für epileptische Anfälle (Du et al., 2005). Medikamente, die mit K^+ -Kanälen interagieren und somit für klinische Anwendungen in Frage kämen (Curran, 1998) können in diesen KO-Organismen auf ihre Wirksamkeit und Spezifität untersucht werden. Genetisch veränderte Organismen können also einen Hinweis darauf geben, in welche physiologischen und pathophysiologischen Prozesse bestimmte Proteine involviert sind.

In der konstitutiven BK α -defizienten Mauslinie ist die porenbildende α -Untereinheit des BK-Kanals durch homologe Rekombination systemisch deletiert (Sausbier et al., 2004). Dies führt in den KO-Tieren zu einer progredienten Schwerhörigkeit im hochfrequenten Bereich, einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Schalltraumata und einer zerebellären Ataxie (Rüttiger et al., 2004; Sausbier et al., 2004). Darüber hinaus wurde den BK $^{-/-}$ -Mäusen ein

erhöhter Blutdruck, der auf eine beeinträchtigte Vasodilatation und einen primären Hyperaldosteronismus zurückzuführen ist, sowie Gangunsicherheiten, die durch eine Purkinjezell-Dysfunktion im Kleinhirn ausgelöst werden (Sausbier et al., 2004, 2005), diagnostiziert. Die Abwesenheit der BK α -Untereinheit führte weiterhin zu einer überaktiven Blase (Meredith et al., 2004) sowie zu einer erektilen Dysfunktion (Werner et al., 2005).

BK $^{+/-}$ -Mäuse zeigen zusätzlich eine verzögerte Ausbildung von Aktionspotentialen (*Spiking*) in den auditorischen Nervenfasern und eine Beeinflussung des Rezeptorpotentials der IHZ. Die schallinduzierte Gleichspannungskomponente des Rezeptorpotentials steigt dadurch an und führt wegen früher Sättigung zu einer Reduzierung des dynamischen Bereichs. Die Wechselspannungskomponente des Rezeptorpotentials wird dagegen reduziert und verlangsamt (Oliver et al., 2006).

In einer weiteren Studie wurden Mäuse mit einer haarzellspezifischen Deletion der BK α -Untereinheit untersucht. Diese Tiere weisen eine Unfähigkeit auf, hohe Modulationsfrequenzen korrekt zu unterscheiden, sowie einen verminderten Lautstärkeumfang der Stimuluskodierung in den Neuronen eines zentralen Teils des auditorischen Systems, dem *Colliculus inferior* (Kurt et al., 2012). Die BK-Kanäle der IHZ sind demnach unerlässlich für die korrekte Kodierung der zeitlichen Feinstruktur sowie des dynamischen Bereichs der auditorischen Information.

Die aufgeführten vielfältigen Auswirkungen beider Mausmodelle zeigen die biologische Relevanz der BK-Kanäle für den Säugetierorganismus und machen beide zu einem interessanten Modellorganismus für unterschiedliche Forschungsanalysen. In der vorliegenden Arbeit wurden konstitutive BK α -defiziente Mäuse für verschiedene Fragestellungen verwendet.

1.3 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle (*voltage-gated calcium channels*, VGCCs) sind an vielen physiologischen Abläufen erregbarer Zellen beteiligt. Diese öffnen sich als Antwort auf eine Depolarisation der Zelle und bewirken einen Ca $^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Dadurch kommt es zu Zelltyp-spezifischen Auswirkungen wie beispielsweise der calciumabhängigen Gentranskription, der Sekretion von Hormonen oder Neurotransmittern, die Regulation der Muskelspannung oder der neuronalen Erregungsweiterleitung (Barbado et al., 2009; Catterall et al., 2005; Dolphin, 2013). Je nach Aktivierungsspannung unterteilt man VGCCs in zwei Hauptgruppen. Zu den VGCCs, die bei hohen Membranspannungen aktiviert werden, zählen die L-, N-, P/Q- und R-Typ-Kanäle, welche sich zusätzlich in ihren pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden. Zu den Kanälen, die sich bei niedrigen Membranspannungen öffnen, die T-Typ-Kanäle (Arikath und Campbell, 2003; Catterall, 2000).

Weiterhin kann man VGCCs in drei Familien unterteilen: Ca_v1, Ca_v2 und Ca_v3. T-Typ-Kanäle gehören zur Ca_v3-Familie, wohingegen die in den Haarzellen exprimierten L-Typ-Calciumkanäle Ca_v1.3 zur Ca_v1-Gruppe (Ca_v1.1 bis Ca_v1.4) gehören. Zur Gruppe der Ca_v2-Familie zählen die P/Q-Typ- (Ca_v2.1), N-Typ- (Ca_v2.2) und R-Typ-Kanäle (Ca_v2.3).

1.3.1 Aufbau spannungsgesteuerter Calciumkanäle

VGCCs sind aus einer porenbildenden α_1 -Untereinheit sowie einer akzessorischen β - und einer $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten aufgebaut (Arikkath und Campbell, 2003; Catterall, 1995; Catterall et al., 2005). Für α_1 sind bisher 10 Zelltyp-spezifische Gene, *Cacna1a-i+s*, (Ertel et al., 2000) und für die β -Untereinheit ($\beta 1-\beta 4$) vier Gene (*Cacnb1-Cacnb4*) in Säugetieren bekannt. Beide sind durch Spleißvarianten zusätzlich weiter differenziert (Buraei und Yang, 2010). Die Expression von $\alpha_2\delta$ wird in Säugetieren ebenfalls durch vier Gene bewerkstelligt, die für $\alpha_2\delta 1$, $\alpha_2\delta 2$, $\alpha_2\delta 3$ und $\alpha_2\delta 4$ kodieren (Gao et al., 2000; Klugbauer et al., 1999; Qin et al., 2002). Manche Kanäle besitzen zusätzlich noch eine, den Calciumstrom wenig beeinflussende, γ -Untereinheit (Dolphin, 2012; Kang und Campbell, 2003).

1.3.2 Calciumkanäle in inneren Haarsinneszellen

VGCCs haben, wie schon erwähnt, eine essentielle Funktion in neuronalen Prozessen. Sensorische cochleäre Haarsinneszellen werden durch die Nervenfortsätze der Spiralganglien-Neurone (SGN) afferent innerviert. Die peripheren Dendriten der SGN bilden hierbei die spezialisierte Ribbon-Synapse am basalen Pol der IHZ, die einkommende Hörsignale schnell und präzise weiterleiten. Der von *Cacna1d* kodierte L-Typ Calciumkanal Ca_v1.3 bildet den wichtigsten Calciumkanal an dieser Synapse und ist für 90 % des gesamten Calciumstroms verantwortlich (Platzer et al., 2000). Durch die Abwesenheit der Calciumkanalpore α_1 in *Cacna1d*^{-/-}-Mäusen (im folgenden mit Ca_v1.3^{-/-} bezeichnet) ist der Ca²⁺-Einstrom in IHZ stark verringert, wodurch kein Glutamat an der IHZ Synapse ausgeschüttet wird. Somit kann der Schallreiz nicht an die afferenten Neuronen weitergegeben werden, sodass diese Tiere taub sind. Frühe postnatale IHZ weisen einen um 90 % reduzierten Ca²⁺-Strom auf und können ab einem Alter von 35 Tagen überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden (Platzer et al., 2000). Somit wurden die Analysen in dieser Arbeit an bis zu drei Wochen alten Ca_v1.3-defizienten Mäusen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Degeneration der IHZ vorliegt.

Es wurde außerdem festgestellt, dass die Haarzellentwicklung bis kurz nach der Geburt ohne Veränderung abläuft und erst bei etwa P7 die afferenten Fasern sowie die apikalen ÄHZ degenerieren (Glueckert et al., 2003). Die durch Ca_v1.3-Deletion ausgelöste fehlende Synapsenfunktion der IHZ sowie der fehlende Einfluss des deletierten Ca_v1.3-Kanals auf die Generierung des Sinusrhythmus hat bei Mäusen und Menschen Taubheit und Arrhythmien

zur Folge (Baig et al., 2011; Dou et al., 2004; Platzer et al., 2000). Am Aufbau der Calciumkanäle ausgereifter Präsynapsen in IHZ sind zusätzlich die Untereinheiten β_2 und $\alpha_2\delta_2$ beteiligt (Dou et al., 2004; Fell et al., 2016; Neef et al., 2009; Platzer et al., 2000).

1.3.3 Auswirkung der Deletion des $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanals auf BK-Kanäle in IHZ

In Haarzellen wird, wie bereits erwähnt, die Calciumkanalpore von der α_1 -Untereinheit $\text{Ca}_v1.3$ gebildet und ist nicht nur für die afferente synaptische Übertragung verantwortlich, sondern auch für die Entwicklung und Erhaltung der Hörbahn sowie der Haarzellen (Brandt et al., 2003). Die Deletion der Calciumkanalpore α_1 in IHZ von $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen inhibiert nicht nur den Ca^{2+} -Einstrom und die Glutamat-Freisetzung an der Synapse, sondern beeinträchtigt auch Kaliumkanäle. Brandt et al. (2003) konnten in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen bis 35 Tage nach der Geburt keinen $I_{K,f}$ feststellen. Dieses Fehlen könnte auch durch den reduzierten spannungsabhängigen Calcium-Einstrom erklärt werden, „welcher zusammen mit der Depolarisation normalerweise BK-Kanäle koaktiviert“ (Brandt et al., 2003). Die Arbeitsgruppe konnte dies jedoch widerlegen, indem sie zum einen die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch die Konzentration von Ca^{2+} in der Patchpipette erhöhte und auch damit keinen BK-vermittelten-Strom hervorrufen konnte. Zum anderen konnte auch bei sehr positiven Potentialen (+24 mV), bei denen in isolierten *Patches* BK-Ströme auch bei geringen intrazellulären Calcium-Konzentrationen gemessen werden konnten (Oliver et al., 2003), kein Kaliumstrom im Sub-Milli-Sekunden-Bereich aktiviert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäuse keine funktionalen BK-Kanäle exprimieren. Sowohl postnatales Calcium-Spiking als auch die Expression von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in der Plasmamembran sind unerlässlich für den Erwerb von funktionalen BK-Kanälen.

2006 belegten auch Nemzou et al. die Annahme, dass die Abwesenheit von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von BK-Kanälen hat. Durch Real-Time RT-PCR wurde hierbei bestätigt, dass weniger mRNA-Transkript von *Kcnma1* in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen vorliegt. Es wird spekuliert, dass beispielsweise die gebildete Menge an *Kcnma1*-mRNA für die Synthese der BK α -Untereinheit nicht ausreicht. Auch die Inhibition der Translation, eine erhöhte und schnellere Degradierung der *Kcnma1*-mRNA sowie ein fehlerhaftes Aussortieren der *Kcnma1*-mRNA wurden als mögliche Ursachen diskutiert (Nemzou N. et al., 2006). Das Fehlen von BK-Strömen muss jedoch nicht nur auf eine fehlerhafte Genexpression von *Kcnma1* zurückzuführen sein. Die $\text{Ca}_v1.3$ -Deletion könnte beispielsweise auch einen ineffizienten Transport von BK-Kanälen zur oder deren fehlerhafte Verankerung in der Haarzell-Plasmamembran auslösen. Die Analysen in dieser Arbeit wurden an bis zu drei Wochen alten $\text{Ca}_v1.3$ -defizienten Mäusen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Degeneration der IHZ vorliegt.

1.4 Tight Junctions im Corti-Organ

Für einen lebenden Organismus ist es wichtig, bestimmte Bereiche strikt voneinander zu trennen und Kompartimente mit unterschiedlichen Aufgabenfeldern und Ionenzusammensetzungen aufzubauen und zu erhalten. Dennoch ist ein Austausch über diese Barrieren hinweg für das Fortbestehen und die Funktionalität der Zellverbände und Zellen allgemein essentiell. Dies wird durch verschiedene Zell-Zell-Verbindungen wie *Gap Junctions*, *Desmosomen*, *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* sichergestellt. Sie fungieren als intramembranäre Diffusionsbarrieren, die den Interzellularraum abdichten und sind für den parazellulären Transport von Wasser, löslichen Molekülen und Ionen zwischen Epithelzellen verantwortlich (Matter und Balda, 2003; Schneeberger und Lynch, 1992; Tsukita et al., 2001).

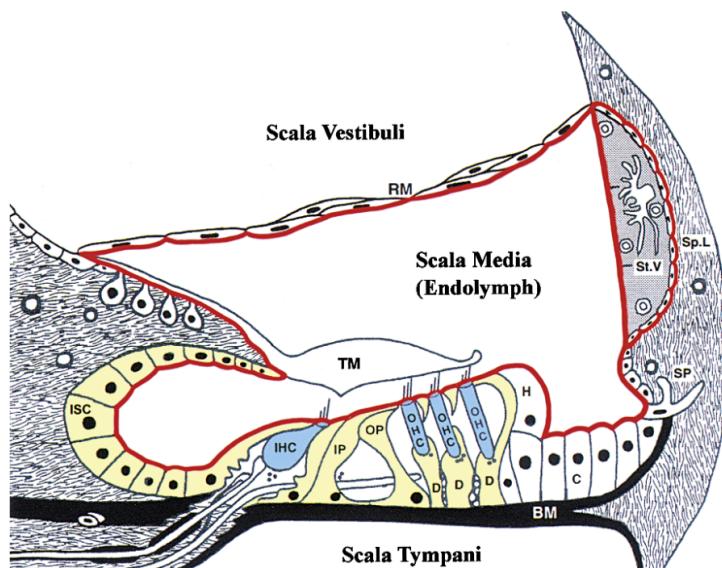


Abbildung 9: Scalae- und Tight Junction-Grenzen im Corti-Organ von Säugetieren

Die rote Linie spiegelt die durch *Tight Junctions* aufgebaute Grenze der *Scala media* wider. Die Cldn-14-mRNA- und CLDN-14-Protein-positiven Zellen sind in blau dargestellt (ab P4). Gelbe Zellen sind ab P8 *Cldn-14*-positiv. Die Stereozilien der sensorischen Haarsinneszellen (innere [IHC] und äußere [OHC] Haarzellen) ragen in die Endolymphe der *Scala media*, die Zellkörper in die perilymphatische Flüssigkeit der *Scala tympani*. B: Basilarmembran, C: Claudius Zellen, D: Deiters Zellen, H: Hensen Zellen, IP: innere Pillarzelle, ISC: Zellen des inneren Sulcus, OP: äußere Pillarzelle, RM: Reissner-Membran, SP: Spiralfortsatz (*Spiral prominence*), Sp. L: *Spiral ligament*, St. V: *Stria vascularis*, TM: Tektorialmembran (Wilcox et al., 2001).

In dieser Arbeit sind vor allem die *Tight Junctions* von besonderem Interesse. Über ihre Gate-Funktion wird die Aufrechterhaltung und Regulation der epithelialen Barrierefunktion (Cereijido et al., 1998) und über ihre Fence-Funktion die Separierung der apikalen und basolateralen Membranbereiche erreicht (Anderson, 2001; Schneeberger und Lynch, 1992). *Tight Junction*-Stränge sind größtenteils aus Claudinen aufgebaut, deren Expression in nahezu allen Epithelen gegeben ist (Chiba et al., 2008; Ruffer, 2004). Diese unterliegt

gewebe- und zelltypspezifischen Expressionsmustern (Furuse und Tsukita, 2006; Turksen und Troy, 2004; Van Itallie und Anderson, 2006).

In der Cochlea liegen die basolateralen Bereiche der sensorischen Haarzellen in der kaliumarmen und natriumreichen Perilymphe, wohingegen die apikale Membran der kaliumreichen und natriumarmen endolymphatischen Flüssigkeit ausgesetzt ist. Durch den Kaliumgradienten zwischen den beiden Flüssigkeiten wird das endocochleäre Potential von +85 mV aufgebaut (Fettiplace, 2017; Wangemann, 2006), das für eine korrekte Lautstärke-induzierte Veränderung des Rezeptorpotentials der Haarsinneszellen unabdingbar ist (Evans und Dallos, 1993; Hudspeth, 1989). *Tight Junctions* dichten hierbei die Flüssigkeitsgrenzen ab und sind somit maßgeblich an der Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials beteiligt (Abb. 9). In Mäusen konnte 4 Tage nach der Geburt die mRNA von Claudin-14 detektiert werden die bis P8 mengenmäßig noch stark ansteigt (Wilcox et al., 2001). Damit verlaufen die Claudin-14-Expression und die Entwicklung des endocochleären Potentials in der ersten postnatalen Woche parallel ab. Dies liefert einen starken Hinweis auf die essentielle Bedeutung der Claudin-14-Expression für den Aufbau des endocochleären Potentials in der Cochlea (Anniko und Bagger-Sjöbäck, 1982; Ryan und Woolf, 1983; Souter und Forge, 1998). In weiteren Studien wurde im Corti-Organ, in den Marginal- und Basalzellen der *Stria vascularis*, in der Reissner-Membran und im *Limbus spiralis* das Protein von CLDN-14 gefunden (Kitajiri et al., 2004).

Rezessive Mutationen des menschlichen Claudin-14 führen zu einer erblich bedingten Taubheit, der eine veränderte Ionenpermeabilität durch die *Reticular Lamina* zugrunde liegt (Wilcox et al., 2001; Ben-Yosef, 2003). Dies führt in Mäusen bis zur dritten postnatalen Woche zu einem Verlust von nahezu allen ÄHZ sowie auch von einem Teil der IHZ und somit zu einem Hörverlust von 50-60 dB SPL (Ben-Yosef, 2003). Das *Tight Junction* Protein CLDN-14 ist somit für die Entwicklung der Cochlea und deren korrekte Reizweiterleitung essentiell und kann als *Tight Junction* Marker in der Cochlea verwendet werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die calcium- und spannungsabhängigen BK-Kanäle werden von vier porenbildenden α - sowie ein bis vier akzessorischen β -Untereinheit aufgebaut. In IHZ von Vögeln, Reptilien und Amphibien werden sie durch extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom über benachbarte präsynaptische spannungsgesteuerte $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle aktiviert (Art und Fettiplace, 1987b; Pyott und Duncan, 2016). Bei Säugetieren ist dagegen bereits bekannt, dass die BK-Untereinheit, die erst ab Hörbeginn (P12) exprimiert wird, hauptsächlich am Hals der IHZ und damit nicht in unmittelbarer Nähe zu den präsynaptischen $\text{Ca}_v1.3$ -Kanal-Clustern lokalisiert ist (Hafidi et al., 2005; Pyott, 2004). Damit stimmt überein, dass die große Mehrheit der BK-Kanäle nicht durch eine Erhöhung der zytosolischen $\text{Ca}_v1.3$ -vermittelten Ca^{2+} -Konzentration

aktiviert wird (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Eine weitere Besonderheit der BK-Kanäle in IHZ von Säugern ist, dass ihre BK-Kanäle schon bei ungefähr -75 mV aktivieren (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005), wohingegen sie bei heterologer Expression in Oozyten des Krallenfroschs (*Xenopus*) oder in HEK-Zellen und in Abwesenheit von Ca^{2+} -Einstrom erst bei +100 mV öffnen (Thurm et al., 2005). Modulatorische γ -Untereinheiten von BK-Kanälen wie LRRC26 ($\gamma 1$) und LRRC52 ($\gamma 2$) können in HEK-Zellen die halbmaximale Aktivierungsspannung der BK-Ströme um entsprechend -140 mV oder -100 mV verschieben (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Li et al., 2016b; Yan und Aldrich, 2012). In reifen IHZ von Säugetieren könnten daher LRRC-Proteine als neue γ -Untereinheiten die BK-Kanäle in rein spannungsabhängige Kanäle umwandeln, sodass diese auch unter physiologischen Spannungen funktionsfähig wären.

Die vorliegende Arbeit sollte folgende Fragen beantworten:

1. Wie ist die exakte Lokalisation der BK-Kanäle in reifen murinen IHZ und können intrazelluläre Ca^{2+} -Quellen als Auslöser für die Aktivierung von BK-Kanälen überhaupt in Frage kommen?
2. Wird mRNA für die γ -Untereinheiten LRRC26 und LRRC52 in IHZ exprimiert?
3. Werden die Proteine für LRRC26 und LRRC52 in IHZ synthetisiert? Wenn ja, wo sind sie subzellulär lokalisiert? Gibt es eine Kolokalisation von LRRC-Proteinen mit den BK-Kanälen und wie erfolgt ihre entwicklungsabhängige Expression? Ist ihre Proteinbiosynthese an die Expression der BK-Kanäle gekoppelt?

Dazu wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, welche die subzelluläre Lokalisation der BK-Kanäle im Vergleich zu den *Tight Junctions*, den $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen und dem Endoplasmatischen Retikulum in reifen IHZ von Mäusen aufklären sollte. Ferner sollten Transkriptanalysen mit *nested* PCR an unreifen und reifen Corti-Organen bzw. IHZ von WT-, TyfC-, $\text{BK}\alpha^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen sowie Immunfluoreszenzanalysen an WT-Mäusen unterschiedlicher Altersstufen Aufschluss über das Vorliegen von LRRC-mRNA sowie über die Proteinbiosynthese von LRRC-Proteinen geben. Ergänzend dazu wurden in dieser Arbeit zwei KO-Mausmodelle, $\text{BK}\alpha^{-/-}$ - und $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäuse, denen die $\text{BK}\alpha$ -Untereinheit fehlt, auf die Anwesenheit von LRRC-Proteinen untersucht. Die sensitive Methode des *in situ Proximity Ligation Assay*, welche zwei Proteine mit einer Entfernung von 40 nm zueinander nachweist, sollte für Untersuchungen am Corti-Organ etabliert werden und die Analysen zur Lokalisation von LRRC-Proteinen im Vergleich zu den BK-Kanälen in Mäusen mit (WT) und ohne $\text{BK}\alpha$ ($\text{Ca}_v1.3^{-/-}$) vervollständigen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklav Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss
CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Eismaschine Flake-Line	Wessamat, Kaiserslautern
EBox-VX2-Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat D. GmbH, Eberhardzell
Halogenlampe KL1500 electronic	Leica, Wetzlar
Homogenisator Minilys	bertin, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Inverses Auflichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena
Labor-Schlauchpumpe PLP330	behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena
Magnetrührer M5	Ingenieurbüro CAT, Ballrechten-Dottingen
Osmomat® 030 Cryoscopic Osmometer	Gonotec GmbH, Berlin
pH-Meter HI221	HANNA Instr. Deutschland GmbH, Kehl a. R.
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reinstwassersystem Milli-Q® Ref.	Merck KGaA, Darmstadt
Schüttler KS260 basic	IKA, Staufen im Breisgau
Spektrophoto-/Fluorometer DS-11FX+	DeNovix, Wilmington, DE, USA
Stereomikroskop SZX16	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Sterilbank BDK	Luft-/Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl
Sterilbank peqmedis Class II BSC	ESCO, Horsham, PA, USA
Thermozykler T100	Bio-Rad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge Mini Star	neolab, Heidelberg
Trockenschrank Dry-Line	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Wasserbad	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Zentrifuge 5424/R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

2.2 Chemikalien und Medien

Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Agarose High Resolution Roti®garose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
CaCl ₂	Calbiochem, Läufelfingen
Cell-Tak™	Corning Life Sciences B.V., Amsterdam, NL
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
DNA-Ladepuffer	Omega BIO-TEK, Norcross, USA
DNA-Marker 100 bp Plus Blue	GeneOn, Ludwigshafen am Rhein

DNA-Marker <i>peqGOLD Ultra Low Range II</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
dNTP Mix	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Eisessig	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Eselserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fluoromount-G	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Formaldehyd	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt
Immersionsöl	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Immunopen™	Calbiochem, Läufelfingen
Isofluoran	AbbVie, North Chicago, Illinois, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
KCl	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Laktobionat	Fisher Scientific GmbH, Nidderau/ Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA
MgCl ₂	Calbiochem, Läufelfingen
Midori Green Advance DNA Farbstoff	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Fluka, Bukarest, Rumänien
PBS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Proteinase K-Lösung	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Silikonfett	Fluka, Bukarest, Rumänien
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Vectashield® +/- DAPI	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Echingen
Wasser (DNase-/RNase-frei)	Promega GmbH, Mannheim/ Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

2.3 Puffer und Lösungen

B-01	153,00 mM	NaCl
	5,80 mM	KCl
	1,30 mM	CaCl ₂
	0,90 mM	MgCl ₂
	5,60 mM	Glucose
	10,00 mM	HEPES
	0,70 mM	NaH ₂ PO ₄
 B-33	 70,00 mM	 Laktobionat
	83,00 mM	NaCl
	5,80 mM	KCl
	1,30 mM	CaCl ₂
	0,95 mM	MgCl ₂
	5,30 mM	Glucose
	10,00 mM	HEPES
	0,70 mM	NaH ₂ PO ₄
 B-41	 35,00 mM	 NaCl
	4,80 mM	KCl
	1,30 mM	CaCl ₂
	0,95 mM	MgCl ₂
	5,30 mM	Glucose
	10,00 mM	HEPES
	0,70 mM	NaH ₂ PO ₄
	120,00 mM	Na-Glukonat
 NDS-Puffer	 10,00 ml	 Esel-Serum
	1,80 ml	10 % Triton™ X-100
	5,00 ml	240 mM PB
	6,75 ml	4 M NaCl
	36,45 ml	H ₂ O _{dest.}
 PBS, pH 7,4 (1 x)	 3,0 mM	 KCl
	1,3 mM	KH ₂ PO ₄
	137,0 mM	NaCl
	8,0 mM	Na ₂ HPO ₄

Phosphat-Puffer (240 mM)	27,52 g	Na ₂ HPO ₄
	5,52 g	NaH ₂ PO ₄
mit H ₂ O _{dest.} auf 1 l aufgefüllt		
TAE-Puffer (50 x)	2 M	TRIS-Base
	50 mM	EDTA
	5,7 % (v/v)	Eisessig
Zamboni-Fixierlösung	50,0 ml	8 % PFA
	50,0 ml	2 % PFA
	2,5 ml	10 x PBS
	25,0 ml	H ₂ O _{dest.}
	1,7 g	NaCl
	500 µl	1 M NaOH
	22,5 ml	gesättigte Pikrinsäure

Alle Bad-Lösungen (B-xy) hatten eine Osmolarität von 320 mOsmol/kg. Der pH-Wert von B-33 wurde durch Zugabe von 1 M NaOH und bei B-01 und B-41 von 1M NaOH auf 7,35 eingestellt. Um vermeintliche Kontaminationen der Bad-Lösungen mit Mikroorganismen zu eliminieren, wurden diese nach Einstellung des pH-Wertes und der Osmolarität unter der Sterilbank für 30 min mit UV-Licht exponiert und anschließend steril filtriert. Die Lagerung der B-Lösungen erfolgte in 250 ml Aliquots bei 4 °C. Nach 7 Tagen wurden bereits geöffnete B-Lösungen fachgerecht entsorgt. Der TAE-Puffer wurde bei Raumtemperatur (RT) und die restlichen Puffer bei 4 °C gelagert.

2.4 Kits

<i>Duolink® In Situ Orange Starter Kit</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
<i>NucleoSpin® Tissue Kit</i>	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
<i>peqGOLD DNase 1 Digest Kit</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>peqGOLD Gel Extraction Kit</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.5 Enzyme

<i>GoTaq G2 Green/Colourless Master Mix</i>	Promega Corporation, Madison, WI, USA
<i>RNaseOUT</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>SuperScript III Reverse Transcriptase</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.6 Mauslinien

Die Haltung der Tiere und Versuche mit Tieren erfolgte gemäß Tierschutzgesetz (TierSchG § 4) in Verbindung mit dem Saarländischen Gesetz über das öffentliche Veterinärwesen und die amtliche Lebensmittelüberwachung (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz). Während ihrer Haltung in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus hatten die Tiere ständigen Zugang zu Wasser und Futter (ssniff® Futtermittel für Mäuse und Ratten). Zusätzlich zu NMRI- und C57BL/6-N-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) wurden die folgenden Mauslinien verwendet:

- BK α -defiziente Mäuse (Sausbier et al., 2004)
Mäuse mit SV129-C57BL/6-Hintergrund mit einer Deletion in der porenbildenden Untereinheit des BK-Kanals. Versuchstiere wurden von Prof. Dr. Peter Ruth aus Tübingen (in Absprache mit der Tierhaltung in Homburg) für Versuche bereitgestellt.
Beschreibung der Mauslinie in Kapitel 1.2.5
- Cacna1d-defiziente Mäuse (Platzer et al., 2000)
Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund mit einer Deletion der porenbildenden Untereinheit des Ca_v1.3 Kanals.
Beschreibung der Mauslinie in Kapitel 1.3.3
- TyfC-Mäuse (Winter et al., 2007)
Knockin-Mäuse mit neuronenspezifischer Expression des *enhanced yellow fluorescent protein* (eYFP). Der verwendete neuronenspezifische Thy-1.2-Promotor und das darunter exprimierte Protein YFP sind für den Namen dieser Mauslinie verantwortlich. Die Mauslinie wurde von Prof. Dr. Frank Kirchhoff aus Homburg für Versuche bereitgestellt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Genotypisierung von BK α -defizienten und TyfC-Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten BK α Wildtyp (WT)- und *Knockout* (KO)-Mäuse sowie die TyfC-Mäuse wurden in den jeweiligen Arbeitsgruppen nach deren ausgearbeiteten Genotypisierungsprotokollen analysiert und die Mäuse mit den gewünschten Genotypen anschließend bereitgestellt.

2.7.2 Genotypisierung von *Cacna1d*-defizienten Mäusen

Die Isolierung der DNA erfolgte aus Ohr- oder Schwanzbiopsien mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *NucleoSpin® Tissue* Kits nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden hierfür in 50 µl BE-Puffer aufgenommen und weiter prozessiert. Ein Reaktionsansatz enthielt hierbei 2 µl DNA, 0,5 µl *sense* Primer (5'-GCA GAA GGC ACA TTG CCA TAC TCA C-3'), 0,5 µl *antisense* Primer (5'-TAG AAA AGA TGC ACT GGT CAC CAG G-3'), 0,5 µl *mutant* Primer (5'-GGG CCA GCT CAT TCC CAC TCA T-3'), 6,5 µl ddH₂O und 10 µl *GoTaq® Green Master Mix*. Die Amplifikation der DNA wurde in einem Thermozykler nach dem in Tabelle 1 beschriebenen PCR-Programm durchgeführt.

Tabelle 1: PCR-Programm zur Genotypisierung von *Cacna1d*^{−/−}-Mäusen

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
95	3 min	-
95	30 sec	34
61	40 sec	34
72	45 sec	34
72	5 min	-
8	∞	-

Nach der Amplifikation der DNA wurden 10 µl des PCR-Produktes auf ein 1,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde mit einer angelegten Spannung von 120 Volt in einer mit 1 x TAE-Puffer befüllten Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines EBox-VX2-Geldokumentationssystems.

In der folgenden Tabelle (Tab. 2) sind die erwarteten Bandengrößen für die möglichen Genotypen aufgeführt.

Tabelle 2: Erwartete Bandengrößen der *Cacna1d*-Genotypisierung

Genotypen	Bandengröße [bp]
Homozygot (tg/tg)	450
Heterozygot (tg/wt)	450 und 311
Wildtyp (wt)	311

Die folgende Abbildung (Abb. 10) zeigt exemplarisch ein Beispiel einer *Cacna1d*-Genotypisierung.

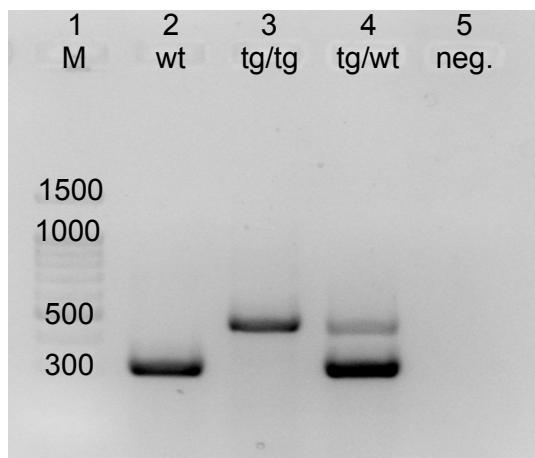


Abbildung 10: Beispiel einer *Cacna1d*-Genotypisierung

Spur 1 kennzeichnet den 100 bp DNA-Marker PlusBlue (4 µl). In den Spuren zwei bis vier sind die amplifizierten PCR-Produkte der verschiedenen Genotypen der *Cacna1d*-Mauslinie dargestellt. Die amplifizierten genomischen DNA-Sequenzen zeigen bei Wildtyp-Mäusen (wt, Spur 2) eine Bandengröße von 310 bp und bei Knockout-Mäusen (tg/tg, Spur 3) von 450 bp. Heterozygote Mäuse (tg/wt, Spur 4) weisen beide Banden auf. Spur 5 zeigt die Negativkontrolle (Mastermix ohne DNA-Zugabe).

2.7.3 Präparation der Cochlea

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mauslinien zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht. Für immunhistochemische Färbungen, Transkriptanalysen und Kolokalisationsstudien der apikalen Windungen des Corti-Organs wurden NMRI- und TyfC-Mäuse sowie Mäuse der BKα- und Ca_v1.3-KO-Linie nach Angaben des Tierschutzgesetzes (TierSchG § 4) gehandhabt und getötet. Bei älteren, hörenden Mäusen zwischen dem postnatalen Tag (P) 17 und 28 erfolgte nach der Narkotisierung mit Isofluran® die zervikale Dislokation und anschließende Dekapitation. Neonatale Mäuse zwischen P5 und P7 sowie an P10 und P12 wurden ohne vorherige Isofluran-Exposition dekapitiert. Der Schädel wurde von dem umliegenden Gewebe separiert und halbiert. Bei älteren, hörenden Mäusen (hier >P18) wurde die Cochlea anschließend mit 2 Pinzetten aus den Schädelhälften herausgebrochen. Die Schädelhälften der neonatalen Mäuse bzw. die herausgebrochenen Cochlea der älteren, hörenden Mäuse wurden in eine gekühlte physiologische Lösung (B-01 für immunhistochemische Analysen, B-33 oder B-49 für molekularbiologische Methoden) überführt und auf Eis gelagert. Die folgenden Präparationsschritte wurden unter einem Stereomikroskop SZX-16 und mit speziellem Präparationsbesteck (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Mit zwei größeren Pinzetten wurde die Cochlea der neonatalen Mäuse von dem umliegenden Gewebe separiert und die knorpelartige Schale des Innenohrs genauso wie die knöcherne Schale des Innenohrs von älteren, hörenden Mäusen ausgehend vom apikalen Ende mit

einer gebogenen Pinzette entfernt. Nach dem kompletten Freilegen und der Entnahme der apikalen Windung des Corti-Organs wurde dieses, nach dem vorsichtigen Entfernen der über den Haarsinneszellen liegenden Tectorialmembran und der lateralen Wand mit zwei feineren Pinzetten, mit Cell-TakTM (1 mg/ml) auf einen Objektträger (Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus, VWR International GmbH, Radnor, PA, USA) mit PBS aufgeklebt.

2.7.4 Gewinnung von Corti-Organen, Haarsinneszellen, Speicheldrüsen- und Hodengewebe zur Transkriptanalyse

Für die Transkriptanalyse wurden Corti-Organe von NMRI-Mäusen und Mäusen der BKα-KO-Linie im Alter von ca. drei Wochen und Corti-Organe von NMRI- und TyfC-Mäusen im Alter von 5 Tagen verwendet. Zusätzlich wurden innere Haarsinneszellen von NMRI-Mäusen an P5 und P6, sowie zwischen P18 und P23 und als Referenz Speicheldrüsen- und Hodengewebe von ca. drei Wochen alten NMRI-Mäusen genutzt. Für die Gewinnung von Corti-Organen, Haarsinneszellen und Referenzgeweben wurden die Pinzetten vor ihrer Verwendung mit 70 %-igem vergällten Ethanol gereinigt, einzeln in Alufolie verpackt und im Trockenschrank für 4 Stunden bei 200 °C sterilisiert.

2.7.4.1 Gewinnung von Corti-Organen

Zur Isolierung von Corti-Organen wurde die Cochlea wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben präpariert und die noch intakte Cochlea anschließend in eine physiologische Glukonat-(B-33) oder Laktobionat- (B-41) haltige Lösung überführt. Durch die Laktobionat-vermittelte Blockierung von Cl⁻-Kanälen (Brandt et al., 2007; Knirsch et al., 2007) wird vermutlich ein vorzeitiges Schwellen der Haarzellen verhindert. So behielten beispielsweise reife ÄHZ in einer Tris-Laktobionat-Lösung über einen längeren Zeitraum sowohl ihre natürliche Morphologie wie auch ihre normale Zellkerngröße bei (Knirsch et al., 2007). Für die Substitution von Chlorid mit Glukonat wurde ein Absinken des Chlorid-Einstroms nachgewiesen (Stumpff et al., 2011) was ein frühzeitiges Anschwellen der Haarzellen voraussichtlich ebenfalls erschwert. Beide Salze werden somit konventionell zum Geweberhalt eingesetzt. Das komplette Corti-Organ wurde anschließend herauspräpariert und in ein spezielles steriles Reaktionsgefäß, in welches zuvor 200 µl RNA-Lyse-Puffer vorgelegt wurden, überführt. Die Reaktionsgefäße waren hierbei mit kleinen Keramikkügelchen gefüllt um anschließend die Proben effizient und schonend zu homogenisieren. Um die Ausbeute an Transkripten zu erhöhen, wurden jeweils zwei bzw. vier Corti-Organe von NMRI- und TyfC-Mäusen sowie von Mäusen der BKα-KO-Linie zusammengeführt. Bis zur RNA-Isolierung und der anschließenden Umschreibung der mRNA in cDNA am gleichen Tag wurden die Proben auf Eis aufbewahrt.

2.7.4.2 Gewinnung von inneren Haarsinneszellen

Zur Isolierung von IHZ wurde die apikale Windung des Corti-Organs, wie unter Kapitel 7.4.1 beschrieben, präpariert und anschließend mit Cell-Tak® auf ein Deckglas aufgeklebt, das in einer Badkammer aus Kunststoff positioniert war. Die zum Absaugen verwendeten Borosilikatpipetten aus Glas (10 µm Durchmesser) wurden 4 Stunden bei 200 °C ausgebacken und vor dem Absaugen der HZ mit etwa 0,5 µl *RNaseOUT/DTT-Mix* (1:2) versetzt. Um den Gewebeerhalt zu erhöhen, wurde das Corti-Organ während des Absaugens ständig bei hoher Geschwindigkeit mit der Glukonat-haltigen Lösung überspült. Unter dem Mikroskop (Axioskop, 40 x Achroplan Objektiv) wurden 40-120 IHZ abgesaugt und durch das Anlegen eines schwachen Überdrucks und das teilweise Abbrechen der Pipettenspitze in ein steriles Kryogefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Negativkontrolle wurde ein Aliquot der verwendeten Badlösung (B-41) mitgeführt. Die isolierten Haarsinneszellen und die Badlösung wurden bis zu ihrer Umschreibung innerhalb von einer Woche bei -70 °C aufbewahrt.

2.7.4.3 Gewinnung von Speicheldrüsen- und Hodengewebe

Die Maus wurde mit Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Mit Hilfe von Kanülen (21 G x 1½") wurden die Gliedmaßen der Maus in Rückenlage auf einem Styroporuntergrund fixiert. Nach der Befeuchtung des Fells mit Wasser wurde die Bauchwand, der Brustkorb und der Hals bis zur Schnauze der Maus vorsichtig mit einer Pinzette und einer spitzen Schere geöffnet und die Haut zur Seite wegpräpariert. Anschließend erfolgt die vorsichtige Öffnung der Bauchhöhle. Die Speicheldrüsen (*Submandibular + Sublingual Salivary Gland*) wurden vorsichtig vom umliegenden Gewebe entfernt und in ein steriles Reaktionsgefäß, in welches zuvor 200 µl RNA-Lyse-Puffer vorgelegt wurde, überführt. Die Hoden wurden zur Freilegung mit einer Pinzette durch den Schenkelspalt in die Bauchhöhle gezogen, anschließend vom Nebenhoden abgetrennt und ebenfalls in ein steriles Reaktionsgefäß mit RNA-Lyse-Puffer übertragen. Es wurden die gleichen Reaktionsgefäße verwendet wie in Kapitel 7.4.1 beschrieben. Die Proben wurden bis zur Isolierung der RNA und Umschreibung in cDNA am gleichen Tag auf Eis aufbewahrt.

2.7.5 Homogenisierung, Zellyse und RNA-Isolierung von Corti-Organen, Haarsinneszellen, Speicheldrüsen- und Hoden-Gewebe

2.7.5.1 Homogenisierung, Zellyse und RNA-Isolierung von Haarsinneszellen

Zum Aufbrechen der Zellmembran wurden die abgesaugten Haarsinneszellen, sowie die Badlösung als Negativkontrolle, dreimal bei 37 °C aufgetaut und in flüssigem Stickstoff wieder eingefroren. Dieses Vorgehen war ausreichend um die RNA frei zu legen und für weiterführende Analysen zugängig zu machen.

2.7.5.2 Homogenisierung, Zellyse und RNA-Isolierung von Corti-Organen, Speicheldrüsen- und Hodengewebe

Der Zellaufschluss der isolierten Speicheldrüsen- und Hoden-Gewebe sowie der gepoolten Corti-Organe wurde mit einer Spritze oder einer feinen Kanüle (25 G x 1½") durch kontinuierliches Passieren oder mit einem Arbeitsplatz-Homogenisator (Minilys) durchgeführt. Durch die Keramikkügelchen in den speziellen Reaktionsgefäß (Precellys® Keramik Kit 1,4 mm, CK14S) wurde mit Hilfe der *3D-Bead-Beating-Technologie* (3D-Bewegung des Rotors) des Minilys effizient und schonend eine homogene Mischlösung der einzelnen Proben hergestellt. Bei Verwendung des Minilys wurde für die Corti-Organe eine Umdrehungszahl von 4000 rpm für 10 Sekunden, für die Speicheldrüsen- und Hodengewebe von 5000 rpm für 15 Sekunden gewählt.

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde anschließend mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (*peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit*) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um ein Verstopfen der Säulen des Kits zu verhindern, wurde das Lysat der gepoolten Corti-Organe sowie der Speicheldrüsen- und Hoden-Gewebe über einen Filter (0,45 µm) auf *DNA-Removing-Säulen* übertragen. Nachdem die genomische DNA (gDNA) selektiv durch Zentrifugation des Lysats entfernt worden war wurden die Proben nach Zugabe von 70 %-igem Ethanol auf eine *PerfectBind MS RNA-Säule* geladen. Die RNA-Moleküle binden in diesem Schritt an die Silikamembran der Säulen, wohingegen Zelltrümmer und andere Kontaminationen effektiv entfernt werden. Um kontaminierende DNA schnell und einfach während der RNA-Präparation zu entfernen, wurde ein DNA-Verdau mit Hilfe des *peqGOLD DNase 1 Digest Kit* laut Herstellerangaben direkt auf der Säule durchgeführt. Nach der Elution der Proben in 20 µl RNase-freiem Wasser wurde die RNA am Spektrophotometer photometrisch quantifiziert. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte direkt im Anschluss.

2.7.6 Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription, RT)

Um die Expression von spezifischen Genen in Zellen oder Geweben nachzuweisen muss die prozessierte RNA (mRNA), die nur proteinkodierende und translationssteuernde Bereiche eines Gens enthält, untersucht werden. Das Enzyms Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in der Lage ist, unter Zugabe von Nukleotiden und spezifischen Primern sowie geeigneten Temperatur-Bedingungen und Salzkonzentrationen RNA-Sequenzen in entsprechende komplementäre DNA-Sequenzen (cDNA: *complementary DNA*) umzuschreiben. Die hier erzeugten cDNAs dienten im Anschluss als Ausgangsprodukt für mehrere PCR mit der spezifische Sequenzen aus den cDNAs amplifiziert werden konnten.

Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte in zwei Schritten und wurde mit Hilfe des *SuperScript III Reverse Transcriptase Kits* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach folgendem Protokoll (Baig et al., 2011) durchgeführt. Nach dem Aufbrechen der Zellmembran der abgesaugten Haarsinneszellen wurde das Volumen pro Reaktion auf 9 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Für die Transkription von Speicheldrüsen- und Hoden-Gewebe sowie von Corti-Organen wurden 9 µl der zuvor isolierten RNA (s. Kap. 2.7.5.2) eingesetzt. Im ersten Schritt der Umschreibung wurde jedem Ansatz 2 µl Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; finale Konzentration 5 µM) und 1 µl dNTPs (final: 0,5 mM) zugegeben. Um mögliche vorliegende Sekundärstrukturen aufzubrechen, wurde dieser Ansatz für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Die Random Hexamer Primer dienen hierbei als Initiator für die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung. Im zweiten Schritt der Transkription wurden pro Ansatz 2 µl DTT (final: 10 mM), 1 µl RNaseOUT (40 Units), 1 µl SuperScript III Reverse Transcriptase (200 Units; *RT*) und 4 µl *RT*-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Nach einer 2,5-stündigen Umschreibung bei 50 °C wurde die Transcriptase für 30 min bei 70 °C inaktiviert. Um die Aktivität der *RT* zu überprüfen, wurde pro *Template* eine Reaktion ohne die Zugabe von *RT* als Negativkontrolle mitgeführt (zukünftig beschriftet mit *RT* Kontrolle Hoden/Speicheldrüse/Corti-Organ). Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.7 Photometrische DNA-/RNA-Quantifizierung

Um den Reinheitsgrad und die Quantität der RNA-/DNA-Präparation zu überprüfen wurde die RNA-/cDNA-Konzentration mit Hilfe des Spektrophotometer (Fa. DeNovix) bestimmt. Hierfür wurde entsprechend der Herstellerangaben das Messverfahren mit RNase-freiem Wasser auf 0 ng/µl eingestellt. Anschließend wurden die Konzentrationen der RNA und cDNA jeweils durch den Einsatz von 1 µl Eluat im Spektrophotometer bestimmt und protokolliert.

Mathematische und physikalische Grundlage bietet hierbei das Lambert-Beersche Gesetz, das besagt, dass die Strahlungsintensität mit der Weglänge beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz konzentrationsabhängig abgeschwächt wird.

Durch die Messung der Extinktionen bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäuren) und $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum Proteine) konnten die Konzentrationen berechnet werden, da davon auszugehen ist, dass eine RNA-/DNA-Lösung bei $\lambda = 260$ nm die Absorption von 1 aufweist. Auskunft über eine mögliche Verunreinigung der Proben mit Proteinen gibt das Verhältnis von A260 zu A280, welches bei DNA-Proben bei 1,8 bis 2 und bei RNA über 2 liegen sollte. Es wurden nur solche Proben für weitere Analysen verwendet, die diesen Kriterien entsprachen.

$$E_\lambda = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon_\lambda \times c \times d$$

- E.: Extinktion bei Wellenlänge λ
 I.: Intensität des transmittierten Lichtes
 I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes
 c: Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit [mol/l]
 ε_λ : natürlicher molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ ; spezifisch für die absorbierende Substanz [l/mol x cm]
 d: Weglänge des Lichtes im Material [cm]

2.7.8 Transkriptanalyse durch *nested* Polymerase-Kettenreaktion (*nested* PCR)

Der Nachweis bestimmter Genabschnitte in den abgesaugten IHZ, den gepoolten Corti-Organen und den Referenzgeweben wurde *in vitro* mit Hilfe der Standard-Methode der PCR durchgeführt. Als Ausgangsstoff dienen die aus Kapitel 2.7.6 umgeschriebenen mRNAs bzw cDNAs, die mit einer thermostabilen DNA-Polymerase in einem Protokoll mit alternierenden Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation exponentiellen amplifiziert werden. Die cDNAs stellen die doppelsträngigen Kopien bestimmter mRNAs zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle/dem Gewebe dar, die durch die, für Eukaryoten charakteristische, Modifikation und Prozessierung nach ihrer Transkription im Gegensatz zum Gen Intron-frei sind. Die cDNAs liefern zusätzlich auch Informationen über das alternative Spleißen ihrer mRNAs, also ob die dazugehörigen Gene in verschiedenen Isoformen exprimiert werden. Die Kombination von Reverser Transkription und PCR kann somit gezielt für den Nachweis der Expression verschiedener Gene verwendet werden.

Da die Menge an abgesaugten Haarzellen jeweils relativ gering war (40-120 IHZ), wurde für jedes Transkript eine verschachtelte (*nested*) PCR durchgeführt. Hierbei wird das PCR-Produkt aus der ersten vorangehenden PCR als *Template* für die zweite nachfolgende PCR verwendet. Die Primerpaare für die zweite PCR müssen somit in dem Sequenzbereich zwischen dem *sense/Forward* und *antisense/Reverse* Primer der ersten PCR liegen. Dadurch wird die Spezifität der nachzuweisenden Transkripte erhöht, sodass eine Detektion von niedrigkonzentrierten und damit schwer nachzuweisenden Transkripten möglich ist. Für jedes nachzuweisende Gen wurden folglich zwei Primerpaare synthetisiert, die spezifische, zur Sequenz des nachzuweisenden Transkripts komplementär synthetisierte, Oligonukleotide darstellen und bestimmte Bedingungen erfüllen mussten. Die Bedingungen sowie die Synthese der spezifischen Primer sind im folgenden Kapitel (2.7.8.1) aufgeführt.

2.7.8.1 Primerdesign

Die Primer zum Nachweis des *Kcnma1*-Transkripts das für die α-Untereinheit der BK-Kanäle kodiert, wurden in Anlehnung an (Nemzou N. et al., 2006) synthetisiert. Für den Nachweis des *Cacna1d*-Transkripts, das für Ca_v1.3-Kanäle kodiert und als positive PCR- und IHZ-Kontrolle mitgeführt wurde, wurden Primer laut (Michna et al., 2003) verwendet. Die Primer zum Nachweis der LRRC26- und LRRC52-Transkripte die für die gleichnamigen Proteine kodieren, wurden für diese Arbeit neu entworfen. Hierzu wurde mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* der NCBI-Homepage zu Beginn die Nukleotidsequenz des gewünschten Gens inklusive aller Exons und Introns ausfindig gemacht. Diese wurde in die Software „Primer3Plus“ übertragen, welche anhand der manuell eingestellten Parameter die optimalen Primer innerhalb der Sequenz ermittelt. Die Primerlänge sollte hierbei zwischen 19-27 bp liegen. Die Schmelztemperatur sollte bei beiden Primern (*sense/Foward* und *antisense/Reverse*) ähnlich sein, zwischen 55 °C und 65 °C liegen und einen GC-Gehalt von 40-60 % aufweisen. Um spezielle Sequenzbereiche der zu analysierenden Gene explizit nachzuweisen, wurden zusätzlich vereinzelt weitere Primer manuell mit Hilfe der Snap Gene Software (Chicago, IL, USA) ermittelt und mit der Software „Primer3Plus“ auf ihre Eigenschaften hin analysiert. Alle Primer wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) bezogen und lyophilisiert in einer Menge von ca. 30 nmol geliefert. Anschließend wurden die Primer rehydriert und bei -20 °C gelagert.

2.7.8.1.1 Synthese der Primer zum mRNA-Nachweis von LRRC26 und LRRC52 in der ersten PCR

Beide LRRC-Transkripte bestehen aus zwei kodierenden (Exons) und einer nicht-kodierenden Sequenz (Intron). Für die erste PCR zum Nachweis von LRRC26- (s. Abb. 11) und LRRC52-mRNA (s. Abb. 12) wurde jeweils ein Primerpaar (Benennung jeweils mit s für *sense* und as für *antisense*) synthetisiert, wovon der *sense* Primer im ersten Exon und der *antisense* im zweiten Exon hybridisiert und welche die äußereren Primer darstellen.

2.7.8.1.2 Synthese der Primer zum mRNA-Nachweis von LRRC26 in der zweiten PCR

Zum Nachweis von LRRC26-mRNA in der zweiten PCR wurde ein Primerpaar in Anlehnung an Evanson et. al (2014) und fünf neue Primerpaare synthetisiert. Die beiden von Evanson generierten Primer (n_s_Evan. + n_as_Evan.; Abb. 11) binden jedoch beide im ersten Exon sodass bei dem PCR-Produkt nicht zwischen gDNA und transkribierter RNA unterschieden werden kann, falls eine Kontamination der isolierten und umgeschriebenen RNA in cDNA mit gDNA vorliegen würde (Benennung des daraus folgenden PCR-Produkts im Folgenden: LRRC26). Bei zwei der eigenen synthetisierten Primerpaare (n_s + n_as; n_s_BN + n_as_BN; Abb. 11) liegen die *sense* Primer jeweils in dem ersten und die *antisense* Primer

jeweils in dem zweiten Exon der LRRC26-Nukleotidsequenz (Benennung der daraus folgenden PCR-Produkte im Folgenden: LRRC26_1 und LRRC26_2). Da das Intron von LRRC26 jedoch nur eine sehr geringe Größe (76 bp) aufweist, könnte die exakte Bestimmung der Größe des PCR-Produkts dieser beiden Primerpaare nicht eindeutig sein. Deshalb wurden zusätzlich noch zwei verschiedene *antisense* Primer (n_as_ex_ex; n_as_ex_ex_2; Abb. 11) generiert, die das Intron überspannen ohne dessen Nukleotidsequenz zu berücksichtigen (Exon-Exon-Grenze; Benennung der daraus folgenden PCR-Produkte im Folgenden: LRRC26 ex_ex und LRRC26 ex_ex_2). Damit konnte sichergestellt werden, dass bei der Verwendung dieser Primer ausschließlich transkribierte mRNA und keine gDNA detektiert wurde. Zusätzlich wurde ein weiterer *antisense* Primer (n_as_int; Abb. 12) synthetisiert, welcher an einen Teil der Intron-Sequenz hybridisiert und somit die möglicherweise nach der Aufreinigung der RNA und Umschreibung der mRNA in cDNA noch immer vorhandene gDNA nachweist (Benennung des daraus folgenden PCR-Produkts im Folgenden: LRRC26 In).

In den folgenden beiden Abbildungen (Abb. 11, 12) sind die genomischen LRRC26-Nukleotidsequenzen mit und ohne Intron mit den verschiedenen Primerbindestellen grafisch dargestellt.

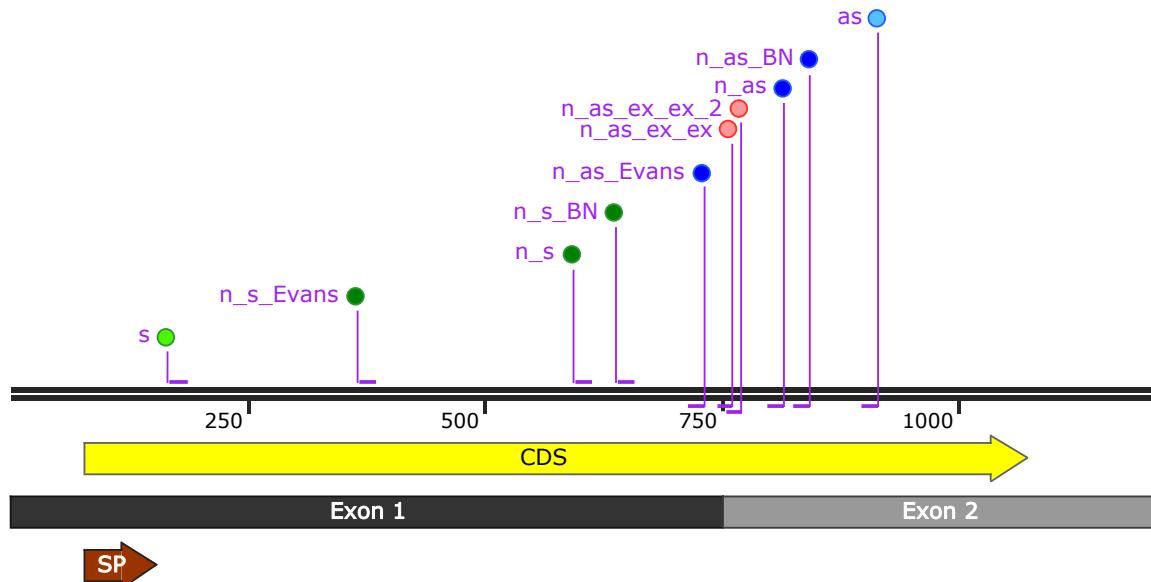
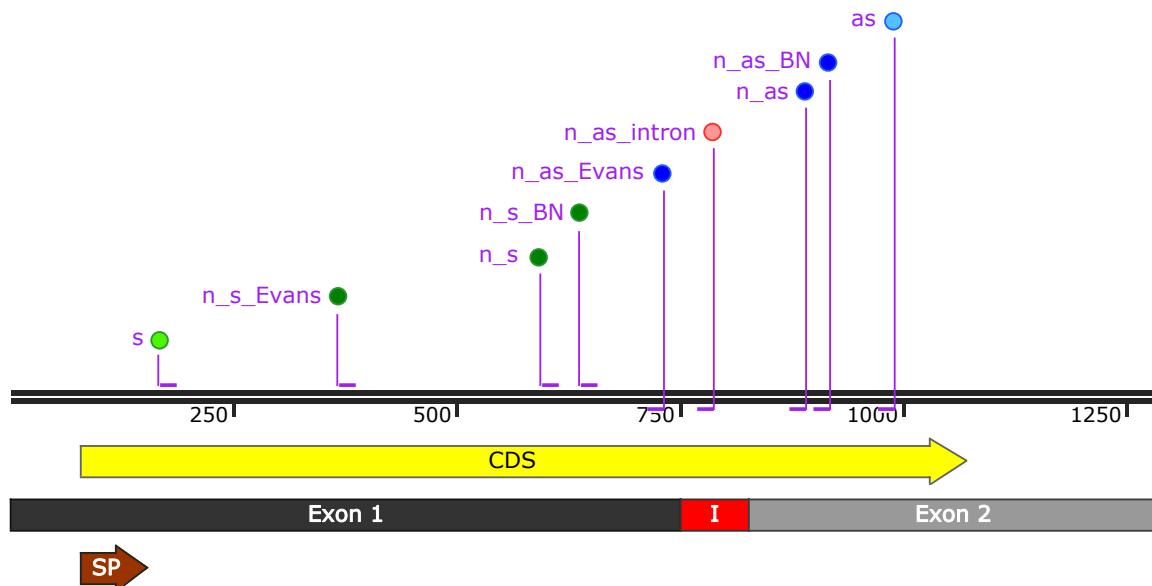


Abbildung 11: Nukleotidsequenz der LRRC26-mRNA

In gelb ist der kodierende Sequenzbereich (CDS= *coding sequence*) der LRRC26-Nukleotidsequenz dargestellt. Braun kennzeichnet die Sequenz des Signalpeptids (SP). Die beiden Exons (Exon 1 und Exon 2) sind in grau und hellgrau abgebildet. Hellgrün markierte Sequenzen zeigen *sense* Primer (s), dunkelgrün markierte *nested-sense* Primer (n_s), hellblau markierte *antisense* Primer (as) und dunkelblau markierte *nested-antisense* Primer (n_as). In rot ist der die beiden Exon-Exon-Grenzen-überspannende *antisense* Primer (n_as_ex_ex) dargestellt.

**Abbildung 12: Nukleotidsequenz der genomischen LRRC26-DNA mit Intron**

Gelb zeigt den kodierenden Sequenzbereich (CDS= *coding sequence*) der genomischen LRRC26-DNA (abzüglich der Intron-Sequenz). In braun ist die Sequenz des Signalpeptids (SP) abgebildet. Die beiden Exons (Exon 1 und Exon 2) sind in grau und hellgrau mit dazwischenliegendem 76 bp-großen Intron in rot, dargestellt. Hellgrün markierte Sequenzen (s) spiegeln *sense* Primer, dunkelgrün markierte *nested-sense* Primer (n_s), hellblau markierte *antisense* Primer (as) und dunkelblau markierte *nested-antisense* Primer (n_{as}) wider. Die Farbe rot zeigt den innerhalb des Introns liegenden *antisense* Primer (n_{as}_int).

2.7.8.1.3 Synthese der Primer zum mRNA-Nachweis von LRRC52 in der zweiten PCR

Zur Analyse von LRRC52-mRNA in der zweiten PCR wurde ein Primerpaar (n_s+n_{as}; Abb. 13) generiert, bei welchem der *sense* Primer in dem ersten und der *antisense* Primer in dem zweiten Exon der LRRC52-Nukleotidsequenz liegen (Benennung des daraus folgenden PCR-Produktes im Folgenden: LRRC52). Obwohl aufgrund des großen Introns von LRRC52 (19996 bp) auch bei einer gDNA-Kontamination der isolierten RNA, und somit auch der anschließenden Umschreibung in cDNA, die gDNA in der zweiten PCR nicht amplifiziert und somit auch nicht nachgewiesen werden kann wurde noch ein weiterer *antisense* Primer (n_{as_ex_ex}; Abb. 13) synthetisiert. Dieser überspannt das Intron ohne dessen Nukleotidsequenz zu berücksichtigen (Exon-Exon-Grenze; Benennung der daraus folgenden PCR-Produkte im Folgenden: LRRC52 ex_ex) und stellt sicher, dass bei der Verwendung dieses Primers ausschließlich transkribierte mRNA und keine gDNA detektiert wird.

Die folgende Abbildung (Abb. 13) stellt die verschiedenen Primerbindestellen in der genomischen LRRC52-Nukleotidsequenz ohne Intron grafisch dar.

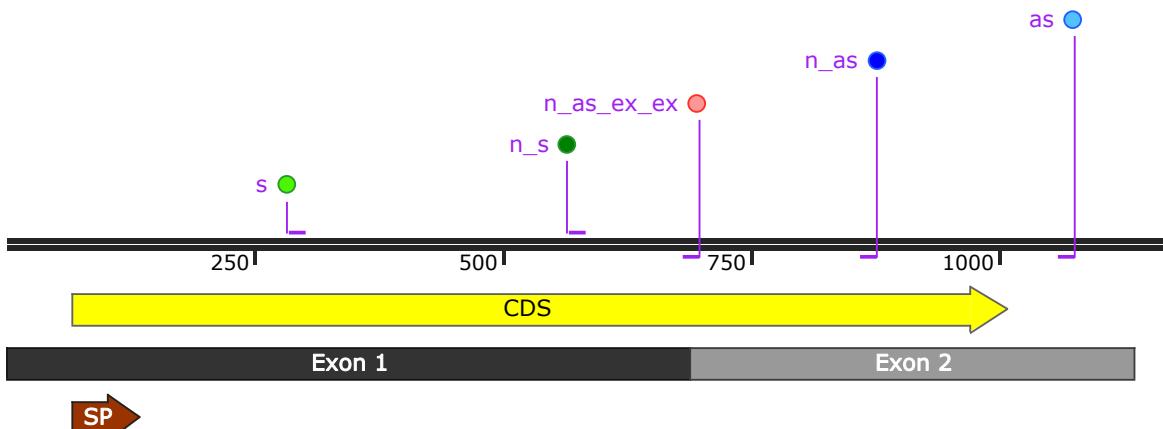


Abbildung 13: Nukleotidsequenz der LRRC52-mRNA

In gelb ist der kodierende Sequenzbereich (CDS= *coding sequence*) der LRRC52-Nukleotidsequenz abgebildet. In braun ist die Sequenz des Signalpeptids (SP) dargestellt. Die Farben grau und hellgrau zeigen die beiden Exons (Exon 1 und Exon 2). Hellgrün markierte Sequenzen stellen *sense* Primer, dunkelgrün markierte *nested-sense* Primer (*n_s*), blaue markierte *antisense* Primer (*as*) und dunkelblau markierte *nested-antisense* Primer (*n_as*) dar. Die Farbe rot bildet den die beiden Exon-Exon-Grenzen-überspannenden *antisense* Primer (*n_as_ex_ex*) ab.

2.7.8.2 Pipettierschema

Zum Nachweis der verschiedenen Sequenzabschnitte wurden entsprechende Mastermix-Ansätze mit den zugehörigen *sense* und *antisense* Primern (Sequenzen s. Tab. 8) hergestellt. Für die PCR wurde der *GoTaq® G2 Green Mastermix* verwendet. Dieser Ansatz besteht aus der *GoTaq® G2 DNA Polymerase*, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer sowie zwei Farbstoffen (blau und gelb), die ein Überprüfen des Voranschreitens der Gelelektrophorese möglich machen. Die Reaktionen können somit ohne Zugabe von Ladepuffer direkt auf das Analysegel aufgetragen werden. PCR-Reaktionen mit anschließender Sequenzierung wurden mit dem *GoTaq® G2 Colourless Mastermix* angesetzt, der keine Farbstoffe beinhaltet und somit die Durchführung und Effizienz der Sequenzierung nicht beeinträchtigt. Bei der *GoTaq® G2 DNA Polymerase* handelt es sich um eine Korrekturlese (*proof reading*)-Polymerase mit 5'→3' Exonuklease Aktivität. Somit konnten bei der späteren Auswertung der Sequenzen Lesefehler der Polymerase ausgeschlossen werden.

Um die für die Sequenzierung notwendigen Konzentrationen der ausgeschnittenen und aufgereinigten PCR-Produkte zu erhalten, wurde das Volumen der PCR-Reaktionen von 20 µl auf 50 µl hochskaliert. In den folgenden Tabellen (Tab. 3, 4) sind die Pipettieransätze für die unterschiedlichen Mastermixe dargestellt.

Tabelle 3: PCR-Mastermix-Ansatz (zur visuellen Überprüfung der PCR-Produkte)

Volumen [µl]	Komponente
10,0	GoTaq® G2 Green Mastermix
1,0	Primer <i>sense</i>
1,0	Primer <i>antisense</i>
ad 20,0 µl	RNase-freies dH ₂ O

Tabelle 4: PCR-Mastermix-Ansatz bei anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte

Volumen [µl]	Komponente
25,0	GoTaq® G2 Colourless Mastermix
2,5	Primer <i>sense</i>
2,5	Primer <i>antisense</i>
ad 50,0 µl	RNase-freies dH ₂ O

Um eine Verunreinigung der Mastermix-Komponenten auszuschließen wurde pro Versuchsreihe eine Negativkontrolle (H₂O; Mastermix ohne Zugabe von cDNA) mitgeführt. Zusätzlich wurde in jedem Versuchsansatz zum Nachweis von LRRC26-mRNA Speicheldrüsengewebe als Referenz und zum Nachweis von LRRC52-mRNA Hodengewebe als Positivkontrolle zur Überprüfung der Primerpaare mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden einmal stellvertretend für alle weiteren Untersuchungen im Ergebnisteil gezeigt.

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) sind die Volumina der *Templates*, die in den beiden PCR-Schritten eingesetzt wurden, aufgeführt.

Tabelle 5: Template-Volumina der PCR-Reaktionen

Template	Volumen 1. PCR [µl]	Volumen 2. PCR [µl]
IHZ	1,0 - 5,0	1,0 - 5,0
Badlösung	1,0 - 5,0	1,0 - 5,0
(RT Kontrolle) Corti-Organ	1,0 - 5,0	0,1 - 5,0
(RT Kontrolle) Hoden	1,0	0,1
(RT Kontrolle) Speicheldrüse	1,0	0,1
RNase-freies dH ₂ O	1,0 - 5,0	0,1 - 5,0

Die Reaktionsansätze wurden an einem separaten, von den anderen molekularbiologischen Arbeitsplätzen räumlich getrennten, Arbeitsplatz zusammengefügt, gevortext und abzentrifugiert.

2.7.8.3 Nested PCR-Programme

Aufgrund der geringen Anzahl an cDNA-Kopien wurde die PCR für die *LRRC*- und *Cacna1d*-Transkripte mit 40 Zyklen und für die *Kcnma1*-Transkripte mit 35 Zyklen sowohl in der 1. PCR als auch in der 2. PCR in einem Thermocycler T100 (Fa. BioRad, München) durchgeführt. In den folgenden Tabellen (Tab. 6, 7) sind die verwendeten PCR-Programme für die verschiedenen nachzuweisenden *Templates* dargestellt.

Tabelle 6: PCR-Programm zum Nachweis der *LRRC*- und *Cacna1d*-Transkripte

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
94	4 min	-
94	30 s	40
individuell	30 s	40
72	individuell	40
72	5 min	-
4	∞	-

Tabelle 7: PCR-Programm zum Nachweis der *Kcnma1*-Transkripte

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
94	2 min	-
94	1 min	35
individuell	30 s	35
72	individuell	35
72	5 min	-
4	∞	-

Für die verschiedenen PCR-Produkte und Primerpaare waren die Annealing- und die Elongationszeiten unterschiedlich. Die folgende Tabelle (Tab. 8) bildet die Sequenzen der (*nested, n*) *sense* (s) und (*nested, n*) *antisense* (as) Primer in 5' → 3'-Richtung sowie deren Annealing-Temperaturen (T_a) und Elongationszeiten (E_t) ab. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bis zur Visualisierung mittels Agarose-Gelelektrophorese innerhalb von einer Woche bei 4 °C.

Tabelle 8: Verwendete Primer mit zugehörigen Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten

Primer	Oligonukleotidsequenz	T_a [°C]	E_t [s]
Ca _v 1.3_s	CTCCGTTGTGAAGATTCTGAG	53	
Ca _v 1.3_as	GATGACGAAGCCCACAAAGAT	53	55
Ca _v 1.3_n_s	GAGGGTCTTGCAGGCCTCTCAGAGC	60	
Ca _v 1.3_n_as	ATCTCCACACGGTAGTTGTAGACAGGA	60	30
BK _a _s	CCAGACACTGACTGGCAGAGTCC	61	
BK _a _as	GGGACGTAGCTGGCAAACATGGCC	61	55
BK _a _n_s	ACATGGCTTCAACGTGTTCTTCC	56	
BK _a _n_as	AAACGTCCCCATAACCCACTGTAG	56	30
LRRC26_s	TTGGAACTGCCCTTCTAAA	51	
LRRC26_as	GATGGCCAAACTAGCAAGGA	51	55
LRRC26_n_s	AGCCTGCAGGACAATTCACT	52	
LRRC26_n_as	CGGAAAAGCTGTCAGTAGGC	52	30
LRRC26_n_s_Evans	CTGCTATACCTAGATCTGAG	51	
LRRC26_n_as_Evans	CTTACGCAGCCAAGTGCAA	51	30
LRRC26_n_s_BN	GAATAACTTGCCTGCCCTCG	51	
LRRC26_n_as_BN	ACCAAACATTATCCGTCCTG	51	30
LRRC26_n_as_ex_ex	GGTCTCAGTTCTGAGGCT	52	30
LRRC26_n_as_ex_ex_2	GAGCAGGGTCTCAGTTCTG	52	30
LRRC26_n_as_int	CTGAGTGCAGTGTGAAGG	52	30
LRRC52_s	CATAATGGCTCCACCACCT	52	
LRRC52_as	ACAGCACATACACCCGTGA	52	55
LRRC52_n_s	TGGGATTCCCTCAGTGACCT	52	
LRRC52_n_as	GGGAGGGCAAGAGAGAAAT	52	30
LRRC52_n_as_ex_ex	TTCTGGGCATCTGGGTGGT	52	30

2.7.9 Überprüfung der amplifizierten PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Größe und Ladung (Lumpkin et al., 1985; Ogston, 1958; Slater und Noolandi, 1988) in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Je nach erwarteter Produkt-Größe (siehe Tab. 9) wurde ein 1 (~500 bis 800 bp) bzw. 3 (~100 bis 500) %-iges Agarosegel verwendet und ein 1 kb- bw. 100 bp-DNA-Größenstandard mitgeführt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit den interkalierenden Farbstoffen Ethidiumbromid oder MidoriGreen (in-Gel-Konzentration: 6 µl/100 ml) unter UV-Licht visualisiert.

Tabelle 9: Erwartete Bandengrößen der verschiedenen Zielgene

Zielgen	Bandengröße [bp]	PCR-Schritt
Cacna1d (Ca _v 1.3)	526	1. PCR
Cacna1d (Ca _v 1.3)	426	2. PCR
Kcnma1 (BKα)	639	1. PCR
Kcnma1 (BKα)	423	2. PCR
LRRC26	749	1. PCR
LRRC26	366	2. PCR
LRRC26_1	222	2. PCR
LRRC26_2	205	2. PCR
LRRC26 ln	150	2. PCR
LRRC26 ex_ex	168	2. PCR
LRRC26 ex_ex_2	174	2. PCR
LRRC52	794	1. PCR
LRRC52	314	2. PCR
LRRC52 ex_ex	134	2. PCR

Im Folgenden werden die Transkripte von *Cacna1d* mit „Ca_v1.3“ und von *Kcnma1* mit “BKα” bezeichnet.

2.7.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der zu analysierenden DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit den entsprechenden Schutzmaßnahmen für den Experimentator sowie für die Proben durchgeführt und die DNA anschließend mit dem *peqGOLD Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers aufbereitet. Die aufgereinigte DNA wurde mit Hilfe von RNase/DNAse-freiem Wasser in frische sterile Reaktionsgefäß in einem Volumen von 20 µl eluiert. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte durch die Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen). Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach Firmenangaben. Wichtig war es hierbei die zuvor aus Agarosegelen extrahierte und aufgereinigte DNA in RNase/DNAse-freiem Wasser oder Tris-Puffer zu lösen, da EDTA die Aktivität der Sequenzierungspolymerase inhibiert. Von jedem aufgereinigten und zu analysierenden Produkt wurden 18 ng pro 100 Basen in zwei sterile Reaktionsgefäß überführt und mit RNase/DNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Anschließend wurde beiden Proben 3 µl der zugehörigen *sense* oder *antisense* 1:10er-Primerverdünnung

(2 pmol/ μ l; effektiv 30 pmol) beigefügt. Für ein optimales Ergebnis gelten folgende Primerspezifikationen: eine optimale Primerlänge liegt zwischen 18 und 22 Basenpaaren, der G/C-Gehalt sollte ungefähr 50 % betragen, die Primer sollten keine Haarnadel-Strukturen, palindromische Sequenzen und Dimere enthalten, im Idealfall sollten Sequenzen vermieden werden, die zu 90 % mit einer weiteren Stelle in der Ursprungssequenz gegenläufig übereinstimmen sowie auch mit den letzten 7 Basen des 3'-Endes und die Primer und alle anderen verwendeten Chemikalien sollten nicht fluoreszent sein. Die Sequenzierungsergebnisse wurden von der Firma per Mail zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung und Bewertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Hilfe der NCBI-und Snap Gene-Software. Mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* der NCBI-Homepage wurden die Sequenzen mit der Ursequenz in *sense* und *antisense* verglichen. Hierbei war es möglich, Fehler in der Basenfolge zu ermitteln, welche wie alle Ergebnisse sowohl in *sense* als auch in *antisense* Leserichtung vorliegen mussten, um aussagekräftig zu sein. Im nächsten Schritt wurden die Sequenzen mit Hilfe der *SnapGene Viewer* Software in einem Chromatogramm visualisiert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Indirekte Immunhistochemie zur Lokalisierung bestimmter Proteine in *whole mount* Corti-Organen

Zum Nachweis von Proteinen in Gewebeproben wurde die Standard-Methode der indirekten Immunfluoreszenz (IF) verwendet, bei der die entsprechenden Proteine über einen Antigen-Primärantikörper-Komplex und einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen werden. Vor der Präparation des Corti-Organs unter dem Stereomikroskop wurde dieses zur Fixierung mit einer der in Tabelle 10 angegebenen Chemikalie gefüllten kleinen Petrischale (35 mm x 10 mm) überführt. Nachdem mit einer feinen Kanüle (25 G x 1½") ein kleines Loch in den äußeren apikalen Teil der Cochlea gestochen worden war, wurde vorsichtig 1 ml des Fixativs durch das runde Fenster injiziert. In der Fixierlösung wurde die Cochlea für eine bestimmte Zeit und bei einer bestimmten Temperatur (Tab. 10) inkubiert. Um optimale Färbeergebnisse zu erhalten wurden verschiedene Fixierlösungen verwendet. Die Zamboni-Fixierlösung (Stefanini et al., 1967) wurde mit den in Tabelle 10 aufgelisteten Chemikalien hergestellt und vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 10: Übersicht der verschiedenen Fixierlösungen

Fixativ	Konzentration [%]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Hersteller
Ethanol absolut	100	-20	20	VWR International GmbH, USA
Methanol absolut	100	-20	20	Merck KGaA, Darmstadt
PFA	2 oder 4	4	10	Life Technologies, USA
Zamboni	-	4	10	Eigenherstellung

Tabelle 11: Präparation der Zamboni-Fixierlösung

Chemikalie	Konzentration	Volumen
H ₂ O	-	25,0 ml
NaCl	-	1,7 g
NaOH	1 M	0,5 ml
PBS	10 x	2,5 ml
PFA	2 %	50,0 ml
PFA	8 %	50,0 ml
Pikrinsäure	Überstand einer gesättigten Lösung	22,5 ml

Nach der Fixierung wurde die Cochlea in eiskaltes PBS überführt. Das verbleibende Fixativ in der Cochlea wurde durch die Applikation von 1 ml PBS durch das runde Fenster entfernt. Anschließend wurde die Cochlea unter dem Stereomikroskop wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben isoliert und das Corti-Organ mit Cell-Tak™ auf einen Objektträger aufgeklebt. Um eine Dehydrierung des Gewebes während der IF zu verhindern wurde das auf dem OT-fixierten Corti-Organ in 50 µl PBS in einer feuchten Kammer aufbewahrt. In der folgenden Tabelle (Tab. 12) sind die verschiedenen Puffer für die immunhistochemischen Färbungen aufgelistet. Alle Puffer wurden am Tag des Experiments frisch hergestellt und während der IF auf Eis gelagert.

Tabelle 12: Puffer für immunhistochemische Färbungen von *whole mount* Corti-Organen

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

Zu Beginn wurde das Gewebe für 10 min mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert (PP), damit die Primärantikörper (PAK) an ihr entsprechendes intrazelluläres Antigen gelangen können. Unspezifische Bindestellen wurden mit 1 % BSA für 30 min abgesättigt. Der Blockierpuffer (BP) wurde aus einer 10 %-igen Stammlösung mit 1 x PBS auf eine finale Konzentration von 1 % BSA eingestellt. Währenddessen wurden die Primärantikörper (PAK) in Reaktionspuffer (RP) angesetzt (Tab. 13). Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte entweder für 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Tabelle 13: Verwendete primäre Antikörper

Epitop	Wirt	Firma	Katalognr.	Lot	Verdünnung
Slo1-BKα monoklonal	Maus	Neuromab, Davis, CA, USA	75-022	444-1LC-54E 455-4JD-12/64	1:500
BKCa polyklonal	Kaninchen	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	APC-021	AN-06/08 AN-1302	1:50 - 1:500
CaV1.3 polyklonal	Kaninchen	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	ACC-005	AN-15	1:250 -1:500
CtBP2/RIBEYE monoklonal	Maus	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	04274 612044	2111738 5301880	1:100
Claudin-14 polyklonal	Maus	Eigenherstellung AG Flockerzi	-	-	1:500
LRRC26, Q15 polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, sc-132328 Texas, USA		F1411 C1611 L1713	1:50 - 1:1000
LRRC26, K12 polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, sc-132325 Texas, USA		H0814	1:50 - 1:1000
LRRC26 polyklonal	Kaninchen	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	APC-070	AN-0125	1:50 - 1:1000
LRRC52 polyklonal	Kaninchen	Eigenherstellung AG Jung	-	1567 3. Serum	1:100
LRRC52 polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, sc-164921 Texas, USA		J2811 G0814	1:50 - 1:1000
LRRC52 polyklonal	Kaninchen	Origene, Rockville, MD, USA	TA336176	QC14941-40379	1:50
Sec62 polyklonal	Kaninchen	Eigenherstellung AG Zimmermann/ Jung	-	-	1:50
Otoferlin monoklonal	Maus	Abcam, Cambridge, UK	ab53233	GR3919-1 GR3186324-1	1:50

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl kommerzielle als auch in Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen eigens synthetisierte Primärantikörper verwendet. Die bioinformatische Analyse der terminalen Sequenzen von LRRC52 zur Synthese von Primärantikörpern erfolgte durch Prof. Dr. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie). Nach erfolgreicher *in silico*-Untersuchung wurden die entsprechenden Sequenzen von Frau Aline Herges synthetisiert und für die Immunisierung vorbereitet. Zunächst wurde zwei Kaninchen Blut für Kontrollseren entnommen. Danach wurden die Tiere in einem zweiwöchigen Rhythmus mit den erfolgreich synthetisierten Peptiden immunisiert. Nach dem achten Serum erfolgte die Immunisierung nur noch alle vier Wochen. Die Immunisierung der Kaninchen sowie die anschließende Aufreinigung der Seren wurde von Frau Sabine Pelvay durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Serum LRRC52 (#1567) verwendet.

Nach der PAK-Inkubation wurde das Gewebe für je 15 min zweimal mit Waschpuffer (WP) gewaschen. Die Sekundärantikörper (SAK) wurden, wie in Tabelle 14 angegeben, in RP verdünnt, für 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert und anschließend für 70 min bei RT inkubiert.

Tabelle 14: Verwendete sekundäre Antikörper

Fluorophor	Wirt/Epitop	Firma	Katalognr.	Lot	Verdünnung
AF488	Esel anti-Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	ab150073	GR261638-1	1:500
AF488	Esel anti-Maus	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	A21202	898250 1696430	1:500
AF488	Ziege anti-Maus	Fisher Scientific GmbH, Nidderau	A11001	774904	1:500
AF488	Esel anti-Ziege	Abcam, Cambridge, UK	Ab150129	GR136257-1	1:500
AF555	Esel anti-Maus	Abcam, Cambridge, UK	Ab150106	GR123797-1	1:1500
AF568	Ziege anti-Maus	Fisher Scientific GmbH, Nidderau	A11019	1700327	1:500
Cy3	Esel anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	711-166-152	94967 122096	1:1500
Cy3	Ziege anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	111-166-046	94213	1:1500
DyLight405	Esel anti-Kaninchen	Dianova GmbH, Hamburg	107916	711-475-152	1:500

Durch zweimaliges 15-minütiges Waschen mit WP wurden nicht-gebundene SAK entfernt. Die Zellkerne wurden für 10 min mit DAPI gefärbt. Dazu wurde eine Stammlösung

(0,5 mg/ml) mit 1 x PBS zu einer finalen Konzentration von 1,5 µg/ml verdünnt. Abschließend wurden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit 10 µl Vectashield® mit oder ohne DAPI eingedeckt. Um die Färbung zu erhalten, wurden die OT bei 4 °C und vor Lichteinwirkung geschützt gelagert. Mit einem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 wurden Übersichtsaufnahmen mit einem 20 x/1 NA Luftobjektiv und Detail- sowie Stapelaufnahmen mit einem 63 x/1,4 NA Ölobjektiv aufgenommen. Die Farbdarstellung der Fluorophore AF555, AF568 und Cy3 erfolgte in lila anstatt in rot, für DyLight405 in lila anstelle von blau und für AF488 in türkis statt in grün. Weitere veränderte Farbabbildungen werden in den entsprechenden Abbildungen aufgelistet.

2.8.1.2 Immunhistochemische Validierung des LRRC52-Antikörpers in Hodengewebe

Zur Analyse der Spezifität des LRRC52-Primärantikörpers (1567) wurden Gefrierschnitte von Hodengewebe von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Petra Weißgerber zur Verfügung gestellt. Die hierfür verwendeten 129B6F1-Wildtyp-Mäuse waren 9-12 Wochen alt und wurden von Frau Femke Lux zu Beginn mit 1 x PBS perfundiert. Es erfolgte ein zweiter Perfusionsschritt mit 4 % PFA/PBS zur Fixierung des Gewebes mit einer anschließenden Postfixierung mit 4 % PFA/PBS für 4 Stunden bei 4 °C. Über Nacht wurde das Gewebe zum Gefrierschutz in 30 % Saccharose bei 4 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag in Tissue Freezing Medium™ (Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau) eingebettet. Mit Hilfe eines Kryo-Mikrotoms CM3050 S (Fa. Leica, Wetzlar) wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt und bis zur weiteren Verwendung in der vorliegenden Arbeit bei -80 °C gelagert.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden anschließend laut (Gilibili et al., 2014) durchgeführt. Vor der Verwendung der bereitgestellten Gefrierschnitte wurden diese bei *RT* aufgetaut und während der kompletten IF in einer Feuchtkammer aufbewahrt. Die folgende Tabelle (Tab. 15) zeigt die verschiedenen Puffer für die immunhistochemischen Färbungen des Hodengewebes. Alle Puffer wurden am Tag des Experiments frisch hergestellt und während der IF auf Eis gelagert.

Tabelle 15: Puffer für immunhistochemische Färbungen von Hoden-Kryoschnitten

Substanzen	Menge
BSA	aus 10 % Stammlösung in 1 x PBS
Blockier-/Permeabilisierungspuffer (BPP)	0.5 % Tween-20, 0.1 % BSA, 5 % Ziegenserum (GS) in 1 x PBS
Reaktionspuffer (TPBS-BSA)	0.5 % Tween-20, 0.1 % BSA in 1 x PBS
primäre Antikörper-Lösung	entsprechende Verdünnung in TPBS-BSA + 1 % GS
sekundärer Antikörper-Lösung	entsprechende Verdünnung in TPBS-BSA

Damit der Primärantikörper an sein entsprechendes intrazelluläres Antigen binden kann und unspezifische Bindestellen abgesättigt werden wurde das Gewebe für 20 min mit 0.5 % Tween-20, 0.1 % BSA und 5 % GS gleichzeitig permeabilisiert (PP) und geblockt. Der Blockier-/Permeabilisierungspuffer (BPP) wurde aus einer 10 %-igen Stammlösungen mit 1 x PBS auf eine finale Konzentration von 1 % BSA eingestellt. Während dieser Absättigung wurde der zu analysierende LRRC52-Primärantikörper 1:100 in Reaktionspuffer (TPBS-BSA) mit 1 % NDS angesetzt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde das Gewebe dreimal in TPBS-BSA für 30 min bei RT gewaschen. Der Sekundärantikörper Esel-anti-Kaninchen-Cy3 wurde 1:300 in TPBS-BSA verdünnt, für 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert und anschließend für 60 min bei 37 °C inkubiert. Durch dreimaliges 30-minütiges Waschen mit TPBS-BSA bei RT wurden nicht-gebundene SAK entfernt. Die Zellkerne wurden für 10 min mit DAPI (1:100) gefärbt. Dazu wurde eine Stammlösung (0,5 mg/ml) mit 1 x PBS zu einer finalen Konzentration von 1,5 µg/ml verdünnt. Abschließend wurden die Proben erneut zweimal mit TPBS-BSA bei RT gewaschen und mit 200 µl Vectashield® plus DAPI eingedeckt. Um die Färbung zu erhalten wurden die OT bei 4 °C und vor Lichteinwirkung geschützt gelagert. Mit einem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 wurden Übersichtsbilder mit einem 20 x/1 NA Luftobjektiv und Detail- sowie Bildstapel mit einem 63 x/1,4 NA Ölobjektiv aufgenommen. Die Farbdarstellung des Fluorophors Cy3 erfolgte in lila anstelle von rot.

2.8.2 *In situ Proximity Ligation Assay* zur Analyse der Interaktion von BK-Kanälen und LRRC52

Der „*Proximity Ligation Assay*“ (PLA) ist ein sensitives *in situ-Tool* zur Detektion und Quantifizierung der subzellulären Lokalisation von Interaktionspartnern oder posttranslationalen Modifikationen mit einer Entfernung von weniger als 40 nm zueinander (Söderberg et al., 2006). Mithilfe dieser immunzytochemischen Methode ist es möglich zwei räumlich nahe gelegene Epitope, wie man sie beispielsweise bei miteinander interagierenden Proteinen findet, nachzuweisen. Die beiden potentiell interagierenden Ziele werden nach der Fixierung und Permeabilisierung mit zwei aus unterschiedlichen Spezies stammenden, entsprechenden Primärantikörpern markiert. Zur Detektion dieser werden Sekundärantikörper verwendet, welche komplementäre Modifikationen in Form von kurzen Oligonukleotiden („PLA probes“) tragen. Ein Sekundärantikörper ist somit mit einem „PLUS“- und der andere mit einem „MINUS“-Strang verbunden. Durch die Zugabe einer Ligase und zwei zusätzlichen Verbindungsoligonukleotiden hybridisieren die beiden komplementären Oligonukleotidproben zu einem ununterbrochenen ringförmigen DNA-Fragment wenn die nachzuweisenden Epitope in großer Nähe (≤ 40 nm) zueinander lokalisiert sind. Dieses dient als Primer für eine anschließende zuverlässige „rolling-circle“

Amplifikation (*RCA*), bei der eine DNA-Polymerase in Anwesenheit von Nukleotiden ein repetitives, ringförmiges DNA-Molekül synthetisiert. Durch die Hybridisierung von komplementären, fluoreszenzmarkierten (Cy3) Oligonukleotiden an das *RCA*-Produkt kann die große räumlich Nähe der beiden Zielproteine über ein distinktes, fluoreszierendes Signal nachgewiesen werden.

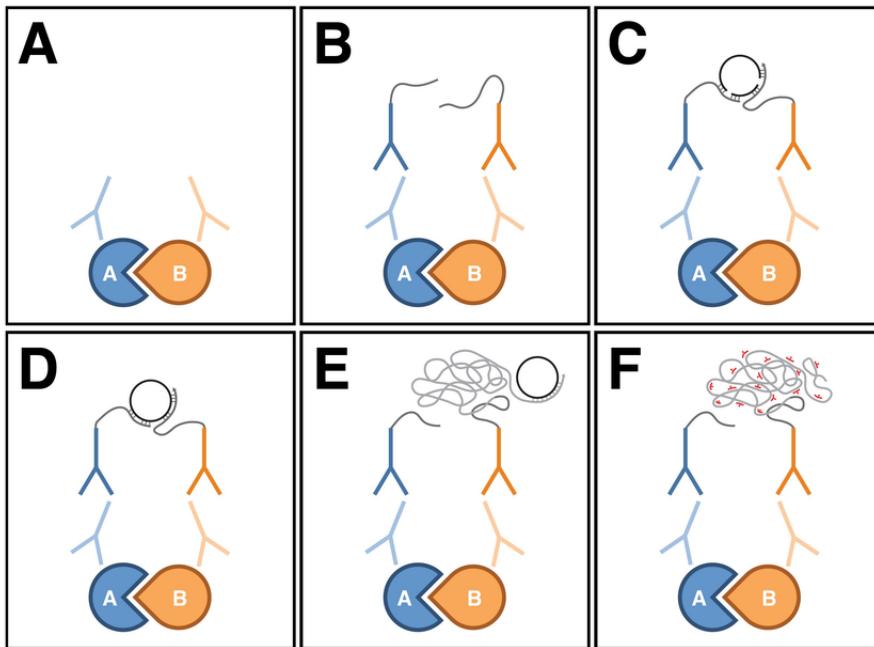


Abbildung 14: Prinzip des *Proximity Ligation Assays*

Die Abbildung zeigt das Prinzip des *in situ-PLA*, bei welchem die Interaktion von zwei Zielproteinen durch ein hoch amplifiziertes ringförmiges DNA-Molekül als ein distinktes, fluoreszierendes Signal dann detektierbar ist, wenn die Epitope dieser Proteine nicht weiter als 40 nm voneinander entfernt sind. **A**, Detektion der Zielproteine durch Spezies-unterschiedliche Primärantikörper. **B**, Detektion der Primärantikörper durch an Oligonukleotid-gekoppelte Sekundärantikörper. **C**, Zugabe von komplementären Verbindungsoligonukleotiden. **D**, Ligation der komplementären Oligonukleotidsequenzen mit Verbindungsoligonukleotiden. **E**, „Rolling-circle“-Amplifikation durch DNA-Polymerase in Anwesenheit von Nukleotiden. **F**, Hybridisierung von Fluoreszenzfarbstoffen an das ringförmige DNA-Molekül (Wang et al., 2015).

In dieser Arbeit wurde der *is-PLA* an fixierten *whole mount* Corti-Organen durchgeführt, wozu die Cochlea wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben isoliert wurde. Nach deren Fixierung mit 2 % PFA für 60 min auf Eis wurden die Corti-Organe isoliert (s. Kap. 2.7.4.1) und in eine 96-well Platte mit 1 x PBS überführt. Für alle folgenden Schritte wurde die 96-well Platte in einer Feuchtkammer aufbewahrt, um eine Dehydrierung des Gewebes während der folgenden Inkubationsschritten bei 37 °C zu verhindern. Nach der Fixierung wurde das *is-PLA* laut Angaben des Herstellers mit Hilfe des *Duolink® In Situ Orange Starter Kit* für Antikörper mit den Wirtsspezies Maus und Kaninchen durchgeführt. Zur vollständigen Entfernung des Fixativs wurde das Gewebe zu Beginn dreimal für 10 min in 1 x PBS gewaschen. Die folgende Tabelle (Tab. 16) zeigt die verschiedenen verwendeten Puffer, die während dem *is-PLA* auf Eis gelagert wurden.

Tabelle 16: Puffer für *is-PLA* an *whole mount* Corti-Organen

Substanzen	Menge
Eselserum (NDS)	aus 10 % Stammlösung in 1 x PBS
Reaktionspuffer (NDSP)	17 % NDS, 0.3 % Triton X-100, 8.3 % 240 mM Phosphat-Puffer, 4 % 4 M NaCl in 1 x PBS
Waschpuffer (WP A)	Duolink® <i>In Situ</i> Wash Buffer A
Waschpuffer (WP B)	Duolink® <i>In Situ</i> Wash Buffer B
primäre Antikörper-Lösung	entsprechende Verdünnung in NDSP
sekundärer Antikörper-Lösung	entsprechende Verdünnung in NDSP

Um den PAK die Bindung an ihr entsprechendes (intrazelluläres) Antigen zu ermöglichen und unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde das Corti-Organ für 60 min in 17 % NDS, 0.3 % Triton X-100, 8.3 % 240 mM Phosphat-Puffer und 4 % 4 M NaCl in 1 x PBS (NDS-Puffer) inkubiert. Der NDS-Puffer wurde aus einer 10 %-igen Stammlösungen mit 1 x PBS auf eine finale Konzentration von 17 % NDS eingestellt. Während dieser Absättigung wurden die PAK, wie in Tabelle 17 dargestellt, in Reaktionspuffer (NDSP) angesetzt. Die Inkubation der PAK erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Tabelle 17: Verwendete primäre Antikörper

Epitop	Wirt	Firma	Katalognummer	Lot	Verdünnung
Slo1-BK α monoklonal	Maus	Neuromab, Davis, CA, USA	75-022	455-4JD-12	1:200
BK Ca polyklonal	Kaninchen	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	APC-021	AN-1302	1:600
LRRC52 polyklonal	Kaninchen	Eigenherstellung AG Jung	-	1567 3. Serum	1:100 - 1:600

Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit Waschpuffer A (WP A) für 5 min bei RT gewaschen. Die an die Oligonukleotid gekoppelten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörper (anti-Maus *MINUS-PLA probes* und anti-Kaninchen *PLUS-PLA probes*) wurden 1:5 in NDSP verdünnt und in einem Volumen von 40 µl pro Reaktion für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurde das Gewebe erneut zweimal mit WP A für 5 min bei RT gewaschen. Anschließend erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit 2 weiteren ringbildenden DNA-Oligonukleotiden sowie einer Ligase (1:40 in 40 µl Ligationspuffer) bei 37 °C. Es folgten zwei weitere Waschschrifte für 2 min bei RT mit WP A. Nachfolgend wurde das Gewebe mit der *Duolink® In Situ* Polymerase (10 Units/µl) und dem Amplifikationspuffer, welcher die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide die an das RCA-Produkt hybridisieren, enthält (1:80 in 40 µl) für 100 min bei 37 °C inkubiert. Zeitgleich wurden die Zellkerne mit DAPI (1:250) markiert und das Gewebe erneut zweimal für 10 min mit WP B und einmal für 1 min mit

0,01 x WP B bei RT gewaschen. Zum Schluss wurde das Gewebe aus den 96-well-Platten mit Cell-Tak™ (1 mg/ml) auf einen Objektträger aufgeklebt und mit dem *Duolink® In Situ Mounting Medium with DAPI* eingedeckt. Das *PLA*-Signal wurde direkt im Anschluss mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 als ein rotes Fluoreszenzsignal in Übersichtsbilder mit einem 20 x/1 NA Luftobjektiv und in Detail- sowie Bildstapel mit einem 63 x/1,4 NA detektiert und analysiert. Die Farbdarstellung der Cy3-markierten Oligonukleotide erfolgte in türkis anstelle von rot.

2.9 Software und Internet-Ressourcen

In dieser Arbeit wurden die folgenden Software und Internet-Ressourcen verwendet.

Tabelle 18: Software und Internet-Ressourcen

Software/Internet-Ressourcen	Hersteller/Herausgeber
BLAST®	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA
IEDB Analysis Resource, Version 2.18.1 (http://tools.iedb.org/main/)	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Fiji2/ImageJ, Version 2.0.0-rc-41-1.50d/641.45s	National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
Inkscape, Version 0.91	Free Software Foundation, Boston, MA, USA
SnapGene, Version 3.2.1	GSL Biotech, GSL Biotech, Chicago, IL, USA
LibreOffice™, Version 6.0.2.1	The Apache Software Foundation, Forest Hill, MD, USA
Microsoft Office 2011, Version 14.1.0/14.7.7	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Pubmed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA
Phyre² (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index)	Michael Sternberg & Lawrence A. Kelley, ©Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London
Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/)	Andreas Untergasser and Harm Nijveen, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA
PyRAT, Version 3.5-347 (Python Based Relational Animal Tracking)	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden
The Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/about/licence)	Knut & Alice Wallenberg Foundation, Stockholm, Schweden
UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/index.html)	UCSC Genome Informatics Group UCSC Genomics Institute CBSE/ITI, Santa Cruz, CA
ZEN 2012, SP1, black Edition, Version 8.1.0.0/8.1.10.484	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Zotero, Version 4.0.17	Center for History and New Media, Fairfax, VA, USA

3 Ergebnisse

Die spannungs- und calciumabhängigen BK-Kanäle werden ubiquitär im Säugetier-Organismus exprimiert und dienen einer Vielzahl von Funktionen wie der Kontrolle des glatten Muskelgewebes und der neuronalen Erregbarkeit. In ausgereiften IHZ sind sie an der Gestaltung des Rezeptorpotentials beteiligt und wirken der Depolarisation, die als Reaktion auf einkommende Schallsignale entsteht, entgegen. In inneren Haarsinneszellen (IHZ) aktivieren BK-Kanäle bei ungefähr -75 mV und sind unabhängig vom Calcium-Einstrom durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle in den IHZ (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). In heterologen Expressionssystemen dagegen aktivieren BK-Kanäle bei etwa +100 mV, sofern nicht bestimmte LRRC-Proteine als modulatorische γ -Untereinheiten anwesend sind (Yan und Aldrich, 2010). Das Protein LRRC26 beispielsweise verschiebt die Aktivierung der BK-Kanäle um 140 mV in Richtung negativer Potentiale, das Protein LRRC52 um immerhin noch 100 mV (Yan und Aldrich, 2012). Eine Kolokalisation der porenbildenden BK α -Untereinheit mit dem Protein LRRC26 konnte in einer Studie von Evanson et al. bereits im Jahr 2014 in arteriellen Myozyten in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Evanson et al., 2014). Zusätzlich war bekannt, dass es zu einer selektiven Expression von LRRC52 in Spermienzellen kommt, welches bei der Modulierung des mit dem BK-Kanal verwandten Kaliumkanals SLO3 eine essentielle Rolle spielt (Yang et al., 2011).

Die in den folgenden Kapiteln aufgeführten Versuchsergebnisse sollten Aufschluss über die exakte subzelluläre Verteilung der BK-Kanäle in IHZ geben und darüber, ob Mitglieder der LRRC-Proteinfamilie in Corti-Organen und IHZ vorkommen. Die Verwendung des Begriffes „ausgereift“ bezeichnet in dieser Arbeit Cochleae von Mäusen mit einem Alter von drei bis vier Wochen. Cochleae von Tieren in einem Alter bis P11, also vor Hörfunktionsbeginn, werden als „unreif“ bezeichnet. Wildtyp (WT)- und *Knockout* (KO)-Tiere der verwendeten BK α -defizienten Mauslinie wurden mit BK $\alpha^{+/+}$ (WT) und BK $\alpha^{-/-}$ (KO) abgekürzt, die der $\text{Ca}_v1.3$ -defizienten Mauslinie mit $\text{Ca}_v1.3^{+/+}$ (WT) und $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ (KO).

3.1 Lokalisation von BK-Kanälen in unreifen und ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Mäusen

Um die exakte Lokalisation der BK-Kanäle in den IHZ der in dieser Arbeit verwendeten Mäuse mit BK-Antikörpern näher zu untersuchen, wurden die in den folgenden Kapiteln (3.1.1 bis 3.1.4) beschriebenen Versuche durchgeführt. Hierbei wurde analysiert, ob es eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung von BK-Kanal-Clustern in ausgereiften IHZ gibt, die an verschiedene intra- und extrazelluläre Calcium-Quellen gekoppelt sind.

3.1.1 Validierung zweier BK-Antikörper aus Kaninchen und Maus im Corti-Organ an ausgereiften inneren Haarsinneszellen in BK α -defizienten Mäusen

Die Deletion des Gens, das für die α -Untereinheit des BK-Kanals kodiert, führt in BK α -defizienten Mäusen unter anderem zu zerebellärer Ataxie (Sausbier et al., 2004) und progredienter Schwerhörigkeit (Rüttiger et al., 2004).

Zur Überprüfung der Spezifität der beiden in dieser Arbeit verwendeten BK-Antikörper, die an die porenbildenden BK α -Untereinheiten binden, wurden IHZ von 22 Tage alten BK α -defizienten Mäusen (BK $\alpha^{-/-}$) mit zwei aus unterschiedlichen Spezies stammenden Antikörpern (Kaninchen und Maus) simultan gefärbt (Abb. 15).

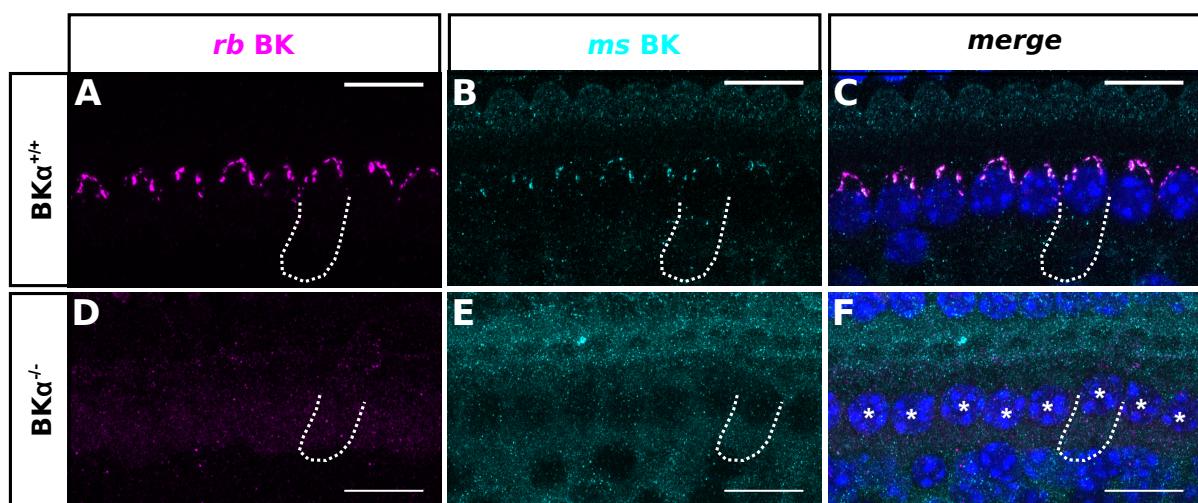


Abbildung 15: Lokalisation von BK-Kanälen in IHZ von BK α -defizienten Mäusen mit zwei verschiedenen primären Antikörpern

Maximum Intensity Projection (MIP) immunhistochemischer Färbungen von jeweils 8 IHZ in *whole mount* Corti-Organen von 22 Tage alten BK α -defizienten Mäusen sowie Kontrolltieren. Simultane Färbung der BK-Kanäle mit zwei unterschiedlichen anti-BK-Antikörpern aus verschiedenen Spezies (Kaninchen-anti-BK, lila, A, und Maus-anti-BK, türkis, B). **A-C**, Überlappende charakteristische clusterförmige supranukleäre Expression der BK-Kanäle in BK $\alpha^{+/+}$ -Mäusen für beide Antikörper. **D-F**, Keine BK-Expression für beide Antikörper in BK $\alpha^{-/-}$ -Tieren. Reihe der IHZ markiert durch Sterne in F. Diese Beobachtung wurde für diese Altersstufen an insgesamt drei Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur in den Überlagerungsbildern dargestellt (C, F). Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. *ms*= Maus; *rb*= Kaninchen. 63 x Öl-Objektiv, Maßstabsbalken: 15 μ m.

Die Darstellungen zeigen Ausschnitte einer *Maximum Intensity Projection (MIP)* eines Corti-Organs mit jeweils acht IHZ von BK $\alpha^{+/+}$ - und BK $\alpha^{-/-}$ -Mäusen (Abb. 15). In beiden Überlagerungsbildern (C und F) sind die blau gefärbten Zellkerne der acht in einer Reihe liegenden IHZ in der Mitte der Bildausschnitte klar zu erkennen. Bei den Kontrolltieren fand sich sowohl für den Kaninchen- (A) als auch für den Maus- (B) Antikörper am Hals der IHZ die charakteristische clusterförmige Färbung der BK-Kanäle. In der Überlagerung beider Kanäle war zusätzlich zu erkennen, dass die Signale beider Färbungen kolokalisieren. In den

IHZ der BK $\alpha^{-/-}$ -Mäuse war für beide Antikörper (D und E) keine Färbung detektierbar ($n = 3$ Tiere pro Genotyp mit je 6-9 IHZ).

3.1.2 Entwicklungsabhängige Lokalisation von BK-Kanälen in inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen

Kros et al. konnten 1998 in elektrophysiologischen Messungen zeigen, dass BK-Kanäle erst ab Hörfunktionsbeginn (etwa postnataler Tag 12, bei Mäuse) (Ehret, 1985) in IHZ exprimiert werden. Weitere Arbeitsgruppen konnten diese Aussagen mit elektrophysiologischen Messungen (Marcotti et al., 2003b), RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung bestätigen (Langer et al., 2003). Diese Aussagen wurden im folgenden Experiment an NMRI-Mäusen unterschiedlicher Altersstufen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Kaninchen-Antikörper überprüft (Abb. 16).

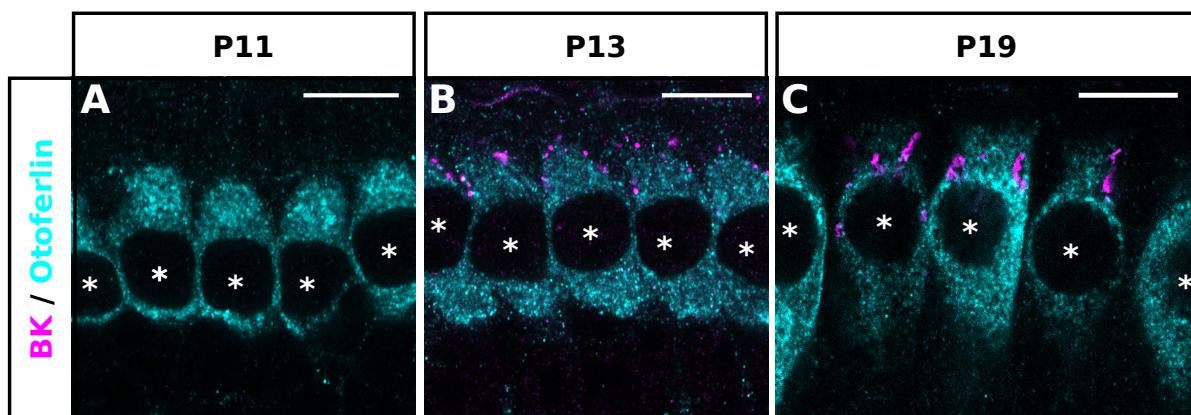


Abbildung 16: Lokalisation von BK-Kanälen in IHZ von NMRI-Mäusen vor und nach Hörbeginn

Einzelne optische Schnitte immunhistochemischer Färbungen von jeweils 3-5 IHZ aus *whole mount* Corti-Organen 11, 13 und 19 Tage alter NMRI-Mäuse. **A**, Keine Expression von BK-Kanälen (markiert mit Kaninchen-anti-BK, lila) in IHZ (markiert mit Maus-anti-Otoferlin, türkis) bei Mäusen vor Hörfunktionsbeginn (Tag 12 nach Geburt, P12), hier gezeigt für P11. **B**, Punktförmige Expression von BK-Kanälen am Hals der IHZ. **C**, Clusterförmige Ausbreitung der BK-Expression im Halsbereich der IHZ in der weiteren Entwicklung, hier gezeigt für P19. Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen bestätigt. 63 × Öl-Objektiv, Maßstabsbalken: 15 µm, Sterne markieren die Zellkerne der IHZ.

Abgebildet sind drei optische Schnitte von Corti-Organen unterschiedlicher Altersstufen mit jeweils drei bis fünf IHZ, deren Zellkerne durch Sterne angedeutet sind (Abb. 16). Das multifunktionale Protein Otoferlin ist sehr stark in der kompletten IHZ exprimiert, vor allem an synaptischen Vesikeln, der Plasmamembran und im Golgi-Apparat oberhalb des Zellkerns (Duncker et al., 2013; Roux et al., 2006). Es ist an der Exozytose und dem Vesikelrecycling beteiligt und ist somit für das Hören essentiell (Pangršič et al., 2012). In Mäusen vor Hörfunktionsbeginn (A, hier gezeigt für P11) war noch keine BK-Färbung detektierbar. Bei

hörenden Mäusen breitete sich die punktförmige BK-Färbung (B, P13) am Hals der IHZ mit zunehmendem Alter der Tiere zu größeren BK-positiven Clustern (C, P19) aus.

3.1.3 Lokalisation von BK-Kanälen und Lage der *Tight Junctions*

Die *Tight Junctions* (*zonulae occludentes*) sind charakteristische Zell-Zell-Verbindungen, die sich im apikalen Bereich epithelialer und endothelialer Zellen befinden. *Tight Junctions* verhindern, dass eine interzelluläre Diffusion von Molekülen zwischen dem internen interzellulären Milieu eines Organs und dem externen Milieu stattfindet. Die Hauptkomponenten der *Tight Junctions* stellen Proteine der Familie der Claudine dar, die gewebe- und zelltypspezifisch exprimiert werden (Anderson, 2006; Furuse und Tsukita, 2006; Van Itallie und Turksten und Troy, 2004). In der Cochlea von Mäusen konnte die Expression von Claudin-14 sowie das Vorhandensein von Claudin-14-mRNA mit fortschreitendem Alter detektiert werden (Wilcox et al., 2001). Claudin-14 dichtet somit die K⁺-reiche Endolymphe gegen die Na⁺-reiche Perilymphe ab.

Um die exakte Lage der BK-Kanäle im Vergleich zu den Grenzen zwischen Peri- und Endolymphe zu untersuchen, wurden BK und Claudin-14 simultan immunhistochemisch in der Cochlea von 23 Tage alten NMRI-Mäusen gefärbt (Abb. 17).

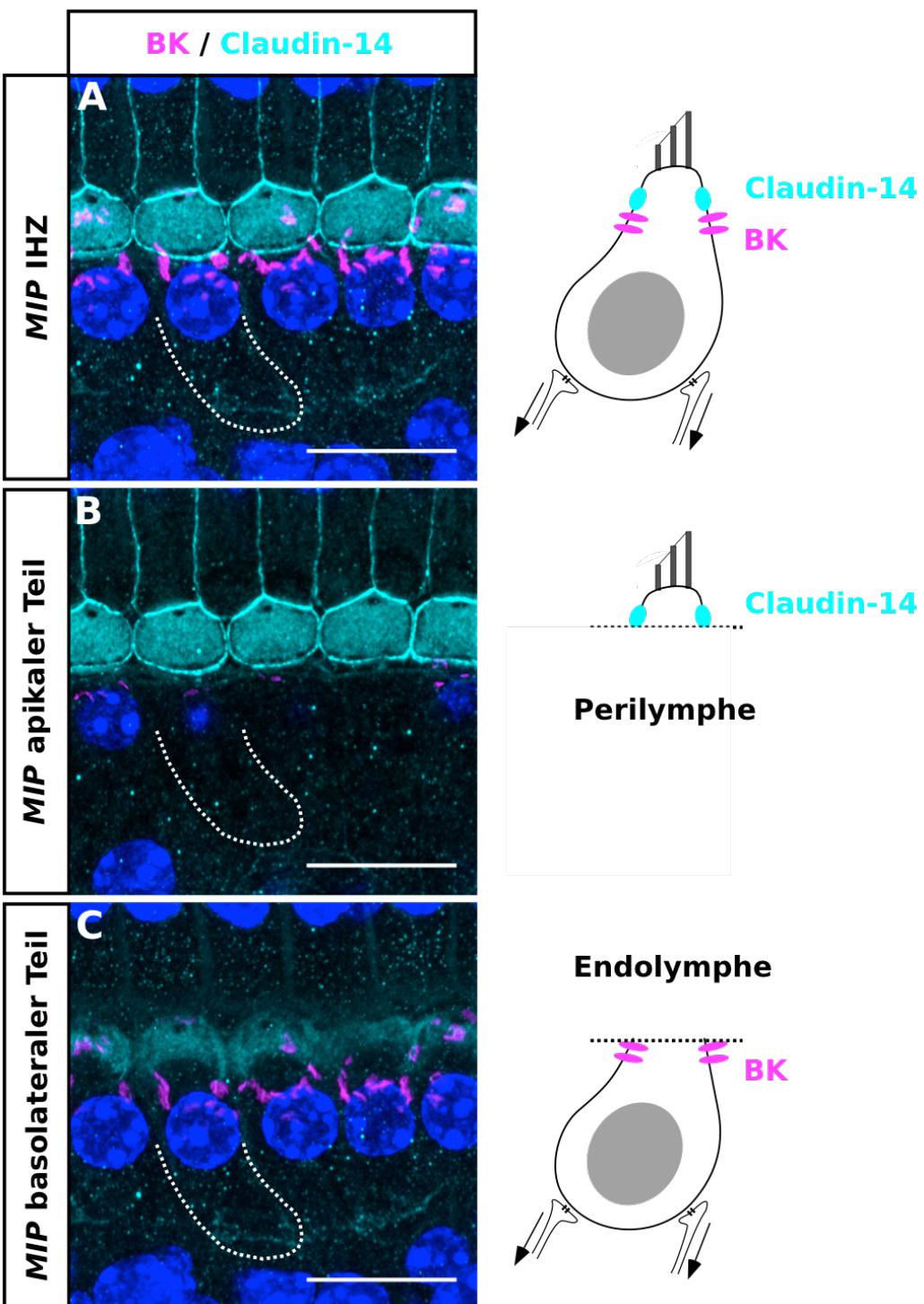


Abbildung 17: Lokalisation von BK-Kanälen und dem Tight Junction-Marker Claudin-14 in IHZ von NMRI-Mäusen

MIP der immunhistochemischen Färbung von 5 IHZ eines *whole mount* Corti-Organs einer 23 Tage alten NMRI-Maus. Expression von BK-Kanälen (markiert mit Maus-anti-BK, lila) und Tight Junctions (markiert mit Kaninchen-anti-Claudin-14) im oberen Teil der IHZ. **A**, Clusterförmige Expression der BK-Kanäle in unmittelbarer Nähe zu den Tight Junctions im apikalen Bereich der IHZ (links) und schematische Darstellung (rechts). **B**, Isolierte Claudin-14 Expression in der MIP des apikalen Bereichs der IHZ (links) und schematische Darstellung (rechts). **C**, Eigenständige supranukleäre BK-Expression in der MIP des basolateralen Bereichs der IHZ (links) und schematische Darstellung (rechts). Diese Beobachtung wurde für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen

Pols einer IHZ. Zur Vereinheitlichung wurde das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis dargestellt. 63 x Öl-Objektiv, Maßstabsbalken: 15 µm.

Die drei Darstellungen bilden jeweils verschiedene Schichten aus der *MIP* eines Corti-Organs mit fünf IHZ mit blau gefärbten Zellkernen ab (Abb. 17). In Aufnahme A wird die charakteristische Färbung für BK am Hals der drei exemplarisch dargestellten IHZ sowie die Färbung für den *Tight Junction* Marker Claudin-14 im apikalen Teil der IHZ sowie in den apikalen Platten der Pfeilerzellen gemeinsam dargestellt. Im apikalen Teil der Stapelaufnahme (B) ist hauptsächlich die Claudin-14-Färbung, die oberhalb der IHZ und an den Membranen der Pfeilerzellen zu erkennen ist, abgebildet. Die charakteristische clusterförmige BK-Färbung wurde vornehmlich im basolateralen Bereich der IHZ (C) der Stapelaufnahme und damit unterhalb der *Tight Junctions* sichtbar. Dieses Ergebnis demonstriert, dass der Ausstrom von K⁺-Ionen durch BK-Kanäle in das Kompartiment der K⁺-armen Perilymphen erfolgt, wofür es eine große treibende Spannung für K⁺-Ionen gibt.

3.1.4 Lokalisation von BK- und Ca_v1.3-Kanälen

Bei Vögeln und Reptilien erfolgt die Frequenzkodierung elektrisch über die Kopplung des Calcium-Einstroms durch die spannungsgesteuerten Calciumkanäle Ca_v1.3 mit der Aktivierung der BK-Kanäle in Haarzellen. Dieser Mechanismus („electric ringing“) begrenzt die Kodierung von Hörfrequenzen auf maximal 3 kHz. Bei Säugetieren hingegen erfolgt die Frequenzkodierung durch die mechanische Abstimmung der Basilmembran, was eine Ausweitung des Frequenzbereichs auf bis zu 150 kHz ermöglichte (Duncan und Fuchs, 2003). Die Aktivierung der BK-Kanäle von IHZ erfolgt in Säugetieren bei ungefähr -75 mV und ist weitestgehend unabhängig von extrazellulärem Ca²⁺-Einstrom durch Ca_v1.3-Kanäle (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Die Studie von (Marcotti et al., 2004) zeigte, dass nach der weitgehenden Blockierung der Ca_v1.3-Kanäle mit Nifedipin ein kleiner Ca²⁺-sensitiver K⁺-Strom übrig bleibt.

Um die subzelluläre Verteilung von BK-Kanälen in den IHZ und deren potentielle Kopplung an verschiedene intrazelluläre Ca²⁺-Quellen aufzuklären, wurden die Corti-Organe 18 bzw. 19 Tage alter NMRI-Mäuse mit Antikörpern gegen BK- und Ca_v1.3-Kanäle sowie gegen den Ribbon-Synapsen-Marker CtBP2 (RIBEYE) und den Marker für das endoplasmatische Retikulum, Sec62, gefärbt (Abb. 18-20).

Zur Analyse der subzellulären Anordnung der BK-Kanäle wurden die Corti-Organe 19 Tage alter NMRI-Mäuse mit einem BK-Antikörper simultan (A), in Kombination mit einem CtBP2-Antikörper oder allein gefärbt (B; Abb. 18).

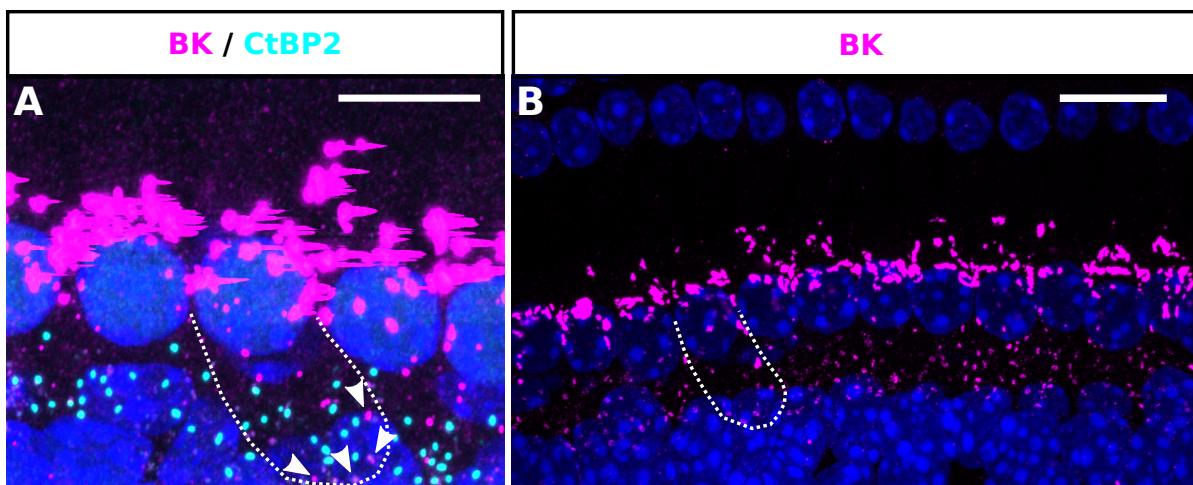


Abbildung 18: Unterschiedliche Expressionsstärke von BK-Kanälen im basolateralen Teil unterhalb der *Tight Junctions* von IHZ von NMRI-Mäusen

A, MIP einer immunhistochemischen Färbung von 3 IHZ eines *whole mount* Corti-Organs einer 19 Tage alten NMRI-Maus. Expression von BK-Kanälen (markiert mit Kaninchen-anti-BK, lila) im Halsbereich sowie von Ribbons (markiert mit Maus-anti-CtBP2/RIBEYE) am synaptischen Pol der IHZ. Mehrere kleinere BK-positive Punkte (Pfeilspitzen) am synaptischen Pol, dadurch apikal beim BK-Signal am Hals der IHZ Artefakte durch Sättigung des Photomultipliers des LSM durch bewusst hohe Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen bestätigt. **B**, MIP einer immunhistochemischen Färbung von 10 IHZ der medialen Windung eines *whole mount* Corti-Organs einer 19 Tage alten NMRI-Maus. Clusterförmige Expression von BK-Kanälen (markiert mit Maus-anti-BK, lila) am Hals und punktförmige Expression von BK-Kanälen am synaptischen Pol von IHZ. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. Zur Vereinheitlichung wurde das mit AF488-aufgenommenen Fluorophor in lila dargestellt (B). 63 x Öl-Objektiv, Maßstabsbalken: 15 µm.

Dargestellt sind zwei Ausschnitte einer MIP eines Corti-Organs mit drei beziehungsweise elf IHZ mit blau gefärbten Zellkernen (Abb. 18). Am Hals der IHZ sind die für diese Altersstufe charakteristischen BK-Cluster sowie am basalen Zellpol der IHZ die charakteristischen Ribbon-Synapsen deutlich zu erkennen (A). Die in diesem Experiment absichtlich hervorgerufene Verstärkung des Fluoreszenzsignals bewirkte nicht nur Überstrahlungsartefakte durch eine Sättigung der Photomultiplier beim BK-Signal im Halsbereich der IHZ, sondern hatte auch zur Folge, dass mehrere kleinere BK-positive Punkte am synaptischen Pol sichtbar wurden. In einem Einzelbefund in einer MIP einer BK-Einzelkanalfärbung einer medialen Windung erkennt man ohne Fluoreszenzsignal-Verstärkung sowohl die clusterförmige Expression von BK-Kanälen am Hals der IHZ als auch deren punktförmige Expression am synaptischen Pol (B). In den folgenden Experimenten wurden weiterhin apikale Windungen für immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Weitere Analysen an medialen Windungen wurden nicht durchgeführt.

Nach dem Nachweis der Expression von BK-Kanälen am synaptischen Pol von IHZ wurde weitergehend untersucht, ob die kleineren BK-positiven Punkte in der Nähe der schnell aktivierenden spannungsabhängigen Calciumkanäle des Typs $\text{Ca}_v1.3$ exprimiert sind. Diese sind nach der Depolarisation der IHZ für einen Calcium-Einstrom verantwortlich (Platzer et al., 2000), der an den benachbart liegenden Synapsen die Ausschüttung des Transmitters Glutamat bewirkt (Fuchs et al., 2003; Puel, 1995; Ruel et al., 1999). Es wird außerdem vermutet, dass IHZ zwei verschiedene Pools von BK-Kanälen exprimieren, da diese zwar unabhängig vom extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle sind, aber bei der weitgehenden Blockierung der $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle mit Nifedipin ein kleiner Ca^{2+} -sensitiver K^+ -Strom übrig bleibt (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Somit lag die Vermutung nahe, dass der $\text{Ca}_v1.3$ -vermittelte Calcium-Einstrom eine Auswirkung auf die Aktivierung eines Teils der BK-Kanäle haben könnte. Zur Analyse der Kolokalisation von BK-Kanälen und der am basalen Pol exprimierten $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle wurden Corti-Organe 18 Tage alter NMRI-Mäuse simultan mit BK- und $\text{Ca}_v1.3$ -Antikörpern gefärbt (Abb. 19).

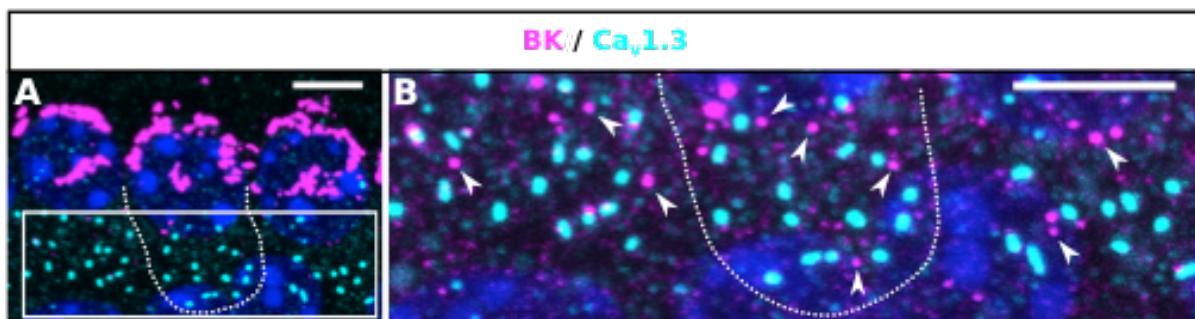


Abbildung 19: Lokalisation von BK- und $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in IHZ von NMRI-Mäusen

MIP einer immunhistochemischen Färbung von 3 IHZ eines *whole mount* Corti-Organs einer 18 Tage alten NMRI-Maus. **A**, Expression von BK-Kanälen (markiert mit Maus-anti-BK, lila) im Halsbereich sowie $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen (markiert mit Kaninchen-anti- $\text{Ca}_v1.3$) am synaptischen Pol von IHZ. **B**, Durch Verstärkung des Fluoreszenzsignals werden mehrere kleine BK-positive Punkte (Pfeilspitzen) in der Nähe von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen am synaptischen Pol der IHZ sichtbar, sind jedoch nicht mit ihnen kolokalisiert. Diese Beobachtung wurde für diese Altersstufe an mindestens 3 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. Zur Vereinheitlichung wurde das mit AF488-aufgenommenen Fluorophor in lila dargestellt und das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 μm .

Die Abbildungen (Abb. 19) zeigen zum einen den Ausschnitt einer MIP eines Corti-Organs mit drei IHZ und zum anderen die Vergrößerung des synaptischen Bereichs der IHZ mit blau gefärbten Zellkernen. Die dargestellten inneren Haarsinneszellen zeigen charakteristisch sowohl die clusterförmigen BK-Kanäle am Hals als auch $\text{Ca}_v1.3$ -positive Punkte am synaptischen Pol (A). Im vergrößerten und mit höherer Intensität aufgenommenen Ausschnitt des basalen Bereichs der IHZ waren punktförmige Färbungen sowohl für BK-Kanäle als auch für $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle zu erkennen (B). Zwar lagen vereinzelte Punkte beider Signale nahe beieinander, es war jedoch keine Kolokalisation auszumachen. Dieser Versuchsteil bestätigt,

dass im Gegensatz zu anderen Wirbeltieren, in denen BK-Kanäle mit präsynaptischen, bei negativen Spannungen aktivierenden spannungsabhängigen Calciumkanälen des Typs $\text{Ca}_v1.3$ am synaptischen Pol kolokalisieren, die BK-Kanäle in der Cochlea von Säugetieren überwiegend extrasynaptisch am Hals der IHZ lokalisiert sind (Pyott, 2004). Die kleine Population von BK-Kanälen am synaptischen Pol (Hafidi et al., 2005) zeigt darüber hinaus keine Kolokalisation mit $\text{Ca}_v1.3$ Kanälen.

Da BK-Kanäle am synaptischen Pol nicht mit $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen kolokalisieren, wurden zusätzlich intrazelluläre Calcium-Speicher, wie das endoplasmatische Retikulum, als potentielle Ca^{2+} -Quellen untersucht. Dazu wurden die Corti-Organe 18 Tage alter NMRI-Mäuse simultan mit dem BK-Antikörper und dem ER-Marker Sec62 gefärbt (Abb. 20).

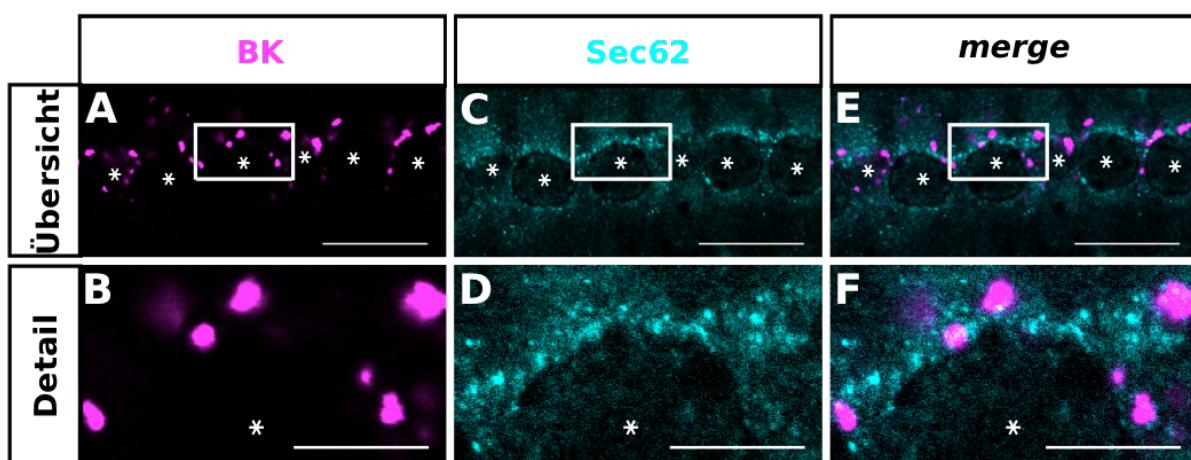


Abbildung 20: Lokalisation von BK-Kanälen und dem ER-Marker Sec62 in IHZ von NMRI-Mäusen

Einzelner optischer Schnitt einer immunhistochemischen Doppelfärbung 6 IHZ eines *whole mount* Corti-Organs einer 18 Tage alten NMRI-Maus als Übersicht (A, C, E) und Vergrößerung (B, D, F). **A, B**, Clusterförmige Färbung der BK-Kanäle (markiert mit Maus-anti-BK, türkis) am Hals der IHZ. **C, D**, Diffuse ER-Färbung (markiert mit Kaninchen-anti-Sec62) um den kompletten Zellkern mit stärkster Ausprägung oberhalb des Zellkerns. **E, F**, Keine eindeutige Kolokalisation von BK-Kanälen mit dem Protein Sec62 oberhalb des Zellkerns. Diese Beobachtung wurde für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen bestätigt. Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. 63 x Öl-Objektiv, Maßstabsbalken: 15 µm, Sterne markieren die Zellkerne der IHZ.

Die Darstellungen zeigen ein Einzelbild sowie einen vergrößerten Ausschnitt oberhalb der Kernregion eines Corti-Organs mit sechs IHZ (Abb. 20). Der Ausschnitt des Einzelbildes zeigte eine clusterförmige Färbung der BK-Kanäle am Hals der IHZ (A, B), die mit der diffusen Sec62-Färbung oberhalb des Zellkerns (C, D) keine eindeutige Überlappung aufwies (E, F). Die kleineren ER-positiven Punkte unterhalb des Kerns lagen im Gegensatz dazu nicht in der Nähe von BK-Kanälen. Eine eindeutige Gegenüberstellung beider Proteine in der ER- bzw. Plasmamembran war somit nicht auszumachen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde somit gezeigt, dass die verwendeten BK-Antikörper spezifisch ihr Antigen in den inneren Haarsinneszellen von Mäusen erkennen. Bestätigt wurde auch die altersabhängige Expression von BK-Kanälen, die durch eine clusterförmige BK-Färbung im Halsbereich sowie eine punktförmige BK-Färbung am synaptischen Pol der IHZ sichtbar wird. Neu wurde belegt, dass BK-Kanäle weder mit Ca_v1.3-Kanälen am synaptischen Pol der IHZ noch eindeutig mit dem ER direkt gegenüber liegen.

3.2 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in Corti-Organen und inneren Haarsinneszellen vor und nach Hörbeginn

In heterologen Expressionssystemen ohne nennenswerten Ca²⁺-Einstrom aktivieren BK-Kanäle nicht unter +100 mV (Thurm et al., 2005), sofern nicht bestimmte Mitglieder der LRRC-Proteinfamilie anwesend sind und als regulatorische γ-Untereinheiten BK-Kanäle von spannungs- und calciumabhängigen in rein spannungsabhängige Kaliumkanäle transformieren (Yan und Aldrich, 2010, 2012). In dieser Studie wurde gezeigt, dass LRRC26 die Aktivierung der BK-Kanäle in HEK-293-Zellen um 140 mV in Richtung negativer Potentiale verschiebt. Auch LRRC52 bewirkt eine Verlagerung des Aktivierungspotentials von -100 mV. Die folgenden Versuche (s. Kap. 3.2) sollten Aufschluss über das Vorkommen von LRRC26- und LRRC52-mRNA in Corti-Organen und IHZ von Mäusen verschiedener Altersstufen sowie unterschiedlicher Genotypen geben.

Mit Hilfe der *nested Reverse Transkriptase-PCR* (RT-PCR) sollte belegt werden, ob die mRNA von LRRC26 und LRRC52 in Corti-Organen und IHZ vorhanden ist. Dazu wurde die cDNA mittels *Reverser Transkriptase* aus der mRNA von entsprechenden Mausgeweben synthetisiert. Hierbei ist anzumerken, dass Corti-Organe aus zwei oder vier verschiedenen Ohren einer bzw. zweier Mäuse zu einer Einzelprobe vereint wurden. Bei den IHZ-Proben wurden jeweils ungefähr 40-120 Zellen gesammelt und etwa 4-10 IHZ für die PCR verwendet. Als Referenzgewebe wurde Speicheldrüsengewebe für LRRC26 und Hodengewebe für LRRC52 eingesetzt. Aus beiden Gewebstypen wurde nach deren Homogenisierung ebenfalls die cDNA umgeschrieben. Für die Referenzproben und die Corti-Organe wurden Negativkontrollen zur Überprüfung der Umschreibung mitgeführt. Hierzu wurde ein Teil der isolierten RNAs ohne *Reverse Transkriptase* (RT) inkubiert, sodass keine cDNA synthetisiert werden sollte. Als Negativkontrolle für die IHZ wurde die Badlösung (B-41), die während der Gewinnung der IHZ verwendet wurde, eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass die Menge an abgesaugten Haarzellen relativ gering war, wurde für jedes Transkript eine *nested PCR* durchgeführt. Diese wird durch zwei nacheinander geschaltete PCRs, bei denen das PCR-Produkt aus der 1. PCR als Matrize für die 2. PCR dient, definiert und stellt ein hochsensitives Verfahren dar. Somit mussten für jedes nachzuweisende Gen

mindestens zwei Primerpaare synthetisiert werden, wobei die *nested* Primer hierbei im Sequenzbereich des 1. PCR-Produkts hybridisieren. Die Detektion der Produkte aus der 1. PCR erfolgte auf einem 1,5 %-igen Agarosegel (526 bp bis 794 bp), die Produkte aus der 2. PCR auf einem 3 %-igen (134 bp bis 426 bp; detaillierte Auflistung in Material und Methoden, Kap. 2.7.9).

In den folgenden Versuchen zur Transkriptanalyse (s. Kap. 3.2.1 bis 3.2.7) sind jeweils nur die Ergebnisse der *nested RT-PCR* (2. PCR) nach gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt, da nach der 1. PCR meist nur für die Positivkontrolle ($\text{Ca}_v1.3$) sowie für die Referenzgewebe (Speicheldrüse, Hoden) Signale sichtbar wurden.

3.2.1 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen

Die folgenden beiden Abbildungen (Abb. 21, 22) zeigen das Ergebnis der PCR zur Überprüfung von LRRC26-mRNA in ausgereiften Corti-Organen von ca. drei Wochen alten NMRI-Mäusen. Als Referenzgewebe wurde Speicheldrüsengewebe von ca. drei Wochen alten NMRI-Mäusen verwendet. Aufgrund seiner geringen Intron-Größe (76 bp) und der damit verbundenen Schwierigkeit der Bestimmung der PCR-Produktgröße wurden für LRRC26 sechs verschiedene Primerpaare getestet. „LRRC26“ beschreibt das PCR-Produkt, welches durch den Einsatz der in der Studie von (Evanson et al., 2014) verwendeten Primer gebildet wird (366 bp). Da hier sowohl der *sense* als auch der *antisense* Primer an Sequenzen im gleichen Exon (s. Material und Methoden, Kap. 2.7.8.1.2, Abb. 2, Exon 1) hybridisieren, war es nicht möglich, zwischen genomischer DNA (gDNA) und revers-transkribierter cDNA (mRNA-Nachweis) zu unterscheiden. Anhand der Größen der PCR-Produkte auf dem Agarosegel konnte dagegen bei der Verwendung der Primer, die das PCR-Produkt „LRRC26_1“ (cDNA: 222 bp, gDNA: 298 bp) oder „LRRC26_2“ (cDNA: 205 bp, gDNA: 281 bp) hervorbringen, zwischen gDNA und cDNA unterschieden werden. Das PCR-Produkt „LRRC26_In“ wird von einem Primerpaar gebildet, dessen *antisense* Primer in der Intron-Sequenz bindet, und stellte somit lediglich genomische DNA (150 bp) dar. Die beiden Primerpaare, welche die PCR-Produkte „LRRC26 ex_ex“ (168 bp) und „LRRC26 ex_ex_2“ (174 bp) hervorbringen, wiesen ausschließlich cDNA nach. Als interne PCR-Kontrolle und zum Nachweis der IHZ wurden zusätzlich $\text{Ca}_v1.3$ -Primer eingesetzt, die ein 426 bp-großes PCR-Produkt bilden (Michna et al., 2003).

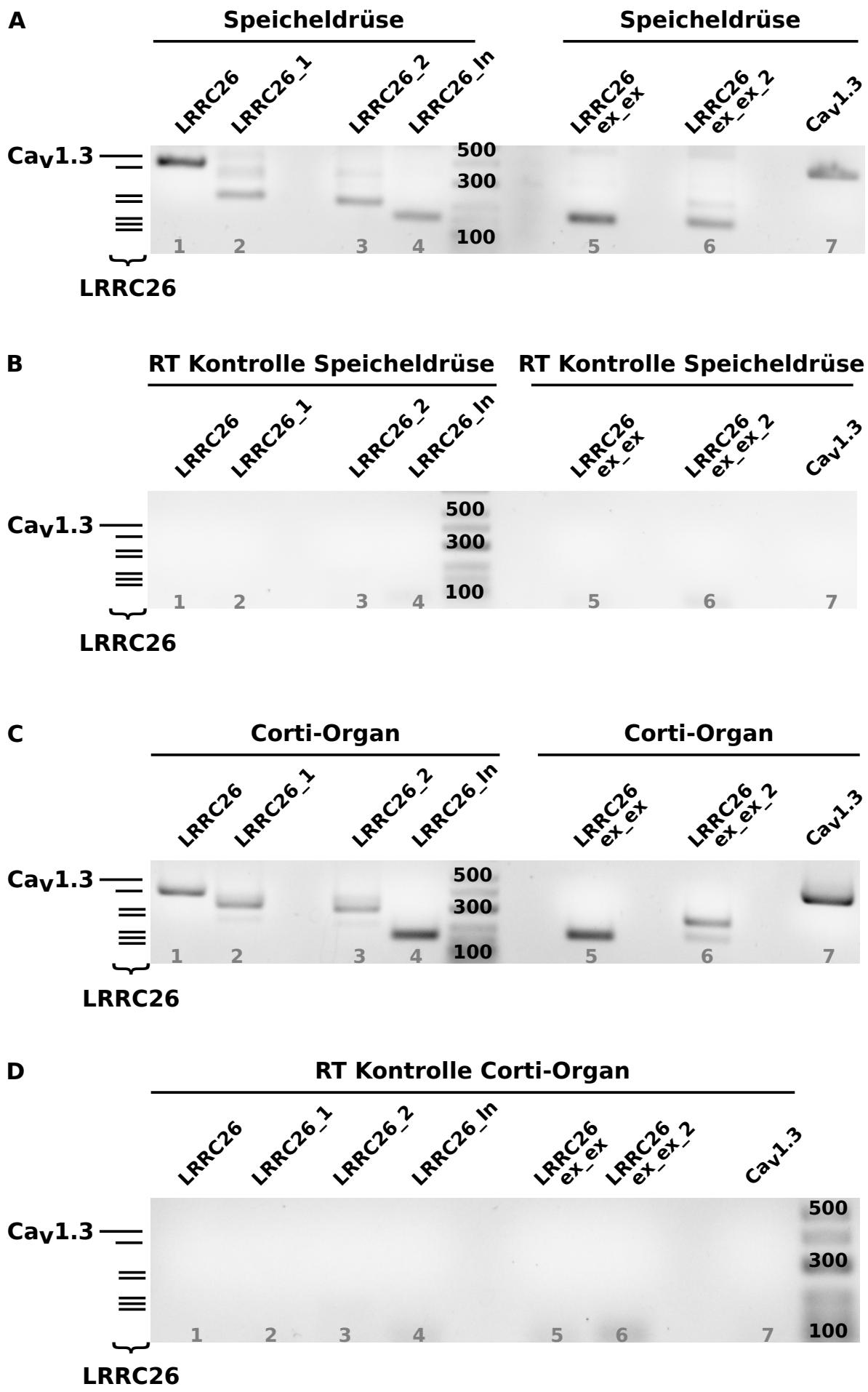


Abbildung 21: Nachweis von LRRC26-Transkripten in Speicheldrüsengewebe und ausgereiften Corti-Organen von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT-PCR* zur LRRC26-Transkriptanalyse in Speicheldrüsenreferenzgewebe und Corti-Organen 3 Wochen alter NMRI-Mäuse. **A, C**, Amplifikation von mit verschiedenen Primerpaaren nachgewiesenen LRRC26-Transkripten (A, C, Spalten: 1, 366 bp; 2, 222 bp; 3, 205 bp, 4, 150 bp; 5, 168 bp und 6, 174 bp) sowie Ca_v1.3 als Positivkontrolle (A, C, 7. Spalte, 426 bp) in Speicheldrüsengewebe (A) und im Corti-Organ (C). **B, D**, Keine Signale für die Amplifikation von LRRC26 und Ca_v1.3 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne *RT*, keine cDNA; 1.-7. Spalten). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 4 Individuen bestätigt.

Die Ergebnisse der *nested PCR* zeigten sowohl in der Probe des Speicheldrüsengewebes (A) als auch in den vereinten Corti-Organ-Proben (C) spezifische Signale mit den potentiell erwarteten Größen bei der Verwendung aller Primerpaare (Abb. 21). In den Spuren 1 von A und C waren jeweils PCR-Produkte mit einer Größe von etwa 366 bp deutlich zu erkennen. Diese stellen aufgrund der Primer, die nicht zwischen gDNA und revers-transkribierter cDNA (mRNA) unterscheiden, keinen eindeutigen Nachweis für das Vorhandensein von LRRC26-Transkripten in beiden Geweben dar. Die jeweiligen weniger intensiven Signale in A und C in den 2. Spuren von ungefähr 222 pb und in den 3. Spuren von etwa 205 bp wiesen auf die mRNA von LRRC26 in der Speicheldrüse und im Corti-Organ hin. Die jeweils 4. Spuren in A und C zeigten ein weiteres deutliches Signal für das PCR-Produkt mit einer Größe von ungefähr 150 bp, welches für das Vorliegen genetischer DNA spricht. In den Spuren 5 von A und C waren jeweils die PCR-Fragmente mit einer Größe von etwa 168 bp deutlich zu erkennen und belegten das Vorkommen von LRRC26-mRNA in beiden Gewebstypen. In den 6. Spuren von A und C waren jeweils schwächere Signale mit einer Größe von ungefähr 174 bp sowie intensiver gefärbte Signale von etwa 250 bp zu detektieren. In beiden Gewebstypen konnten zudem Ca_v1.3-Transkripte in den jeweiligen 7. Spuren von A und C als interne PCR-Kontrollen nachgewiesen werden. Die Transkriptionskontrollen, *RT* Kontrolle Speicheldrüse (B) und *RT* Kontrolle Corti-Organ (D), wiesen in den Spuren 1 bis 7 ebenfalls keine Signale bei der Nutzung aller Primerpaare auf.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Umschreibung der mRNA in cDNA sowohl für das Speicheldrüsengewebe als auch für die vereinten Corti-Organe erfolgreich war. Es bleibt anzumerken, dass trotz des DNA-Verdaus während der RNA-Isolation weder die Speicheldrüsen- noch die Corti-Organ-Präparationen frei von gDNA waren und daher die Wahl der richtigen Primerpaare von entscheidender Bedeutung war.

In der folgenden Abbildung (Abb. 22) ist das Ergebnis der Negativkontrolle der PCR (H_2O) aus Abbildung 21 dargestellt.

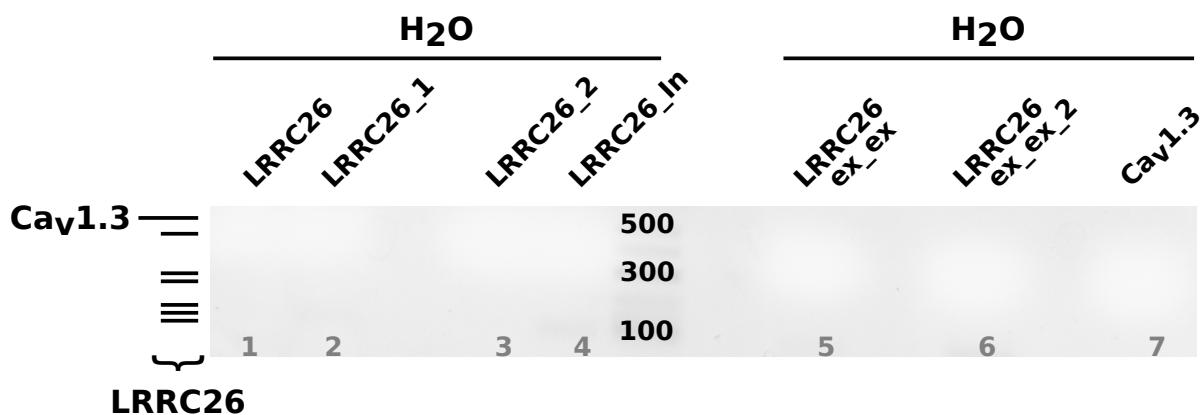


Abbildung 22: Überprüfung der *nested* RT-PCR zur LRRC26- und Ca_v1.3-Transkriptanalyse

Original-Gelbild der *nested* RT-PCR der Negativkontrolle der PCR aus Abb. 21. Keine Signale für die Amplifikation von LRRC26- und Ca_v1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der *nested* RT-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; 1.-7. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 4 Individuen bestätigt.

Diese Abbildung (Abb. 22) zeigt die geelektrophoretisch aufgetrennten Ergebnisse der *nested* RT-PCR für die Negativkontrolle der PCR aus Abbildung 21. Für keines der verwendeten Primerpaare waren Signale in den Spuren 1 bis 7 zu detektieren, was auf einen gelungenen Ablauf der PCR hindeutete.

Die Ergebnisse der Abbildungen 21 und 22 belegen, dass LRRC26-Transkripte nicht nur im Referenzgewebe, sondern auch in Corti-Organen vorhanden waren. In den folgenden Experimenten wurden schließlich nur noch drei verschiedene Primerpaare eingesetzt: das Primerpaar aus der Evanson-Studie (LRRC26) sowie die beiden Primerpaare, welche zum einen lediglich die genomische DNA (LRRC26_In) sowie zum anderen ausschließlich und eindeutig nur mRNA (LRRC26_ex_ex) nachweisen.

Im zweiten Teil der Transkriptanalysen sollte das Vorkommen von LRRC52-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von ca. drei Wochen alten NMRI-Tieren analysiert werden (Abb. 23). Als Referenzgewebe wurde Hodengewebe von ca. drei Wochen alten NMRI-Mäusen verwendet. Bei LRRC52 war es nicht notwendig mehrere Primerpaare zu testen, da das Intron fast 20 kb groß ist und die geelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte somit eindeutig zugewiesen werden konnten. Somit wurden für die 2. PCR nur ein *sense* und zwei *antisense* Primer synthetisiert, die sich in ihren Ergebnissen unterstützen sollten. Ein mögliches PCR-Produkt, nachfolgend benannt mit „LRRC52“, wird durch zwei Primer gebildet, die jeweils an Sequenzen in den beiden unterschiedlichen Exons hybridisieren (314 bp). Die Verwendung des unterstützenden zweiten *antisense* Primers, der die Exon-Exon-Grenze der Gensequenz überspannt, führt zur Bildung eines zweiten PCR-Produkts, das im weiteren Verlauf mit „LRRC52 ex_ex“ bezeichnet wird (134 bp). Die Nutzung beider Primerpaare weist somit ausschließlich spezifische Signale für die in der

Zelle vorliegenden mRNAs von LRRC52 nach. Ca_v1.3-Primer nach Michna et al. wurden erneut als interne PCR-Kontrolle (PCR-Produkt: 426 bp) verwendet (Michna et al., 2003).

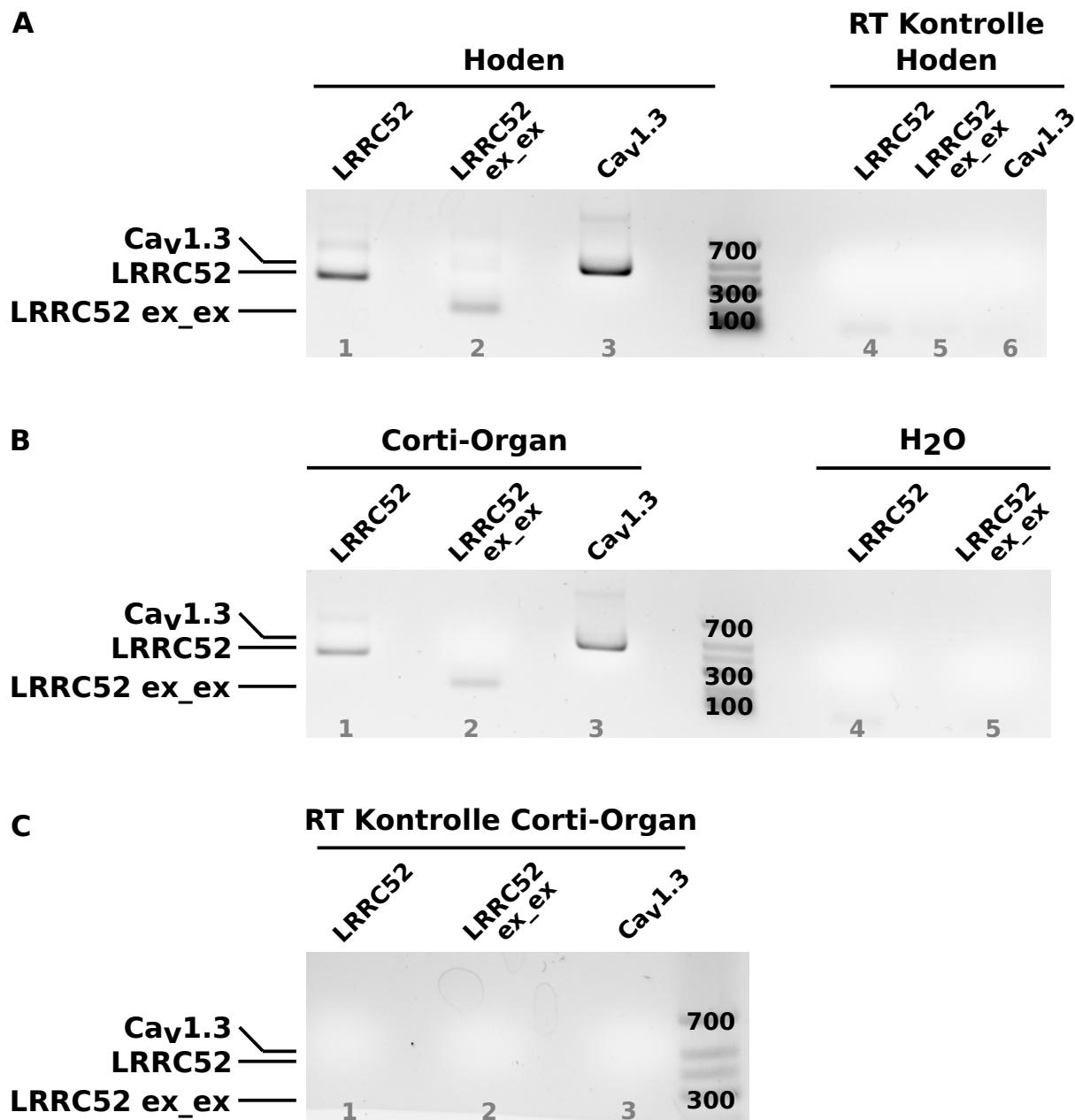


Abbildung 23: Nachweis von LRRC52-Transkripten in Hodengewebe und ausgereiften Corti-Organen von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested* RT-PCR zur LRRC52-Transkriptanalyse in Hodengewebe als Referenz und Corti-Organen 3 Wochen alter NMRI-Mäuse. **A, links, B, links**, Amplifikation von mit zwei verschiedenen Primerpaaren nachgewiesenen LRRC52-Transkripten (A, B, Spalten: 1, 314 bp; 2, 134 bp) sowie Ca_v1.3-Transkripten als intrinsische Kontrollen (A, B, 3. Spalte, 426 bp) im Hodengewebe (A) und im Corti-Organ (C). **A, rechts, C**, Keine Signale für LRRC52 und Ca_v1.3 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne RT, keine cDNA; A, 4.-6. Spalte, C, 1.-3. Spalte). **B, rechts**, Keine Amplifikation von LRRC52- und Ca_v1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der *nested* RT-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; 4.+5. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 5 Individuen bestätigt.

Das Hodengewebe (A, links) und die vereinten Corti-Organe (B, links) wiesen spezifische Signale mit den potentiell erwarteten Größen bei der Verwendung beider LRRC52-Primerpaare auf. Die ersten Spuren (A, links und B, links) zeigten jeweils PCR-Produkte für LRRC52 mit einer Größe von 314 bp für beide Gewebstypen. In den jeweiligen zweiten Spuren von A und B ließen sich ebenfalls Signale für LRRC52-Transkripte (134 bp), die mit dem zweiten LRRC52-Primerpaar gebildet wurden, im Hoden sowie in den Corti-Organen erkennen. Beide stellen einen eindeutigen Nachweis für das Vorkommen von LRRC52-Transkripten in beiden Gewebstypen dar. Die internen PCR-Kontrollen wiesen in den jeweiligen 3. Spuren von A und B sowohl im Hodengewebe als auch den Corti-Organen Transkripte für Ca_v1.3 auf (A, links und B, links). In den Transkriptionskontrollen, *RT* Kontrolle Hoden (A, rechts) und *RT* Kontrolle Corti-Organ (C), waren ebenfalls keine Signale in den Spuren 4, 5 und 6 in A und in den Spuren 1, 2 und 3 in C bei der Nutzung aller drei Primerpaare zu erkennen. Auch die Negativkontrollen der PCR zeigten bei der Verwendung beider Primerpaare keine PCR-Fragmente (H_2O als *Template*, B, rechts) in den Spuren 4 und 5.

Es lässt sich festhalten, dass sowohl die Transkription der mRNA in cDNA für Hodengewebe und Corti-Organe sowie auch die PCR insgesamt funktioniert hat. Sowohl in den jeweiligen Referenzgeweben als auch in den ausgereiften Corti-Organen konnte LRRC26- und LRRC52-mRNA detektiert werden. Ob alle verwendeten Primerpaare spezifisch an ihre komplementären Sequenzen der revers-transkribierten cDNAs binden und damit die entsprechend gewünschten Transkripte nachweisen, sollte im folgenden Versuchsteil analysiert werden.

3.2.2 Überprüfung von LRRC26-, LRRC52- und BK-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen

Um sicher zu stellen, dass die synthetisierten Primer, die zur Transkriptanalyse von LRRC26, LRRC52 und Ca_v1.3 verwendet wurden, die vorgesehenen DNA-Sequenzen der cDNA nachweisen, wurden die entsprechend amplifizierten PCR-Produkte aus der 1. und 2. PCR, wie in Kapitel 2.7.9 beschrieben, nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung (Fa. SeqLab) geschickt. Auch die für die BK-Transkriptanalyse (s. Kap. 3.2.5.1) verwendeten Primerpaare wurden auf ihre Spezifität hin untersucht. Damit die DNA-Konzentrationen der zu analysierenden Produkte den Anforderungen der Firma SeqLab entsprach, wurde der *nested* PCR-Ansatz von einem Volumen von 20 µl auf 50 µl hochskaliert. Die Analyse erfolgte für jedes zu analysierende PCR-Produkt in zweifacher Ausführung.

Nachfolgend ist exemplarisch das Ergebnis der Sequenzierung durch einen Ausschnitt eines Elektropherogramms eines sequenzierten PCR-Produkts von LRRC52, welches im Corti-Organ drei Wochen alter NMRI-Mäuse detektiert wurde, abgebildet (Abb. 24).

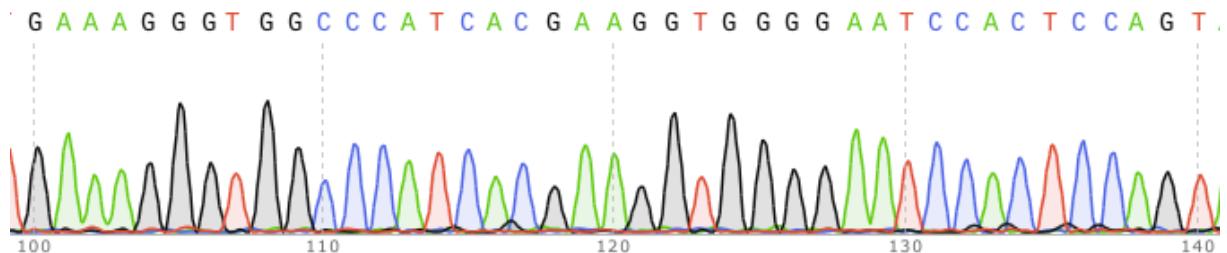


Abbildung 24: Sequencerelektropherogramm des amplifizierten LRRC52 PCR-Produkts im Corti-Organ nach der *nested* PCR

Die aufeinanderfolgenden Ausschläge bilden die vier verschiedenen Nukleotide in unterschiedlichen Farben ab (A: grün, T: rot, G: schwarz, C: blau). Die Nummerierung auf der Abszisse stellt die Basenanzahl des sequenzierten Produktes dar. Diese Beobachtung wurde für dieses PCR-Produkt für 2 verschiedene Reaktionen bestätigt.

Die von der Firma Sequence Laboratories bereitgestellten Sequenzierungselektropherogramme wurden *in silico* mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* der NCBI-Homepage mit den entsprechenden bioinformatischen Sequenzen (hier von LRRC52) in *sense* und *antisense* Richtung verglichen. In der folgenden Abbildung (Abb. 25) ist exemplarisch der Vergleich beider LRRC52-Sequenzen mit Hilfe der *SnapGene Viewer* Software visualisiert.

Query	627	ATGCAACTGCTCCTTCTGGACTTCACCATCCACTTATTAGTGTCCCATAATGGACCACCC	686
Sbjct	1	ATGCANCTGCTCCTTCTGGACTTCACCATCCACTTATTAGTGTCCCATAATGGACCACCC	60
Query	687	AGATGCCAGAACGCCACGTGTACGGAGCCTGCTGAGCTGAAAGGGTGGCCATCACGAA	746
Sbjct	61	AGATGCCAGAACGCCACGTGTACGGAGCCTGCTGAGCTGAAAGGGTGGCCATCACGAA	120
Query	747	GGTGGGAATCCACTCCAGTACATGTGCATCACACACCTGGACCAGCAGGACTACATCTT	806
Sbjct	121	GGTGGGAATCCACTCCAGTACATGTGCATCACACACCTGGACCAGCAGGACTACATCTT	180
Query	807	CTTACTGCTCATCGGTTCTGCATCTCGCTGCCGGCACGGTGGCTGCCCTGGCTCACGGG	866
Sbjct	181	CTTACTGCTCATCGGTTCTGCATCTCGCTGCCGGCACGGTGGCTGCCCTGGCTCACGGG	240
Query	867	TGTATGTGCTGT	878
Sbjct	241	TGTATGTGCTGT	252

Abbildung 25: Überprüfung der LRRC52-Sequenzierungsergebnisse mit dem Programm *Standard Nucleotide BLAST*

Die jeweils obere Zeile stellt einen Teil (627-878 nt) der Nukleotidsequenz der LRRC52 mRNA dar (Query). Die jeweils untere Zeile zeigt die sequenzierte Nukleotidsequenz (1-252) des amplifizierten LRRC52 PCR-Produkts nach der *nested* PCR (Sbjct). IUPAC Nukleotid-Code der Firma SeqLab, N: Platzhalter für jede Base.

Der Vergleich beider LRRC52 Sequenzen zeigte eine weitestgehende Übereinstimmung aller Basen (Abb. 25). Nur an einer Stelle des amplifizierten und sequenzierten

PCR-Produkts für LRRC52 wurde anstelle der Base Adenin eine Base mit der Bezeichnung „N“ visualisiert. Laut dem IUPAC Nukleotid-Code der Firma SeqLab fungiert dieser Buchstabe jedoch als Platzhalter für eine der vier möglichen Basen und stellte somit keinen Ausschluss der Base Adenin dar. Die Konformität der beiden Sequenzen betrug in diesem Fall 99 % und konnte somit bestätigt werden. Die Sequenzierung des *nested* PCR-Produkts von LRRC52 belegte demnach die Spezifität der synthetisierten und in der Transkriptanalyse verwendeten LRRC52 Primer. Für alle Primerpaare (LRRC26, LRRC52, Ca_v1.3, BK) wurden jeweils zwei der entsprechenden daraus resultierenden PCR-Produkte sequenziert. Die *in silicio* Vergleiche dieser Sequenzierungsergebnisse mit den entsprechenden bioinformatischen Sequenzen lieferten ebenfalls eine Übereinstimmung von 95-100 %. Somit detektierten alle in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare ihre vorgesehenen DNA-Sequenzen spezifisch.

3.2.3 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in unreifen Corti-Organen von Wildtyp-Mäusen

Aufgrund der entwicklungsabhängigen Veränderungen der HZ und der damit verbundenen altersabhängigen Expression von BK-Kanälen ist es von Interesse, herauszufinden, ob das Vorkommen potentieller neuer BK-γ-Untereinheiten in den IHZ an die Expression der BK-Kanäle gekoppelt ist oder ob die mRNA-Transkripte der beiden potentiellen akzessorischen LRRC-Proteine schon in neonatalen IHZ und damit schon vor BK-Expression, vorhanden sind. Nachdem sowohl LRRC26- als auch LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von NMRI-Mäusen nachgewiesen wurden, galt es somit zu untersuchen, ob diese auch in unreifen Corti-Organen von 5 bzw. 6 Tage alten NMRI-Mäusen vorliegen.

Bei der Präparation der Corti-Organe wurde bestmöglich darauf geachtet, dass keine Neurone in die Proben gelangten. Hierzu wurde der Haarzellbereich mit feinen Pinzetten mikropräparatorisch unter einem hochauflösenden Binokular sorgfältig vom Rest des Gewebes (Modiolus, laterale Wand) separiert und jeweils zwei bzw. vier Corti-Organe zusammengeführt. Da die neonatale Cochlea sehr kompakt aufgebaut ist muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass eine Kontamination mit peripheren Dendriten der Spiralganglien-Neurone nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass für alle folgenden Transkriptanalysen (s. Kap. 3.2.3 bis 3.2.7) jeweils die entsprechenden Referenzgewebe (Speicheldrüse für LRRC26, Hoden für LRRC52) als Primerkontrollen mitgeführt, jedoch nicht abgebildet wurden. Dies war nicht notwendig, da im weiteren Verlauf nur Ergebnisse gezeigt werden, bei denen diese Kontrollen spezifisch sowie ihre Transkriptionskontrollen sauber waren.

Die folgende Abbildung (Abb. 26) zeigt das Ergebnis der PCR zur Überprüfung von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen.

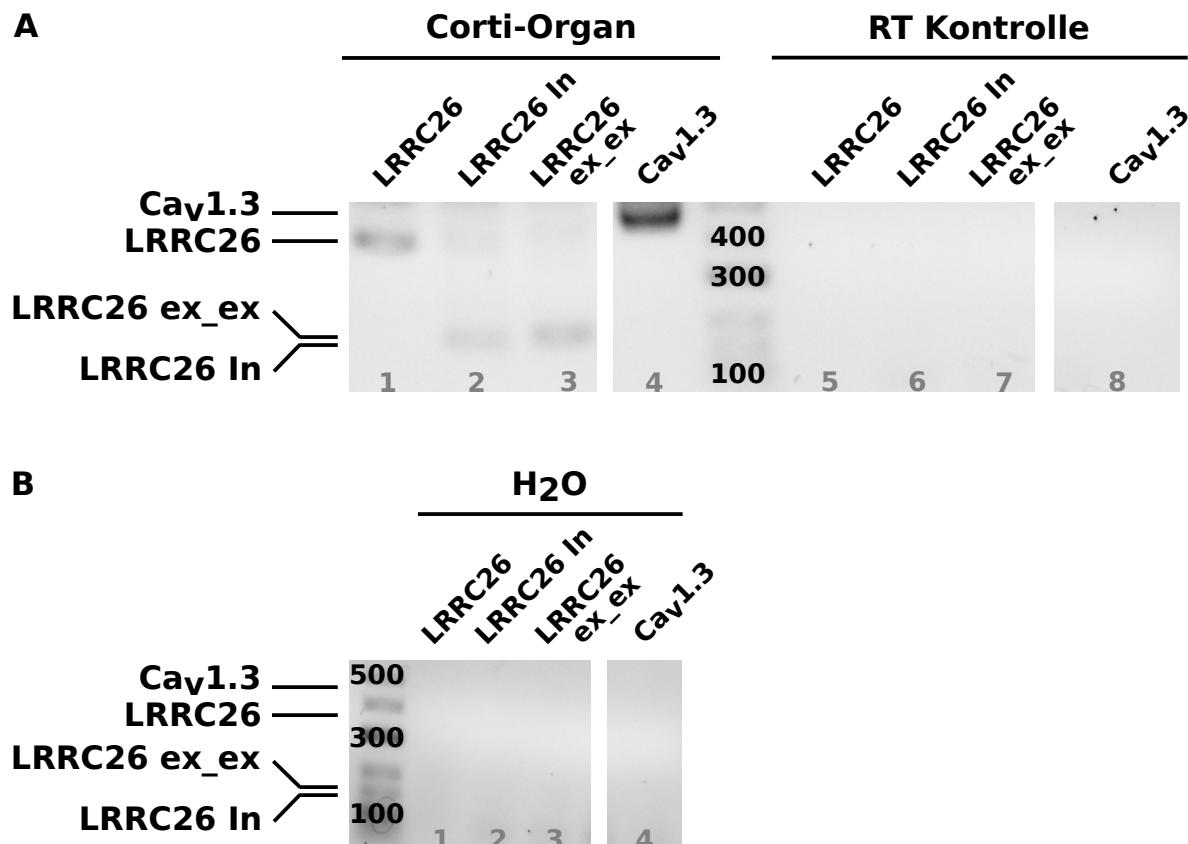


Abbildung 26: Nachweis von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT*-PCR zur LRRC26-Transkriptanalyse in Corti-Organen 5-6 Tage alter NMRI-Mäuse. **A, links**, Schwache Signale von mit verschiedenen Primerpaaren nachgewiesenen amplifizierten LRRC26-Transkripten (Spalten: 1, 366 bp; 2, 150 bp; 3, 168 bp) sowie Cav1.3 als Positivkontrolle (4. Spalte, 426 bp) im Corti-Organ. **A, rechts, B**, Keine Amplifikation von LRRC26- und Cav1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne RT, keine cDNA; A, 5.-8. Spalte) und in den Negativkontrollen der *nested RT*-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; B, 1.-4. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 2 Individuen bestätigt.

In den zusammengeführten Corti-Organen (A, links) waren spezifische Signale mit den potentiell erwarteten Größen bei der Verwendung aller drei LRRC26-Primerpaare zu erkennen. In Spur 1 konnte ein schwaches PCR-Produkt für LRRC26 mit einer Größe von ungefähr 366 bp ausgemacht werden. Dieses unterschied jedoch nicht zwischen gDNA und revers-transkribierter cDNA. Die zweite Spur wies ein noch schwächeres PCR-Produkt von etwa 150 bp für LRRC26 auf, welches die genomische DNA und damit die Kontamination der mRNA mit dieser, widerspiegelte. Mit dem schwachen PCR-Fragment für LRRC26 in der dritten Spur (168 bp) konnte das Vorhandensein von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen gezeigt werden. Für die interne PCR-Kontrolle wurde in der Corti-Organ-Probe in Spur 4 ein deutliches Signal mit einer Größe von ungefähr 426 bp für

$\text{Ca}_v1.3$ -Transkripte aufgedeckt. Die Transkriptionskontrolle des Corti-Organs (keine cDNA, A, rechts) zeigte in den Spuren 5 bis 8 bei der Nutzung aller vier Primerpaare keine PCR-Signale. Auch in den Spuren 1 bis 4 der PCR-Negativkontrollen ließ sich für die Verwendung keines der Primerpaare ein PCR-Fragment (H_2O als *Template*, B) erkennen. Damit wurde bestätigt, dass die Transkription der RNA in cDNA für die vereinten Corti-Organe sowie die PCR erfolgreich waren.

In der folgenden Darstellung (Abb. 27) ist das Ergebnis der Transkriptanalyse von LRRC52 in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen abgebildet.

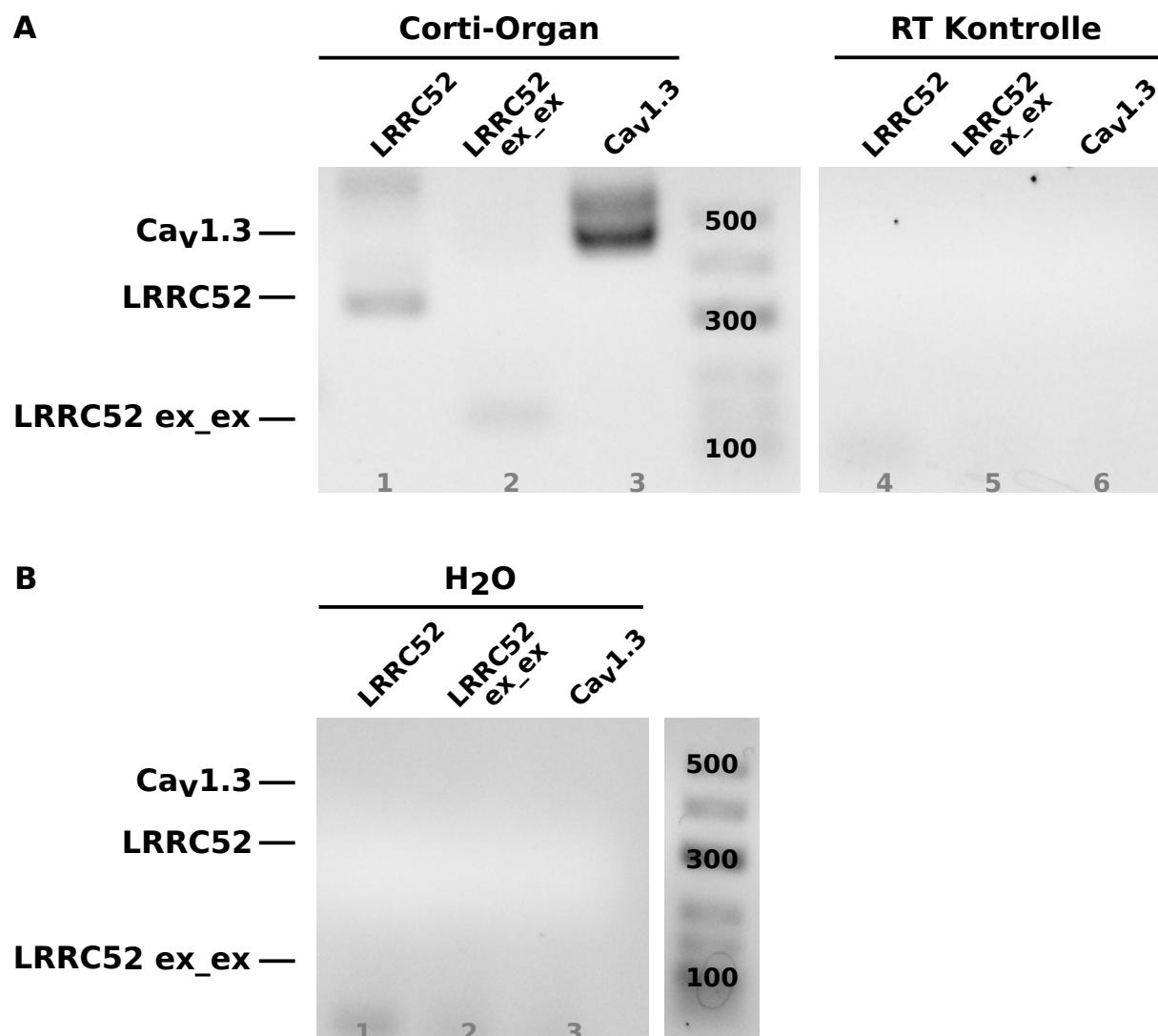


Abbildung 27: Nachweis von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT*-PCR zur LRRC52-Transkriptanalyse in Corti-Organen 5-6 Tage alter NMRI-Mäuse. **A, links**, Amplifikation von mit zwei verschiedenen Primerpaaren nachgewiesenen LRRC52-Transkripten (Spalten: 1, 314 bp; 2, 134 bp) sowie von $\text{Ca}_v1.3$ als intrinsische Kontrolle (3. Spalte, 426 bp) im Corti-Organ. **A, rechts, B**, Keine Signale für LRRC52 und $\text{Ca}_v1.3$ in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne *RT*, keine cDNA; A, 4.-6. Spalte) und in den Negativkontrollen der *nested-RT*-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; B, 1.-3. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 2 Individuen bestätigt.

Die vereinten Corti-Organe (A, links) zeigten schwache, aber spezifische Signale mit den potentiell erwarteten Größen bei der Verwendung beider LRRC52-Primerpaare. Die erste Spur bildete ein PCR-Produkt für LRRC52 mit einer Größe von etwa 314 bp für die Corti-Organe ab. In der zweiten Spur war ebenfalls ein schwaches Signal mit einer Größe von ungefähr 134 bp für LRRC52-Transkripte im Corti-Organ zu erkennen. Mit diesen beiden PCR-Fragmenten wurde ein übereinstimmender Hinweis für das Vorkommen von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen erbracht. Mit dem deutlichen Signal für Ca_v1.3-Transkripte bei etwa 426 bp in Spur 3 wurde die interne PCR-Kontrolle der Corti-Organe bestätigt (A, links). Sowohl in den Spuren 4 bis 6 der Corti-Transkriptionskontrollen (keine cDNA, A, rechts) als auch in den Spuren 1 bis 3 der PCR-Negativkontrollen (H_2O als *Template*, B) waren bei der Nutzung aller drei Primerpaare keine PCR-Fragmente zu erkennen. Damit wurde bestätigt, dass sowohl die Reverse Transkription der zusammengelegten Corti-Organe als auch die PCRs insgesamt gelungen waren.

Mit diesen Ergebnissen wurde belegt, dass auch in unreifen Corti-Organen LRRC26- und LRRC52-Transkripte vorhanden sind.

3.2.4 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen

Um zu überprüfen, ob die schwach positiven PCR-Signale für LRRC26- und LRRC52-mRNA in unreifen Corti-Organen durch unabsichtliche Kontaminationen mit Spiralganglien-Neuronen (SGN), die ebenfalls BK-Kanäle exprimieren (Hafidi et al., 2005; Skinner et al., 2003), verursacht sein könnten, wurde in diesem Versuchsteil die TyfC-Mauslinie verwendet. Bei diesen Mäusen handelt es sich um genetisch modifizierte TyfC/E-Mäuse mit Neuronen-spezifischer Expression von eYFP (Winter et al., 2007), deren Spiralganglien-Afferenzen *in vivo* im Zellverband unter Fluoreszenzbeleuchtung (488 nm) visuell identifiziert werden können. Um die im vorherigen Kapitel (3.2.3) beschriebenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden unter Fluoreszenzlicht-Kontrolle unreife SGN-freie TyfC-Corti-Organe präpariert und zu einer Einzelprobe vermengt. Mit RT-PCR sollte erneut bestimmt werden, ob mRNA von LRRC26 und LRRC52 auch in den zusammengeführten und SGN-freien unreifen Corti-Organen von 5 Tage alten TyfC-Mäusen (n = 2 Tiere) nachweisbar sind.

In der folgenden Abbildung (Abb. 28) ist das Ergebnis der PCR zur Überprüfung von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen dargestellt.

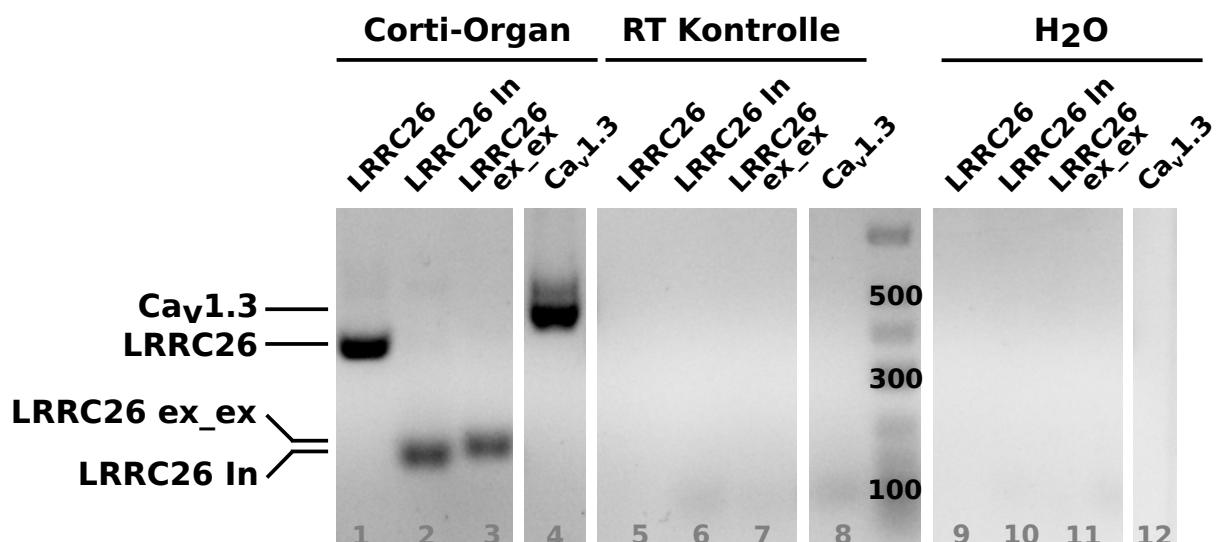


Abbildung 28: Nachweis von LRRC26-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT*-PCR zur LRRC26-Transkriptanalyse in Corti-Organen 5 Tage alter TyfC-Mäuse. Signale für die Amplifikation von mit verschiedenen Primerpaaren nachgewiesenen LRRC26-Transkripten (Spalten: 1, 366 bp; 2, 150 bp; 3, 168 bp) sowie Ca_v1.3 als Positivkontrolle (4. Spalte, 426 bp) im Corti-Organ. Keine Amplifikation von LRRC26- und Ca_v1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne *RT*, keine cDNA; 5.-8. Spalte) und in den Negativkontrollen der *nested RT*-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; 9.-12. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 2 Individuen bestätigt.

Bei der Verwendung aller drei LRRC26-Primerpaare wiesen die Corti-Organ-Proben spezifische Signale mit den potentiell erwarteten Größen auf (links). Mit dem in Spur 1 abgebildeten PCR-Produkt für LRRC26 mit einer Größe von ungefähr 366 bp war jedoch erneut die Unterscheidung zwischen gDNA und revers-transkribierter cDNA nicht möglich. In der zweiten Spur wurde mit einem schwächeren PCR-Signal für LRRC26 bei etwa 150 bp die gDNA nachgewiesen. Der Beleg über das Vorhandensein von LRRC26-Transkripten konnte mit einem schwachen, in Spur 3 detektierten, PCR-Fragment mit einer Größe von ungefähr 168 bp abermals belegt werden. Spur 4 zeigte als interne PCR-Kontrolle in den Corti-Organ-Proben für Ca_v1.3 bei etwa 426 bp dagegen ein deutliches Signal. Die Spuren 5 bis 8 der Corti-Transkriptionskontrollen (keine cDNA, Mitte) sowie die Spuren 9 bis 12 der PCR-Negativkontrollen (H₂O als *Template*, rechts) wiesen bei der Verwendung aller Primerpaare kein PCR-Fragment auf. Dies stellte nicht nur die Bestätigung einer gelungenen Transkription der RNA in cDNA für die vereinten Corti-Organe, sondern auch für eine insgesamt erfolgreiche PCR dar.

Die folgende Abbildung (Abb. 29) zeigt das Ergebnis der LRRC52-Transkriptanalyse in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen.

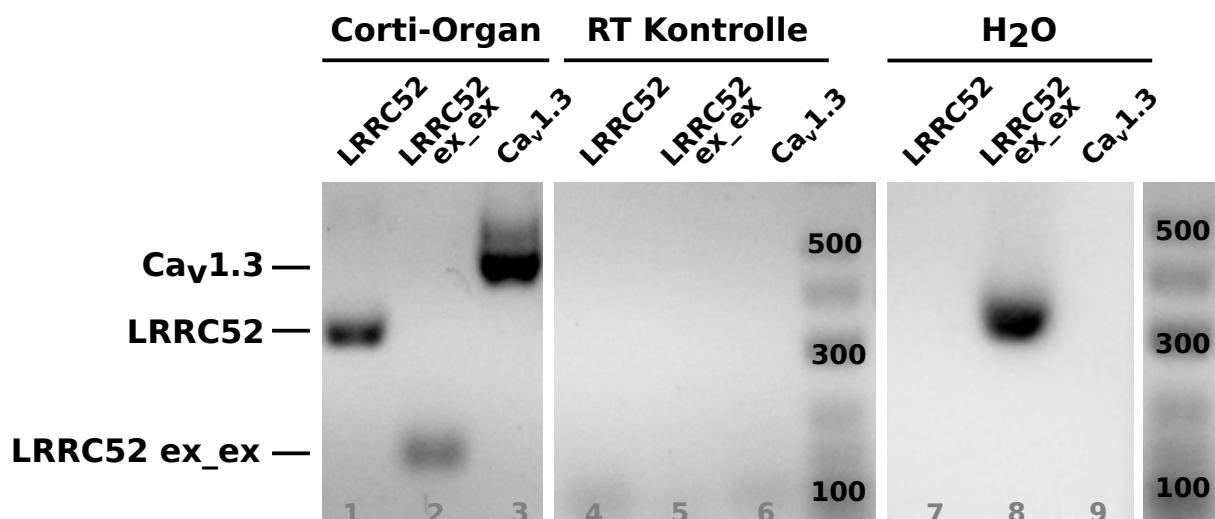


Abbildung 29: Nachweis von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT*-PCR zur LRRC52-Transkriptanalyse in Corti-Organen 5 Tage alter TyfC-Mäuse. Amplifikation von mit verschiedenen Primerpaaren nachgewiesenen LRRC52-Transkripten (Spalten: 1, 314 bp; 2, 134 bp) sowie Ca_v1.3 als intrinsische Kontrolle (3. Spalte, 426 bp) im Corti-Organ. Keine Signale für LRRC52 und Ca_v1.3 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne RT, keine cDNA; 4.-6. Spalte) und in den Negativkontrollen der *nested RT*-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; 7.+9. Spalte). Kontamination der H₂O-Kontrolle mit dem aus dem Exon-Exon-überspannenden Primerpaar resultierenden LRRC52-Transkript (8. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 2 Individuen bestätigt.

Bei der Verwendung beider LRRC52-Primerpaare zeigten die vereinten Corti-Organe spezifische Signale mit den potentiell erwarteten Größen (links). So konnte in Spur 1 das Signal für ein LRRC52-Produkt bei ungefähr 314 bp und in Spur 2 das Signal für ein weiteres LRRC52-Produkt bei etwa 134 bp in den Corti-Organen nachgewiesen werden. Beide PCR-Fragmente belegten das Vorhandensein von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen. Das deutliche Signal für Ca_v1.3 mit einer Größe von ungefähr 426 bp in Spur 3 bestätigte als interne PCR-Kontrolle den PCR-Erfolg. Die Spuren 4 bis 6 der Corti-Transkriptionskontrollen (keine cDNA, Mitte) sowie die Spuren 7 und 9 der PCR-Negativkontrollen (H₂O als *Template*, rechts) waren bei der Nutzung aller drei Primerpaare negativ. Der Erfolg der Reversen Transkription zusammengeführter Corti-Organe und der PCR insgesamt galt für diese Transkript-Nachweise somit als bestätigt. Nur in der 8. Spur der PCR-Negativkontrolle wurde ein Signal mit einer Größe von etwa 314 bp für LRRC52 ermittelt, aus der jedoch bei vorliegendem cDNA-*Template* ein ungefähr 134 bp-großes PCR-Produkt hervorgehen sollte. Es musste davon ausgegangen werden, dass in dem PCR-Ansatz eine Kontamination mit dem PCR-Produkt aus Spur 1 vorlag. Es genügte jedoch, mit dem ersten LRRC52-Primerpaar und dessen sauberen

Negativkontrollen das Vorhandensein von LRRC52-Transkripten in unreifen Corti-Organen von TyfC-Mäusen zu belegen.

Mit diesen Ergebnissen wurde somit gezeigt, dass LRRC26- und LRRC52-Transkripte auch in unreifen und SGN-freien Corti-Organen vorhanden sind. Damit konnten auch die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3, die ebenfalls gezeigt hatten, dass in unreifen Corti-Organen von NMRI-Mäusen LRRC26- und LRRC52-Transkripte vorliegen, bestätigt werden. Die dort gefundenen Transkripte für LRRC26 und LRRC52 können somit nicht ausschließlich aus einer möglichen Kontamination mit Spiralganglien-Neuronen herrühren.

3.2.5 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten Mäusen

Von besonderem Interesse war die LRRC-Transkriptanalyse in BK α -defizienten Mäusen, in denen das Gen, das für die porenbildende α -Untereinheit des BK-Kanals kodiert, deletiert war. Dieser Versuchsteil sollte Aufschluss darüber geben, ob LRRC26- und LRRC52-mRNA in Corti-Organen von reifen BK α -defizienten-Tieren vorhanden sind. Zusätzlich sollten diese Experimente Aufschluss darüber geben, ob das Vorhandensein potentieller neuer BK- γ -Untereinheiten an das Vorkommen von BK-mRNA in ausgereiften Corti-Organen gekoppelt ist oder ob BK- und LRRC-mRNA getrennt voneinander transkribiert werden. Hierzu wurden jeweils zwei ausgereifte Corti-Organe sowohl aus BK-WT-Tieren (BK $\alpha^{+/+}$) als auch aus BK-KO-Tieren (BK $\alpha^{-/-}$) mit einem Alter von drei bis vier Wochen als entsprechende Einzelproben vereint.

3.2.5.1 BK- und LRRC52-Transkripte in Hoden von BK α -defizienten Mäusen

Zu Beginn wurden die BK-Primer, die in Anlehnung an (Nemzou N. et al., 2006) synthetisiert wurden, an Hodengewebe von 21 bis 30 Tage alten BK $\alpha^{+/+}$ - und BK $\alpha^{-/-}$ -Mäusen überprüft. Zusätzlich wurde das Gewebe auf das Vorhandensein von LRRC52-Transkripten hin untersucht ($n = 3$ Tiere je Genotyp). Der Ca_v1.3-Nachweis galt erneut als interne Positivkontrolle der PCR. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

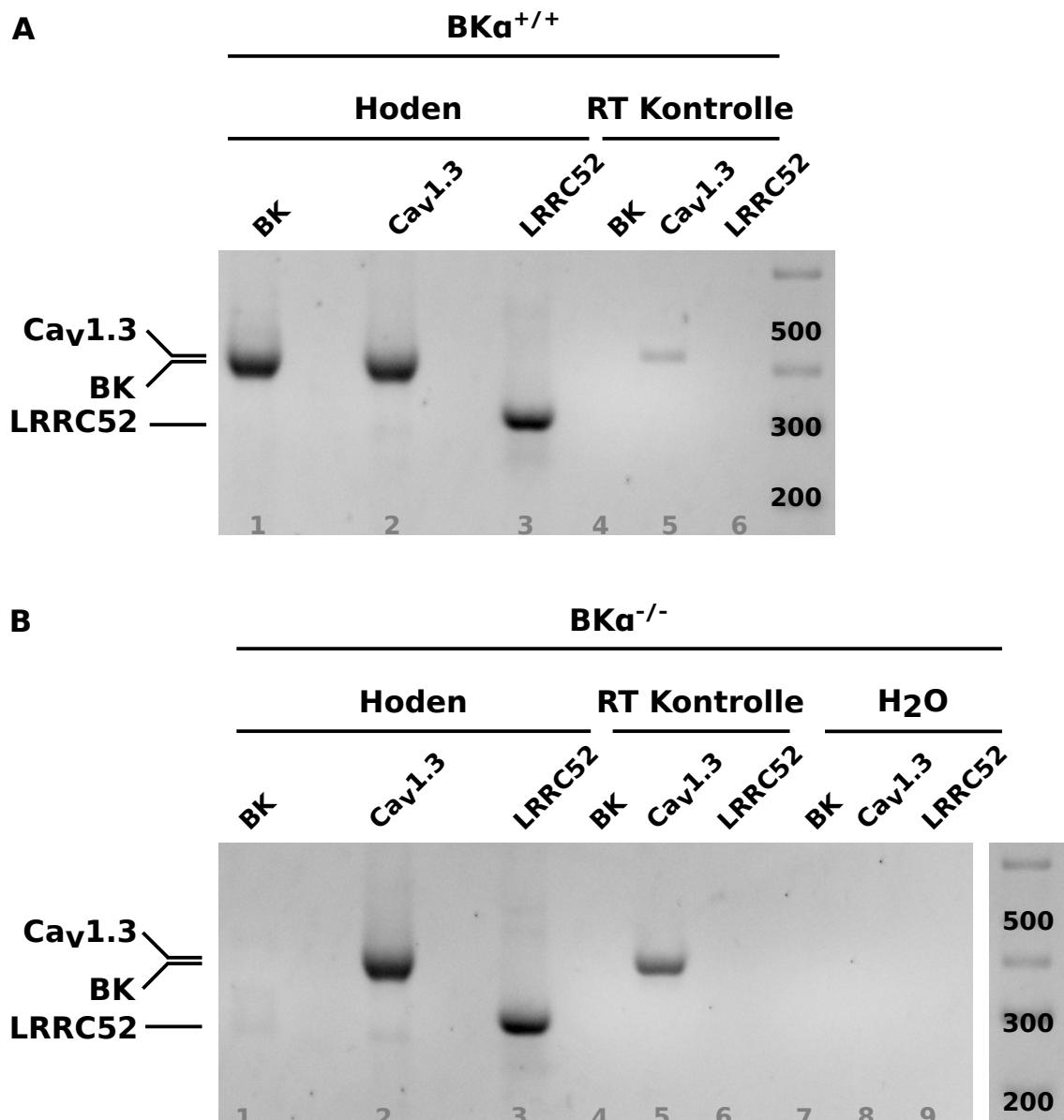


Abbildung 30: Nachweis von BK-, LRRC52- und Ca_v1.3-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested* RT-PCR zur BK- und LRRC52-Transkriptanalyse in Corti-Organen 3-4 Wochen alter BK-WT- (A) und BK-KO-Mäuse (B). **A, links, B, links**, PCR-Signale für Ca_v1.3 und LRRC52 (Spalten: 2, 426 bp; 3, 314 bp) im Hodengewebe von BK $\alpha^{+/+}$ - und BK $\alpha^{-/-}$ -Tieren. Amplifikation von BK-Transkripten (1. Spalte, 423 bp) nur in BK $\alpha^{+/+}$ - und nicht in BK $\alpha^{-/-}$ -Mäusen. **A, rechts, B, Mitte**, Keine Signale für BK und LRRC52 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne RT, keine cDNA; A, B, 4.+6. Spalte) von BK $\alpha^{+/+}$ - und BK $\alpha^{-/-}$ -Tieren. Kontamination der RT-Kontrollen (A, B, 5. Spalte) mit Ca_v1.3 in beiden Genotypen. (B, rechts) Keine Amplifikation von BK- und LRRC52-Transkripten in den Negativkontrollen der *nested* RT-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; 7.-9. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 3 Individuen bestätigt.

In den Hodengeweben von BK $\alpha^{+/+}$ -Mäusen waren die spezifischen Transkripte für BK mit einer Größe von etwa 423 bp in Spur 1, für Ca_v1.3 bei ungefähr 426 bp in Spur 2 und für LRRC52 mit einer Größe von etwa 314 bp in Spur 3 deutlich zu erkennen. Die BK $\alpha^{-/-}$ -Tiere wiesen nur für Ca_v1.3 in Spur 2 und für LRRC52 in Spur 3 PCR-Produkte auf. Für die

Amplifikation von BK war in Spur 1 kein Signal zu detektieren. Durch die deutlichen, in den jeweils 2. Spuren von A und B aufgezeigten, PCR-Produkte für Ca_v1.3 in den Hodengeweben beider Genotypen konnte ein insgesamt gelungener PCR-Ablauf verzeichnet werden. Bestätigt wurde diese Aussage durch das Fehlen von PCR-Signalen in den Negativkontrollen (H₂O als *Template*, B, rechts) bei der Verwendung aller drei Primerpaare in den Spuren 7, 8 und 9. Die Transkriptionskontrollen der Hodengewebe lieferten sowohl in den WT- (A, rechts) als auch in den KO-Tieren (B, Mitte) keine PCR-Produkte bei der Nutzung der BK-Primer in den jeweils 4. Spuren und der LRRC52-Primer in den entsprechenden 6. Spuren. In den Ca_v1.3-Transkriptionskontrollen beider Genotypen waren dagegen Signale mit einer Größe von ungefähr 426 bp in den jeweiligen 5. Spuren vorhanden. Diese Tatsache konnte für die Aussage dieses Versuchsteils jedoch vernachlässigt werden, da durch die An- oder Abwesenheit von BK-Transkripten in beiden Genotypen dennoch spezifische Aussagen über LRRC52 gemacht werden konnten.

Das *nested* PCR-Fragment sowie auch das PCR-Produkt aus der 1. PCR für BK des Hodengewebes von BK $\alpha^{+/+}$ -Mäusen (A, Spur 1) wurden zur Überprüfung zusätzlich aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und von der Firma SeqLab sequenziert (s. Kap. 3.2.2). Die Übereinstimmungen dieser BK-Fragmente mit den entsprechenden bioinformatischen Sequenzen von BK lagen bei 99-100 % und bestätigten damit eine spezifische Amplifikation von BK-Transkripten.

Insgesamt konnte somit die Spezifität des verwendeten BK-Primerpaars an BK $\alpha^{+/+}$ - und BK $\alpha^{-/-}$ -Tieren validiert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass LRRC52-Transkripte auch in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten Mäusen vorhanden sind. Da davon ausgegangen werden musste, dass bei den Ca_v1.3-Primern eine Kontamination vorlag, wurden für die weiteren Experimente neue Primer bestellt und verwendet.

3.2.5.2 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten Mäusen

Im nächsten Schritt wurden die ausgereiften und zusammengeführten Corti-Organe von 21 bis 30 Tage alten BK $\alpha^{+/+}$ - und BK $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zur Transkriptanalyse von LRRC26 und LRRC52 herangezogen (n = 3 Tiere pro Genotyp).

Die folgende Abbildung (Abb. 31) zeigt das Ergebnis der PCR zur Überprüfung von LRRC26-Transkripten in den vereinten Corti-Organen der ausgereiften BK α -defizienten-Mäuse.

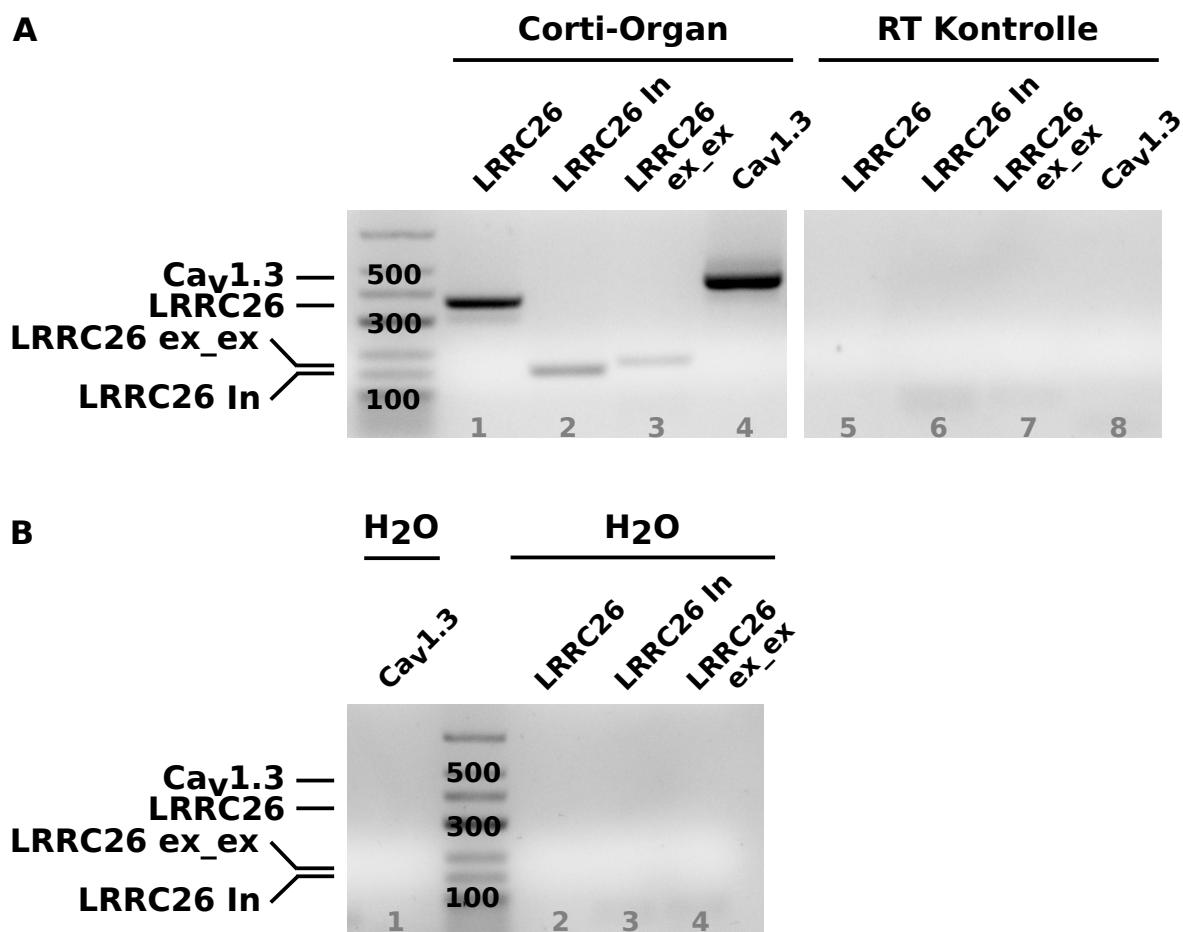


Abbildung 31: Nachweis von LRRC26-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT-PCR* zur LRRC26-Transkriptanalyse in Corti-Organen 3-4 Wochen alter BK α -defizienter-Mäuse. **A, links**, Amplifikation von LRRC26-Transkripten (Spalten: 1, 366 bp; 2, 150 bp; 3, 168 bp) sowie Ca v 1.3 als Positivkontrolle (4. Spalte, 426 bp) im Corti-Organ von BK α ^{-/-}-Tieren. **A, rechts, B**, Keine Signale für die Amplifikation von LRRC26 und Ca v 1.3 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne *RT*, keine cDNA; A, 5.-8. Spalte) sowie in den Negativkontrollen der *nested RT-PCR* (Wasser anstelle von cDNA; B, 1.-4. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 3 Individuen bestätigt.

In den vereinten Corti-Organen (A, links) waren spezifische PCR-Fragmente mit den potentiell erwarteten Größen bei der Verwendung aller drei LRRC26-Primerpaare zu erkennen. Das deutliche PCR-Produkt für LRRC26 mit einer Größe von ungefähr 366 bp in Spur 1 unterschied jedoch nicht zwischen gDNA und revers-transkribierter cDNA. Die 2. Spur zeigte mit einem schwächeren LRRC26-Signal bei ungefähr 150 bp das Vorhandensein genomicscher DNA. Erst durch das relativ schwache Signal mit einer Größe von 168 bp in Spur 3 konnte gezeigt werden, dass LRRC26-Transkripte auch in Corti-Organen von BK α ^{-/-}-Mäusen vorliegen. Die interne PCR-Kontrolle der Corti-Organe wies in der 4. Spur für Ca v 1.3 mit 426 bp ein deutlich erkennbares PCR-Produkt auf. In den Spuren 5 bis 8 der Corti-Transkriptionskontrollen (A, rechts) sowie in den Spuren 1 bis 4 der PCR-Negativkontrollen (H_2O als *Template*, B) wurden keine PCR-Fragmente bei der

Nutzung aller drei Primerpaare detektiert. Damit wurde erneut die erfolgreiche cDNA-Transkription für die zusammengeführten Corti-Organe sowie eine insgesamt gelungene PCR bestätigt.

Das Ergebnis der LRRC52-Transkriptanalyse der zusammengeführten Corti-Organe von ausgereiften BK α -defizienten-Mäusen ist in der folgenden Abbildung (Abb. 32) dargestellt.

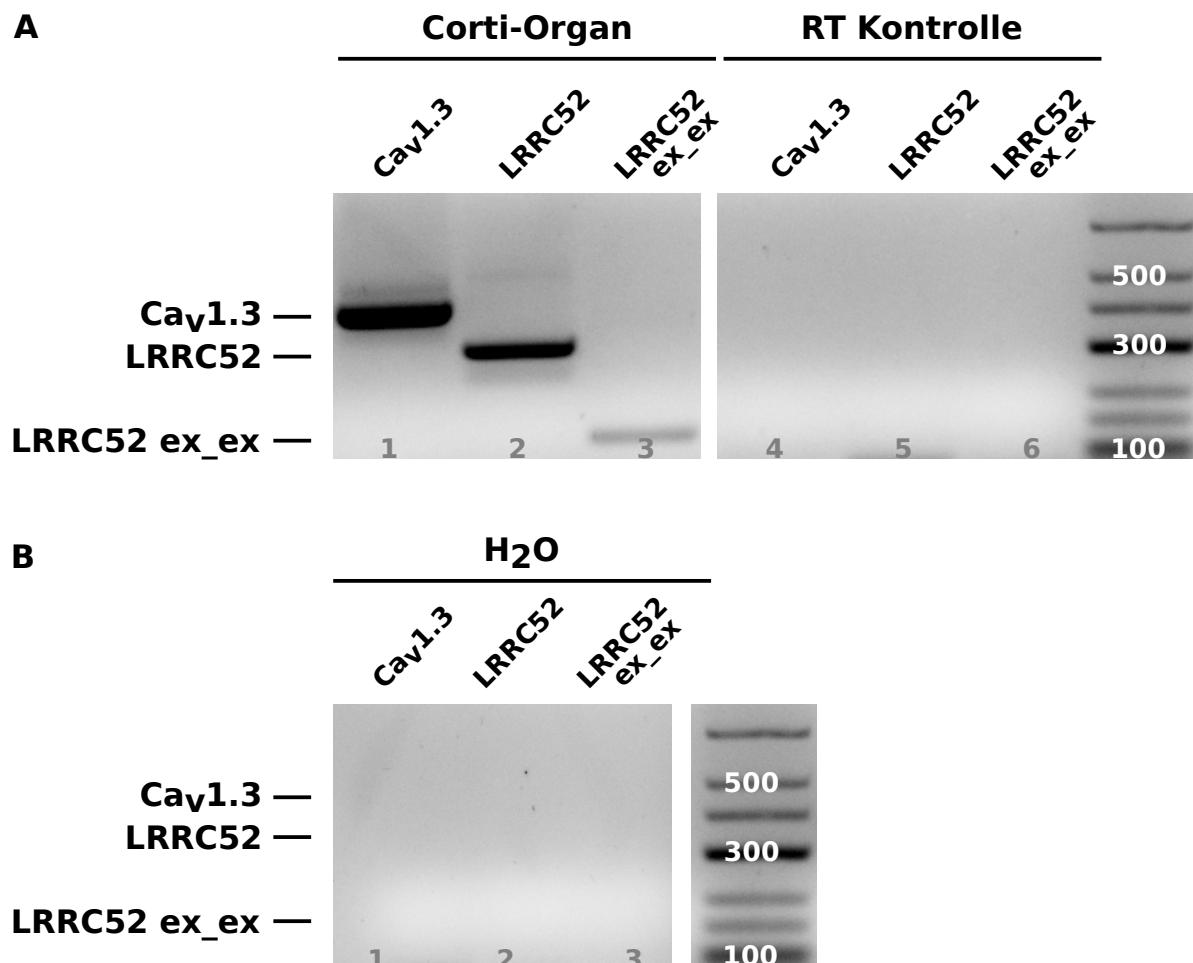


Abbildung 32: Nachweis von LRRC52-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested* RT-PCR zur LRRC52-Transkriptanalyse in Corti-Organen 3-4 Wochen alter BK α -defizienter-Mäuse. **A, links**, Amplifikation von LRRC52-Transkripten (Spalten: 2, 314 bp; 3, 134 bp) sowie von Ca v 1.3-Transkripten als intrinsische Kontrolle (1. Spalte, 426 bp) im Corti-Organ von BK $\alpha^{-/-}$ -Tieren. **A, rechts, B**, Keine Amplifikation von LRRC52- und Ca v 1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription ohne RT, keine cDNA; A, 4.-6. Spalte) und in den Negativkontrollen der *nested* RT-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; B, 1.-3. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 3 Individuen bestätigt.

Erneut zeigen die zusammengeführten Corti-Organe (A, links) bei der Verwendung beider LRRC52-Primerpaare spezifische PCR-Fragmente mit den potentiell erwarteten Größen auf. Die 1. Spur zeigte bei der Nutzung der Ca v 1.3-Primer ein deutliches PCR-Signal mit einer Größe von ungefähr 426 bp. Dies bestätigte als interne PCR-Kontrolle der Corti-Organe

einen insgesamt gelungenen PCR-Ablauf. In Spur 2 wurde ein starkes Signal für das LRRC52-Transkript mit einer Größe von 314 bp und in Spur 3 ein etwas schwächeres Signal für das zweite LRRC52-Transkript bei 134 bp in den zusammengelegten Corti-Organen nachgewiesen. Diese übereinstimmenden Ergebnisse validieren den Nachweis von LRRC52-Transkripten in ausgereiften Corti-Organen von BK α -defizienten Mäusen. Sowohl die Spuren 4 bis 6 der Corti-Transkriptionskontrollen (A, rechts) als auch die Spuren 1 bis 3 der PCR-Negativkontrollen (H_2O als *Template*, B) zeigten bei der Verwendung aller drei Primerpaare keine PCR-Signale. Damit wurde gezeigt, dass die Reverse Transkription der vereinten Corti-Organe sowie die PCR insgesamt erfolgreich verliefen.

Insgesamt konnte in den vorhergehenden Versuchen das Vorkommen von LRRC26- und LRRC52-Transkripten auch in den reifen Corti-Organen von BK α -defizienten Tieren belegt werden.

3.2.6 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen

Da es in den Corti-Organen von unreifen NMRI-Mäusen, unreifen TyfC-Mäusen und ausgereiften BK α -defizienten Mäusen mRNA-Signale für LRRC26 und LRRC52 gab, sollten in den nächsten beiden Kapiteln (3.2.6 bis 3.2.7) speziell die IHZ des Corti-Organs untersucht werden.

Die RT-PCR sollte Klarheit darüber geben, ob mRNA von LRRC26 und LRRC52 in ausgereiften IHZ von 19 bis 24 Tage alten NMRI-Mäusen vorliegt. Dazu wurde die cDNA mittels *Reverser Transkriptase* aus der mRNA von ausgereiften IHZ synthetisiert. Abhängig von der Qualität des Versuchsablaufes und der Corti-Organ-Präparation wurden jeweils 40-130 IHZ aus dem gleichen Corti-Organ zu einer Einzelprobe vereint. Eine cDNA-Einzelprobe wurde nachfolgend für 4-36 einzelne *nested* PCR-Reaktionen eingesetzt. Somit gingen in eine PCR-Reaktion im Mittel die mRNA/cDNA von 2-20 IHZ ein. Als Negativkontrolle der Transkription wurde die Badlösung (B-41), die zur Gewinnung der IHZ verwendet wurde, eingesetzt. Aufgrund der geringen IHZ-Ausbeuten wurden in diesen Analysen nur zwei Primerpaare für LRRC26 (LRRC26: 366 bp, gDNA-Nachweis; LRRC26 ex_ex: 168 bp, mRNA/cDNA-Nachweis) und ein Primerpaar für LRRC52 (LRRC52; 314 bp, mRNA/cDNA-Nachweis) eingesetzt. Mit dieser verringerten Anzahl an PCR-Reaktionen ist es jedoch noch immer möglich, eine eindeutige Aussage über das Vorliegen von LRRC26 bzw. LRRC52-mRNA zu tätigen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 33) ist das Ergebnis der PCR zur Überprüfung von BK-, LRRC26- und Ca_v1.3-Transkripten in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen abgebildet.

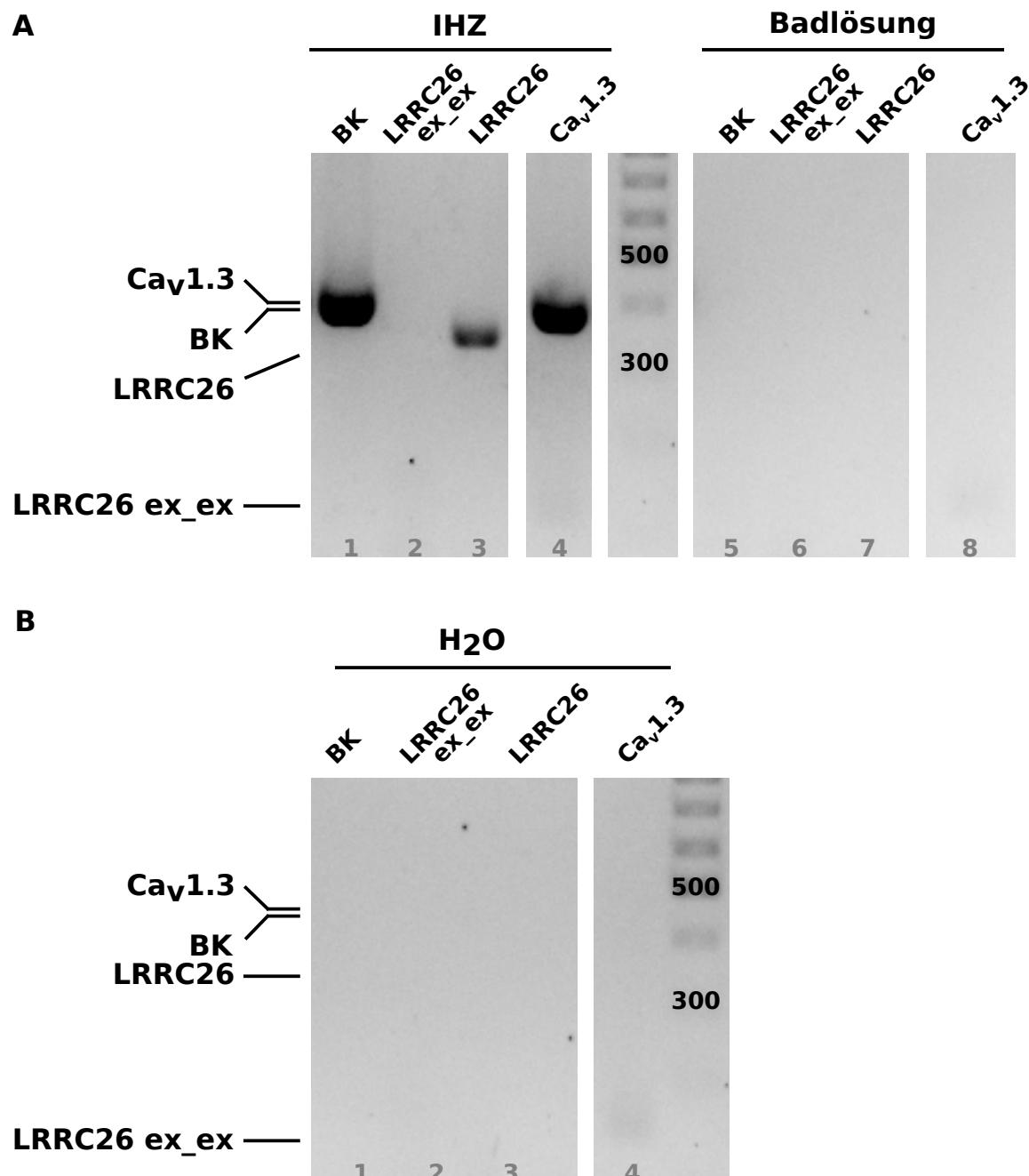


Abbildung 33: Nachweis von BK- und LRRC26-Transkripten in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT-PCR* zur BK- und LRRC26-Transkriptanalyse in IHZ 3 Wochen alter NMRI-Mäuse. **A, links**, Amplifikation von BK-Transkripten (1. Spalte, 423 bp) sowie nur eines LRRC26-Transkripts (3. Spalte, 366 bp) und Ca_v1.3 als Positivkontrolle (4. Spalte, 426 bp) in IHZ. Die aus dem Exon-Exon-überspannenden Primerpaar-resultierenden LRRC26-Transkripte (2. Spalte, kein Signal bei 168 bp) waren nicht vorhanden. **A, rechts**, **B**, Keine Signale für BK, LRRC26 und Ca_v1.3 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription der Badlösung als negative Referenzlösung isolierter IHZ, keine cDNA; A, 5.-8. Spalte) sowie in den Negativkontrollen der *nested RT-PCRs* (Wasser anstelle von cDNA; B, 1.-4. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 9 Individuen bestätigt.

Für den Nachweis von BK-Transkripten war in der IHZ-Probe in der 1. Spur in Abbildung 33 A ein spezifisches PCR-Fragment (A, links) mit einer Größe von 423 bp zu erkennen. Bei der Verwendung der beiden LRRC26-Primerpaare war nur für das Primerpaar aus der Evanson-Studie in Spur 2 ein schwaches Signal mit einer Größe von ungefähr 366 bp sichtbar. Anhand dieses PCR-Produktes konnte jedoch nicht zwischen genomischer DNA und cDNA unterschieden werden. Für das Primerpaar, welches das Vorhandensein von LRRC26-mRNA in IHZ bestätigen würde, war in Spur 3 kein PCR-Fragment detektierbar. Spur 4 verzeichnete dagegen ein deutliches PCR-Signal mit einer Größe von 426 bp für das Ca_v1.3-Transkript als interne PCR-Kontrolle der IHZ. Die Spuren 5 bis 8 der IHZ-Transkriptionskontrollen (A, rechts) wiesen keine PCR-Produkte auf. Auch die Spuren 1 bis 4 der PCR-Negativkontrollen (H_2O als *Template*, B) waren bei der Nutzung aller vier Primerpaare frei von PCR-Signalen. Dadurch wurden eine gelungene cDNA-Transkription der IHZ sowie eine insgesamt erfolgreiche PCR bestätigt.

Die folgende Darstellung (Abb. 34) zeigt die Ergebnisse der Transkriptanalyse von BK, LRRC52 und Ca_v1.3 in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen ab.

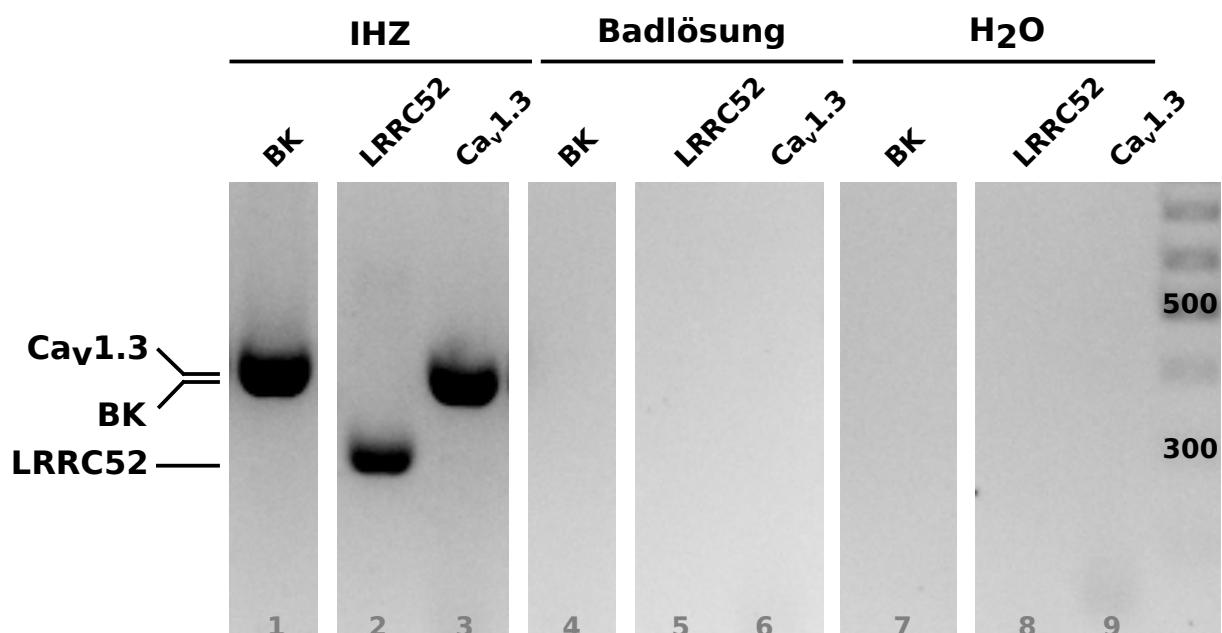


Abbildung 34: Nachweis von BK- und LRRC52-Transkripten in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT*-PCR zur BK- und LRRC52-Transkriptanalyse in IHZ 3 Wochen alter NMRI-Mäuse. Amplifikation der BK- (1. Spalte, 423 bp) und LRRC52-Transkripte (2. Spalte, 314 bp) sowie des Ca_v1.3 Transkripts als intrinsische Kontrolle (3. Spalte, 426 bp) in IHZ. Keine Amplifikation von BK-, LRRC52- und Ca_v1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription der Badlösung als negative Referenzlösung isolierter IHZ, keine cDNA; 4.-6. Spalte) wie auch in den Negativkontrollen der *nested RT*-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; 7.-9. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 10 Individuen bestätigt.

Die ausgereiften IHZ (links) wiesen bei der Verwendung aller Primerpaare spezifische PCR-Fragmente mit potentiell erwarteter Größe auf. So zeigte sich in Spur 1 ein Signal für BK-Transkripte mit einer Größe von ungefähr 426 bp. Auch bei der Nutzung des LRRC52-Primerpaars wurde in Spur 2 ein deutliches PCR-Produkt mit einer Größe von 314 bp sichtbar. Ein weiteres gut erkennbares PCR-Signal mit einer Größe von 426 bp für Ca_v1.3 als interne PCR-Kontrolle der IHZ war in Spur 3 erkennbar. In den Spuren 4 bis 6 der IHZ-Transkriptionskontrollen (Mitte) waren ebenso wenig PCR-Fragmente detektierbar wie in den Spuren 7 bis 9 der PCR-Negativkontrollen (H₂O als *Template*, rechts). Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Reverse Transkription von IHZ und sowie die PCR insgesamt erfolgreich waren.

Mit den in diesem Kapitel erzielten Ergebnissen wurde das Vorkommen von LRRC52-Transkripten in ausgereiften IHZ von NMRI-Mäusen belegt. Transkripte für LRRC26 waren dagegen nicht nachzuweisen.

3.2.7 LRRC26- und LRRC52-Transkripte in unreifen inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen

Abschließend wurden unreife IHZ von NMRI-Mäusen mit Hilfe von *RT*-PCR auf mRNA-Ebene untersucht. Es sollte aufgedeckt werden, ob die revers-transkribierte cDNA der unreifen IHZ 5 bis 6 Tage alter NMRI-Mäuse Transkripte von LRRC26 und LRRC52 vorweisen kann. Es wurden je nach Qualität des Versuchsablaufes und der Corti-Organ-Präparation erneut 40-130 IHZ aus dem gleichen Corti-Organ zu einer Einzelprobe vereint. In diesem Versuchsteil wurden erneut alle drei Primerpaare für den Nachweis von LRRC26-Transkripten (LRRC26: 366 bp, Nachweis für gDNA oder mRNA/cDNA; LRRC26 In: 150 bp, Nachweis für gDNA; LRRC26 ex_ex: 168 bp, mRNA/cDNA-Nachweis) verwendet. Wie auch im vorherigen Kapitel (3.2.6) wurde für die Analyse der LRRC52-Transkripte nur 1 Primerpaar für LRRC52 (LRRC52; 314 bp, mRNA/cDNA-Nachweis) eingesetzt, mit welchem LRRC52-Transkripte jedoch eindeutig nachgewiesen werden können. Die zur Gewinnung von IHZ eingesetzte Badlösung B-41 wurde als Transkriptionskontrolle eingesetzt.

In der folgenden Abbildung (Abb. 35) ist das Ergebnis der PCR zur Überprüfung von BK-, LRRC26- und Ca_v1.3-Transkripten in unreifen IHZ von NMRI-Mäusen dargestellt.

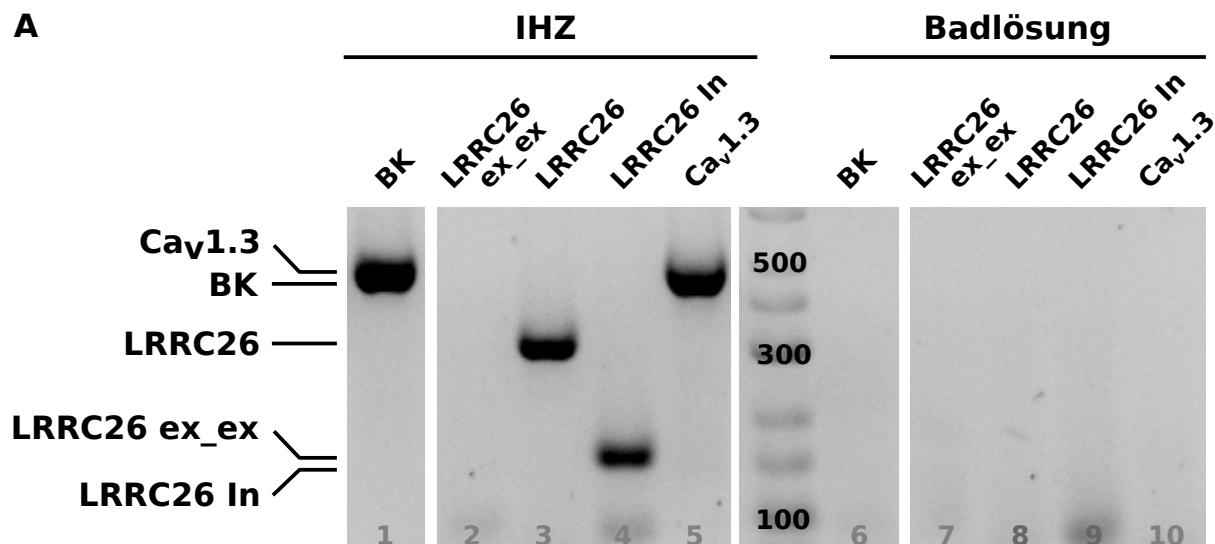
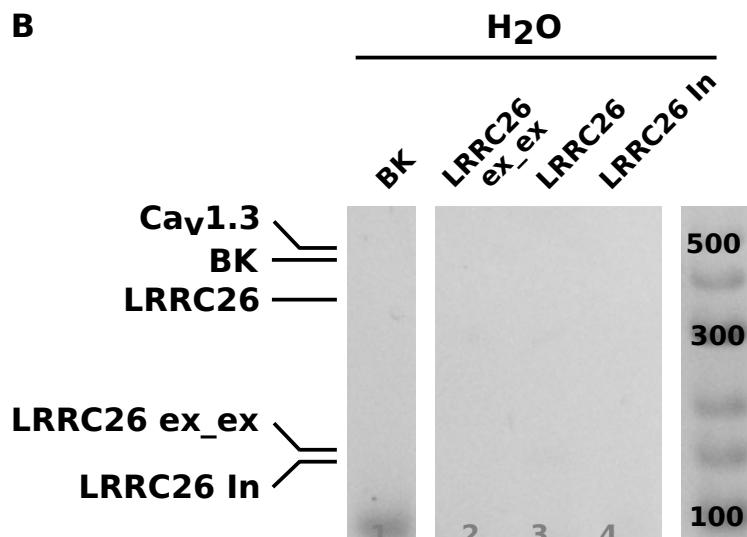
A**B**

Abbildung 35: Nachweis von BK- und LRRC26-Transkripten in unreifen IHZ von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT*-PCR zur BK- und LRRC26-Transkriptanalyse in IHZ von 5 bis 6 Tage alten NMRI-Mäusen. **A, links**, Amplifikation von BK-Transkripten (1. Spalte, 423 bp) und zwei der drei LRRC26-Transkripte (Spalten: 3, 366 bp; 4, 150 bp) sowie Ca_v1.3-Transkripten als Positivkontrolle (5. Spalte, 426 bp) in IHZ. Die aus dem Exon-Exon-überspannenden Primerpaar resultierenden LRRC26-Transkripte (2. Spalte, kein Signal bei 168 bp) waren nicht vorhanden. **A, rechts, B**, Keine Signale für BK, LRRC26 und Ca_v1.3 in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription der Badlösung als negative Referenzlösung isolierter IHZ, keine cDNA; A, 6.-10. Spalte) wie auch in den Negativkontrollen der *nested RT*-PCRs (Wasser anstelle von cDNA; B, 1.-4. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 2 Individuen bestätigt.

In der 1. Spur konnten BK-Transkripte durch ein deutliches spezifisches PCR-Fragment (A, links) mit einer Größe von ungefähr 423 bp in unreifen IHZ detektiert werden. Bei der Verwendung des LRRC26-Primerpaars, das ausschließlich mRNA nachweist, war in der

2. Spur kein PCR-Signal zu erkennen. Bei der Nutzung des LRRC26-Primerpaars, welches für das deutliche PCR-Produkt mit einer Größe von etwa 366 bp in Spur 3 verantwortlich war, konnte nicht eindeutig zwischen gDNA und cDNA unterschieden werden. Auch in Spur 4 wurde ein eindeutiges PCR-Signal bei ungefähr 150 bp detektiert. Dieses stellt den Nachweis für genomische LRRC26-DNA dar. In der internen PCR-Kontrolle der IHZ in Spur 5 zeigte sich ebenfalls ein prägnantes PCR-Signal mit einer Größe von etwa 426 bp, welches das Vorhandensein von Ca_v1.3-Transkripten in unreifen IHZ deutlich belegte. Die Badlösung stellte die Umschreibe-Kontrolle für IHZ dar, die in den Spuren 6 bis 10 (A, rechts) keine PCR-Produkte aufwiesen. Auch in den Spuren 1 bis 4 der PCR-Negativkontrollen (H_2O als *Template*, B) waren bei der Verwendung aller vier Primerpaare keine PCR-Signale festzustellen. Diese beiden Ergebnisse bestätigten eine gelungene cDNA-Transkription der IHZ sowie eine insgesamt erfolgreiche PCR.

Das Ergebnis der Transkriptanalyse von BK, LRRC52 und Ca_v1.3 in unreifen IHZ von NMRI-Mäusen ist in der folgenden Darstellung (Abb. 36) abgebildet.

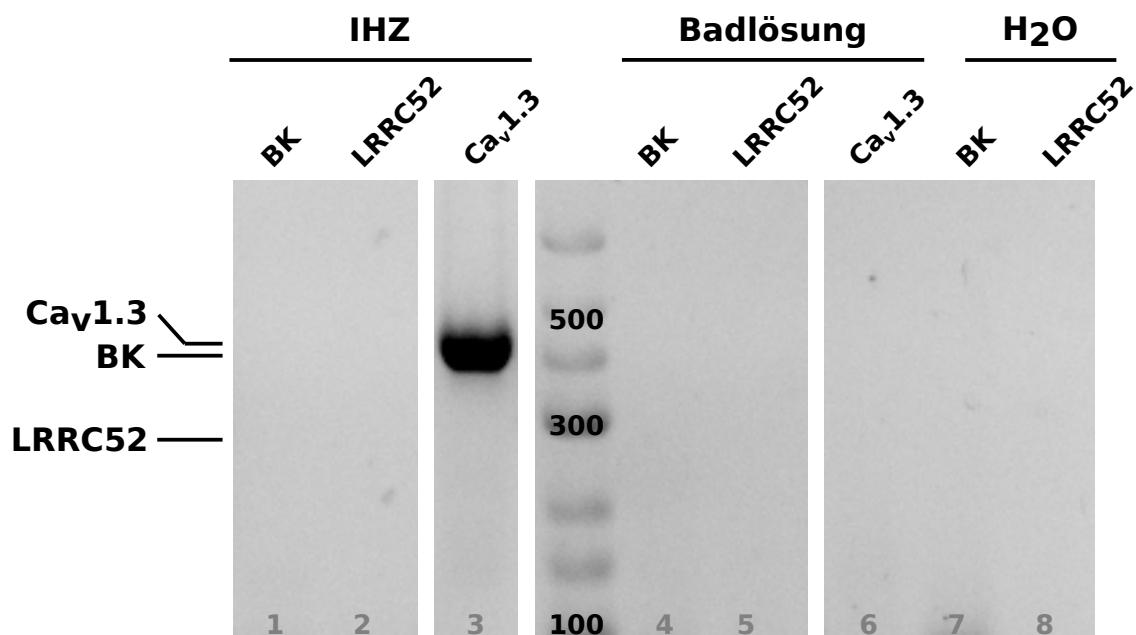


Abbildung 36: Nachweis von BK- und LRRC52-Transkripten in unreifen IHZ von NMRI-Mäusen

Original-Gelbilder der *nested RT-PCR* zur BK- und LRRC52-Transkriptanalyse in IHZ von 5 bis 6 Tage alten NMRI-Mäusen. BK- (1. Spalte, kein Signal bei 423 bp) und LRRC52-Transkripte (2. Spalte, kein Signal bei 314 bp) waren nicht nachweisbar, jedoch Signale für die Amplifikation von Ca_v1.3-Transkripten als Marker (3. Spalte, 426 bp). Ebenfalls keine Amplifikation von BK-, LRRC52- und Ca_v1.3-Transkripten in den Negativkontrollen der Reversen Transkription (Reverse Transkription der Badlösung als negative Referenzlösung isolierter IHZ, keine cDNA; 4.-6. Spalte) sowie in den Negativkontrollen der *nested RT-PCRs* (Wasser anstelle von cDNA; 7.-8. Spalte). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufe an insgesamt 2 Individuen bestätigt.

In den unreifen IHZ (links) waren keine PCR-Produkte für BK in der 1. Spur sowie für LRRC52 in der 2. Spur auszumachen. Nur bei der Verwendung des Ca_v1.3-Primerpaars, das als interne PCR-Kontrolle fungierte und das Vorhandensein der IHZ-mRNA nachwies, konnte in Spur 3 ein PCR-Fragment mit einer Größe von etwa 426 bp detektiert werden. Die erfolgreiche Umschreibung der IHZ-mRNA in cDNA und eine insgesamt gelungene PCR wurden durch die Abwesenheit von PCR-Signalen in den Spuren 4 bis 8 der IHZ-Transkriptionskontrollen (Mitte) und der PCR-Negativkontrollen (H₂O als *Template*, rechts) bestätigt. Das Vorhandensein von BK-mRNA (Abb. 35) bzw. dessen Abwesenheit in Proben unreifer IHZ (Abb. 36) zeigten erstmals, dass BK-Transkripte einige Tage vor Beginn der Proteinexpression vorhanden sein können, es aber nicht immer sind.

Insgesamt konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass weder LRRC26- noch LRRC52-Transkripte in unreifen IHZ von Wildtyp-Tieren vorlagen.

3.3 Überprüfung der Lokalisation von LRRC26-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen

Evanson et al. konnten 2014 zeigen, dass die porenbildende BKα-Untereinheit mit dem Protein LRRC26 in der Plasmamembran arterieller Myozyten kolokalisiert (Evanson et al., 2014). Obwohl LRRC26-Transkripte nur in den Corti-Organen von NMRI-, TyfC- und BK-defizienten Mäusen (s. Kap. 3.2.1 bis 3.2.5), nicht aber in den ausgereiften IHZ selbst, ausfindig gemacht wurden, sollte in diesem Versuchsteil überprüft werden, ob das Protein von LRRC26 möglicherweise dennoch in IHZ exprimiert wird und somit als eine modulatorische γ-Untereinheit des BK-Kanals fungieren könnte. Hierzu wurde unter anderem der in der oben genannten Veröffentlichung als positiv und spezifisch getestete kommerzielle Ziege-anti-LRRC26-Antikörper (Q-15) an Corti-Organen von 22 Tage alten NMRI-Mäusen verwendet. Um Färbeartefakte auszuschließen wurden Einzelfärbungen mitgeführt, in denen kein LRRC26-Primärantikörper, jedoch beide Sekundärantikörper aus den dazugehörigen Kofärbungen verwendet wurden.

In der folgenden Abbildung (Abb. 37) sind die Ergebnisse der Immunfärbungen mit dem polyklonalen Ziege-anti-LRRC26-Antikörpers (Q-15) in Kofärbung mit dem Maus-anti-BK Antikörper dargestellt.

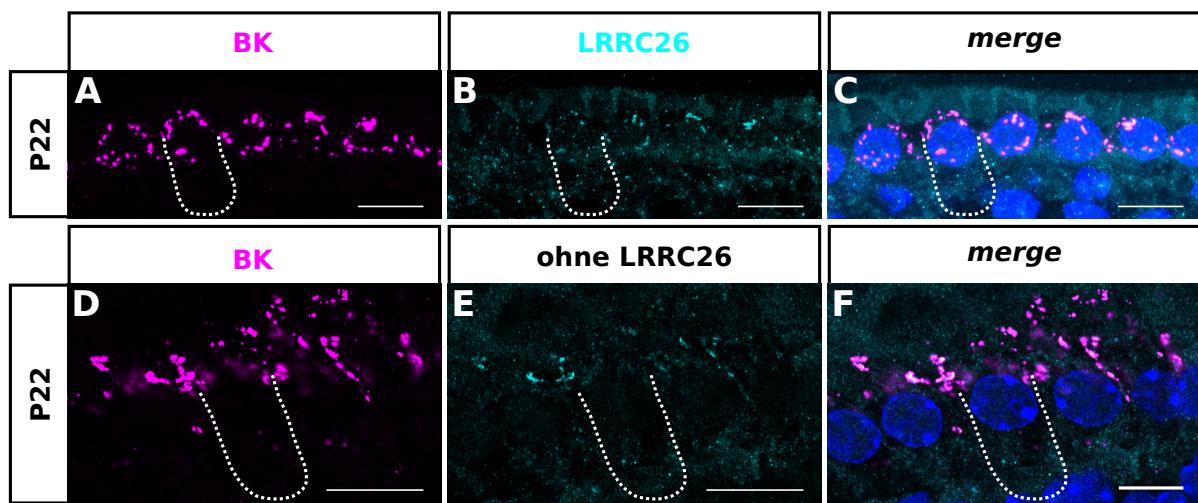


Abbildung 37: Überprüfung eines kommerziellen LRRC26-Antikörpers in IHZ von NMRI-Mäusen

A-C, D-F, einzelner optischer Schnitt immunhistochemischer Färbungen von jeweils 5 IHZ von *whole mount* Corti-Organen von 22 Tage alten NMRI-Mäuse. Teilweise Kolokalisation von BK (A, D, markiert mit Maus-anti-BK und Alexa555-anti-Maus IgG, dargestellt in lila) und LRRC26 (B, E, markiert mit Ziege-anti-LRRC26 und Alexa488-anti-Ziege IgG, dargestellt in türkis) am Hals der IHZ in An- (B, C) und Abwesenheit (E, F) des LRRC26-Primärantikörpers. Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur in den Überlagerungsbildern dargestellt (C, F). Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 µm.

Die Darstellungen (Abb. 37) zeigen jeweils Ausschnitte einer *MIP* eines Corti-Organs von jeweils fünf IHZ und deren blau gefärbten Zellkerne in den Überlagerungsbildern (Abb. 37 C, F). In der Doppelfärbung konnte die BK-Färbung mit ihren charakteristischen Clustern im Halsbereich der IHZ detektiert werden (A). Von der etwas stärkeren Hintergrundfärbung in der LRRC26-Färbung hoben sich intensiver gefärbte Signale für LRRC26 ebenfalls am Hals der IHZ (B) ab. Diese überlagerten durchgehend mit den BK-positiven Signalen (C). In der Einzelfärbung für BK (D) wurden im Fluoreszenzkanal, welcher bei 488 nm Fluoreszenzmoleküle anregt (zur besseren Veranschaulichung in türkis dargestellt), ebenfalls Punkte im Bereich der BK-Kanal-Cluster nachgewiesen (E, F). Diese Signale wurden mit den Einstellungen „Best Signal“ (Emissionsspektren: DAPI-Kanal (405): 410-507 nm; AF488-Kanal (488): 492-570 nm; Cy3-Kanal (561): 566-697 nm) von Zeiss detektiert, obwohl kein primärer LRRC26-Antikörper verwendet wurde („*bleed through*“). Die Überlagerung der beiden Farbkanäle (488, grün und 561, rot) in Abwesenheit eines Primärantikörpers belegte demnach, dass die detektierte Kolokalisation von BK und LRRC26 (Abb. 37 A-C) ein Aufnahmeartefakt und somit nicht aussagekräftig war. Um ähnliche unspezifische Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Sperrfilter in den weiteren Versuchen stringenter gesetzt (Emissionsspektren: DAPI-Kanal (405): 410-470 nm; AF488-Kanal (488): 492-541 nm; Cy3-Kanal (561): 561-681 nm). Damit wurde ein unabhängiger Nachweis beider Fluoreszenzkanäle für die folgenden Analysen sichergestellt.

Zusätzlich zu dem Ziege-anti-LRRC26-Antikörper (Q-15) wurden drei weitere kommerziell erhältliche Antikörper in immunhistochemischen Experimenten an ca. drei Wochen alten NMRI-Mäusen getestet: eine neue Charge des kommerziellen Ziege-anti-LRRC26-Antikörper (Q-15), ein polyklonaler Ziege-anti-LRRC26-Antikörper (K-12) ebenfalls von der Firma Santa Cruz und ein polyklonaler Kaninchen-anti-LRRC26 von der Firma Alomone. Für diese Antikörper konnte trotz Variationen in den Fixier-, Blockier- oder Inkubationsbedingungen keine spezifische LRRC26-positive Färbung ausfindig gemacht werden und sind somit hier nicht weiter aufgeführt.

3.4 Charakterisierung von LRRC52-Protein in unreifen und ausgereiften inneren Haarsinneszellen

Die vorangehenden Ergebnisse aus den Transkriptanalysen von Corti-Organen und inneren Haarsinneszellen deuteten daraufhin, dass LRRC52 eine neue γ -Untereinheit der BK-Kanäle in den IHZ darstellen und den BK-Kanal modulieren könnte. Durch die nachfolgenden Versuche sollte LRRC52 als potentielle modulatorische Untereinheit des BK-Kanals mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen analysiert werden. Da keine Primärantikörper gegen die Maus-Sequenz für LRRC52 verfügbar waren, wurden für LRRC52 zu Beginn zwei kommerzielle, gegen die menschliche LRRC52-Sequenz gerichtete, Antikörper (ein polyklonaler Ziege-anti-LRRC52-Antikörper von der Firma Santa Cruz und ein polyklonaler Kaninchen-anti-LRRC52 von der Firma Origene Origene) getestet. Eine spezifische Färbung für LRRC52 in IHZ von Maus war jedoch mit keinem dieser Antikörper möglich. Dies kann durch die geringe Sequenzhomologie von LRRC52 von nur 73 % zwischen Mensch und Maus begründet werden. Aufgrund der positiven Nachweise von LRRC52-mRNA in reifen Corti-Organen sowie in reifen IHZ synthetisierte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Jung (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg) zwei polyklonale, gegen die Maus-Sequenz gerichtete, Kaninchen-anti-LRRC52-Antiseren. Ein Antiserum (#1567) wurde in Anlehnung an (Zeng et al., 2011) und das zweite (#1566) mit Hilfe bioinformatischer Parameter entwickelt. Die anschließend aufgeführten Ergebnisse wurden mit dem LRRC52-Serum #1567 nach der dritten Immunisierung, welches im Folgenden als „LRRC52-Antikörper“ bezeichnet wird, durchgeführt. Mit Hilfe der folgenden Experimente sollte eine Aussage darüber getroffen werden, ob LRRC52 auch auf Proteinebene in reifen IHZ nachgewiesen werden kann.

3.4.1 Validierung des LRRC52-Antikörpers in Hodengewebe

Aus elektrophysiologischen Messungen sowie Co-Immunpräzipitation war bereits bekannt, dass das LRRC52-Protein selektiv in Spermienzellen exprimiert wird und dort den Kaliumkanal SLO3 moduliert (Yang et al., 2011). Yan und Aldrich konnten im Jahr 2012

zusätzlich feststellen, dass LRRC52-mRNA vor allem und in großer Menge in Hodengewebe vorliegt (Yan und Aldrich, 2012).

In diesem Versuchsteil sollte die Spezifität des synthetisierten LRRC52-Antikörpers (#1567) immunhistochemisch an Hoden-Kryoschnitten von neun bis zwölf Wochen alten 129B6F1-WT-Mäusen untersucht werden (Abb. 38). Zum Ausschluss von Färbeartefakten wurden Einzelfärbungen mitgeführt, in denen kein LRRC52-Primärantikörper, jedoch beide Sekundärantikörper aus den dazugehörigen Kofärbungen verwendet wurden.

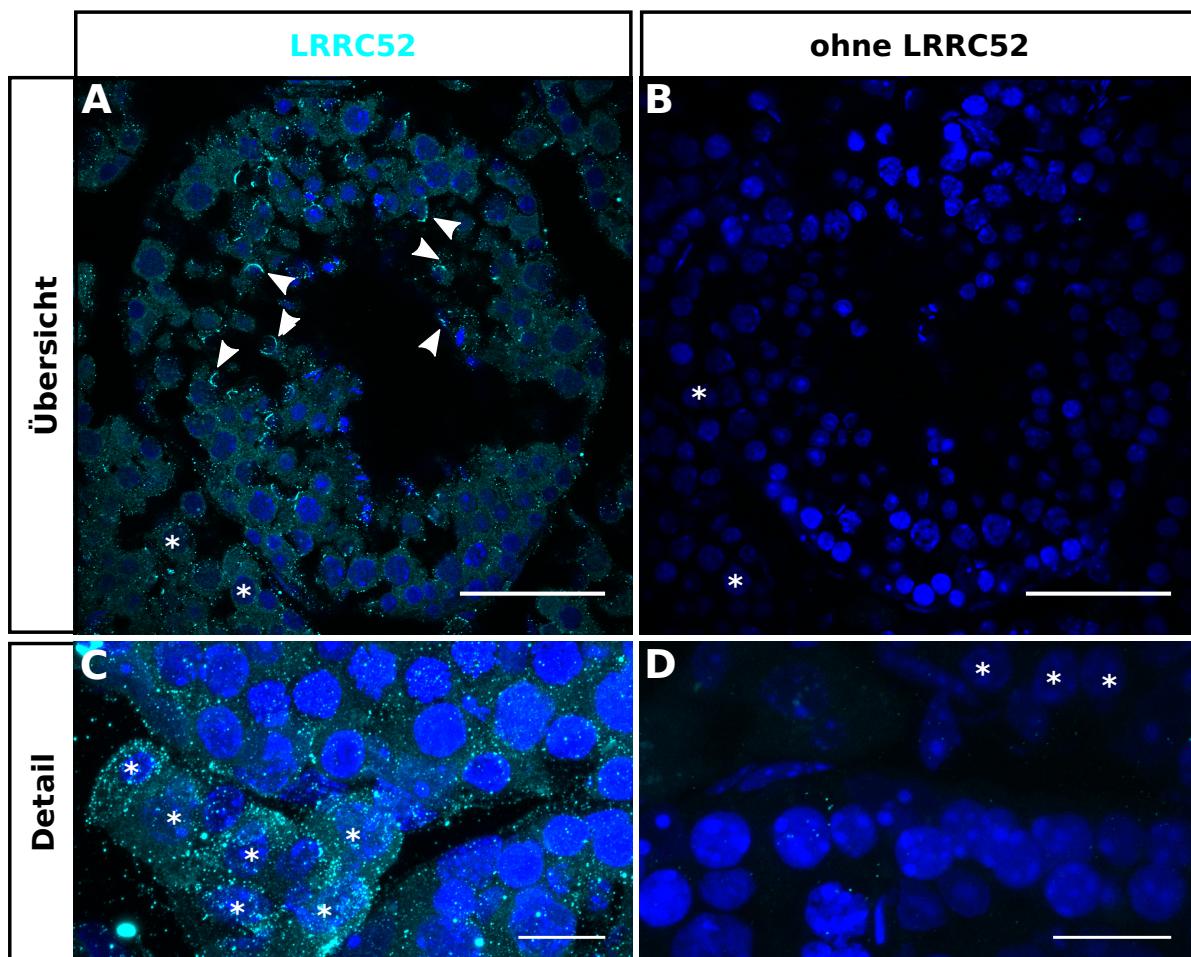


Abbildung 38: Validierung des LRRC52-Antiserums #1567 in Kryoschnitten des Hodens drei Monate alter männlicher Wildtyp-Mäuse (129B6F1-Hintergrund)

Zwei einzelne optische Schnitte einer immunzytochemischen Färbung von Hoden-Kryoschnitten. **A**, Expression von LRRC52 (markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, türkis) in Hodenkanälen: Spermatozyten, Spermatogonien (Pfeilspitzen), Interstitialraum mit Leydig-Zellen (Sterne). **B**, Keine signifikante Färbung in Negativkontrollen ohne primären LRRC52-Antikörper. **C, D**, Ausschnitte aus A und B als *MIP* belegen die Expression von LRRC52 in den Hodenkanälchen/Leydig-Zellen (Sterne) in Anwesenheit des LRRC52-Antikörpers (C), die in der Negativkontrolle für LRRC52 fehlte (D). Diese Beobachtung wurde an dieser Altersstufe an insgesamt 4 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Zur Vereinheitlichung wurde das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis dargestellt. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken A, B: 50 µm, C, D: 15 µm.

Die Übersichtsbilder stellen einen Querschnitt durch die Hodenkanäle in einem Kryoschnitt von Wildtyp-Tieren dar und zeigen, wie auch die *MIPs* ihrer Vergrößerungen, in blau die

Zellkerne. Der synthetisierte LRRC52-Antikörper färbte die Spermatozyten und Spermatogonien (weiße Pfeile) in den Hodenkanälen (A) spezifisch. In der *MIP* der Vergrößerung war in den Leydig-Zellen (weiße Sterne) im Interstitialraum ebenfalls eine positive Färbung für LRRC52 sichtbar (C). Die Kontrollfärbung ohne LRRC52-Primärantikörper zeigte sowohl in der Übersicht (B) als auch in der Vergrößerung (D) keine spezifische LRRC52-Färbung.

In diesem Versuchsteil konnte die Spezifität des von Prof. Martin Jung hergestellten polyklonalen Kaninchen-anti-LRRC52-Antikörpers im Hodengewebe validiert werden und damit für die weiteren Analysen an IHZ eingesetzt werden.

3.4.2 Lokalisation von LRRC52 im Corti-Organ von Wildtyp-Mäusen

In heterologen Expressionssystemen konnten Yan und Aldrich im Jahr 2012 belegen, dass unter anderem das Protein LRRC52 BK-Kanäle moduliert und deren Aktivierung um 100 mV in Richtung negativer Potentiale verschiebt (Yan und Aldrich, 2012). Zusätzlich konnten in Kapitel 3.2.1 und 3.2.6 LRRC52-Transkripte in ausgereiften Corti-Organen sowie in reifen IHZ nachgewiesen werden. Mit dem an Hodengewebe validierten (s. Kap. 3.4.1) LRRC52-Serum nach der dritten Immunisierung (#1567) sollte in den folgenden immunhistochemischen Versuchen analysiert werden, ob LRRC52 auch in IHZ exprimiert wird. Da in einem polyklonalen Antiserum unabhängig von der Immunisierung erfahrungsgemäß schon eine Vielzahl von Antikörpern vorliegt, wurde dem Versuchstier ein sogenanntes Prä-Immunserum entnommen. In diesem Prä-Immunserum liegen die bereits im Serum des Kaninchens vorhandenen oder durch weitere ungewollte Immunisierungen generierten Antikörper vor. Mit Hilfe dieser Kontrolle war es möglich, zumindest die vor der Immunisierung im Serum des Kaninchens enthaltenen Antikörper als kreuzreagierende Antikörper im eigentlichen Testserum auszuschließen.

In Abbildung 39 ist die immunhistochemische Färbung mit dem Prä-Immunserum sowie dem BK-Antikörper an Corti-Organen 18 Tage alter NMRI-Mäuse aufgezeigt.



Abbildung 39: Validierung des Prä-Immunsers um das LRRC52-Peptidantigen zu erkennen

MIP einer immunzytochemischen Färbung von 10 IHZ eines *whole mount* Corti-Organs 18 Tage alter NMRI-WT-Mäuse. **A**, Clusterförmige BK-Expression (markiert mit Maus-anti-BK, lila) im Halsbereich der IHZ. **B**, Keine Färbung mit dem LRRC52-Kontrollserum (markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, türkis). **C**, Keine Anregung der Cy3-Fluoreszenz durch die AF488-Fluoreszenz. Diese Beobachtung wurde für diese Altersstufe an insgesamt 3 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur im Überlagerungsbild dargestellt (C). Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. Zur Vereinheitlichung wurde das mit AF488-aufgenommene Fluorophor in lila und das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis dargestellt. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 µm.

Die Abbildung 39 zeigt einen Ausschnitt einer *MIP* von acht IHZ eines Corti-Organs mit deutlich erkennbaren blau gefärbten Zellkernen im Überlagerungsbild (C). Am Hals der IHZ war die charakteristische clusterförmige BK-Färbung zweifelsfrei zu erkennen (A, C). Für das Prä-Immunsrum konnte weder eine spezifische Färbung noch eine hohe unspezifische Hintergrundfärbung ausgemacht werden (B). Dies erleichterte die anschließende Visualisierung und Interpretation der Färbungen mit dem LRRC52-Testserum, da möglicherweise im Testserum bereits vorliegende kreuzreagierende Antikörper keine störenden Signale lieferten.

Mit Hilfe des an Hodengewebe validierten 3. LRRC52-Serums (s. Kap. 3.4.1) sollte in immunhistochemischen Versuchen anschließend die Expression von LRRC52 in IHZ analysiert werden. Dazu wurden 18 bis 28 Tage alte Corti-Organe simultan mit LRRC52- und Otoferlin-Antikörper gefärbt (Abb. 40). Um Färbeartefakte auszuschließen wurden Einzelfärbungen mitgeführt, in denen kein Otoferlin-Primärantikörper, jedoch beide Sekundärantikörper aus den dazugehörigen Kofärbungen verwendet wurden.

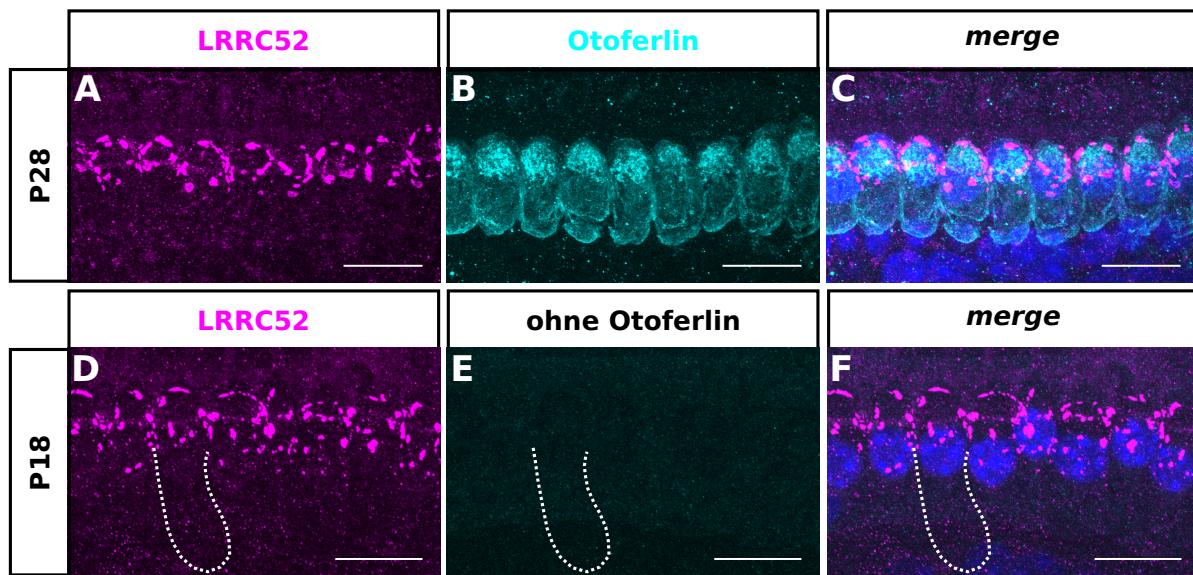


Abbildung 40: Lokalisation des LRRC52-Proteins in IHZ von NMRI-Mäusen

MIP immunhistochemischer Färbungen von jeweils 7 IHZ von *whole mount* Corti-Organen 18 und 28 Tage alter NMRI-WT-Mäuse. Clusterförmige Expression von LRRC52 (**A, C, D, F**, markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, lila) in Anwesenheit (**B, C**, markiert mit Maus-anti-Otoferlin, türkis) oder Abwesenheit des IHZ-Markers Otoferlin (**E**, **F**) am Hals der IHZ. Diese Beobachtung wurde für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur in den Überlagerungsbildern dargestellt (**C, F**). Weiße Punkte in **D-F** markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 µm.

Dargestellt sind jeweils die Ausschnitte einer *MIP* von sieben IHZ eines Corti-Organs und deren blau gefärbten Zellkerne in den Überlagerungsbildern (Abb. 40 C, F). Ähnlich der charakteristischen BK-Färbung am Hals der IHZ konnte auch für LRRC52 eine clusterförmige Färbung in den IHZ nachgewiesen werden (**A**). Als Positivkontrolle wurde der HZ-Marker Otoferlin (**B**) mitgeführt, der in der Überlagerung die LRRC52-Färbung im Halsbereich der IHZ bestätigte (**C**). Auch in der Einzelfärbung waren die LRRC52-positiven Cluster (**D**) oberhalb der Zellkerne deutlich erkennbar (**F**).

Diesen Untersuchungen zu Folge konnte der in Kapitel 3.4.1 überprüfte Antikörper das LRRC52-Protein selektiv im Halsbereich reifer IHZ nachweisen.

3.4.3 Entwicklungsabhängige Lokalisation von LRRC52-Protein im Corti-Organ von Wildtyp-Mäusen

Wie bereits bekannt, kommt es um Hörfunktionsbeginn (P12) zu einer intensiven punktförmigen Expression von BK-Kanälen am Hals der IHZ (Kros et al., 1998; Langer et al., 2003; Marcotti et al., 2003b), die sich mit zunehmendem Alter clusterförmig ausbreiten. Somit lag die Vermutung nahe, dass LRRC52, wie auch die BK-Kanäle, entwicklungsabhängig zur Expression gebracht wird.

Diese Annahme sollte im folgenden Experiment an NMRI-Mäusen unterschiedlicher Altersstufen mit dem für diese Arbeit synthetisierten und validierten polyklonalen LRRC52-Antikörper überprüft werden. Dazu wurden 10, 12 und 19 Tage alte NMRI-Mäuse mit LRRC52- und BK-Antikörpern simultan gefärbt (Abb. 41).

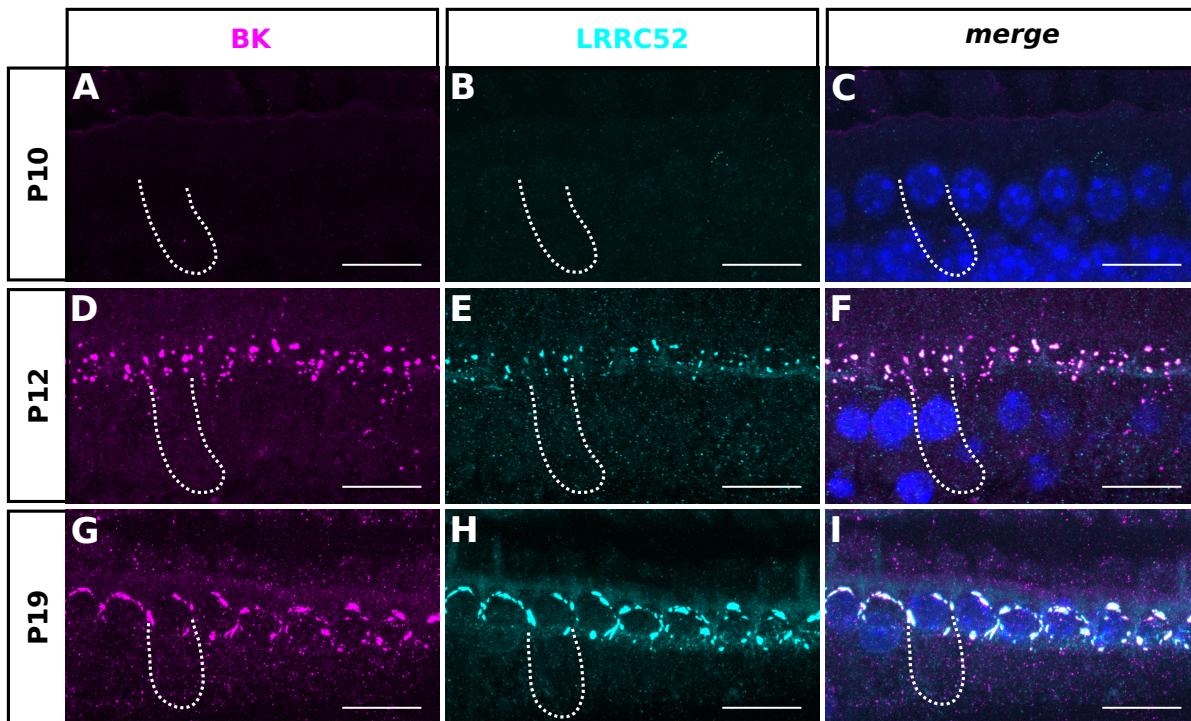


Abbildung 41: Lokalisation von BK-Kanälen und LRRC52 in IHZ von NMRI-Mäusen vor und nach Hörbeginn

MIPs immunhistochemischer Färbungen von jeweils 7 IHZ von *whole mount* Corti-Organen 10, 12 und 19 Tage alter NMRI-Mäuse. **A-C**, Keine BK- (A, markiert mit Maus-anti-BK, lila) und LRRC52-Expression (B, markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, türkis) oder Kolokalisation (C) bei Mäusen vor Hörfunktionsbeginn (an P10), hier gezeigt für P10. **D-F**, Punktformige Expression von BK (D) und LRRC52 (E) sowie Kolokalisation beider Proteine (F) am Hals IHZ zu Hörbeginn (P12). **G-I**, Clusterförmige Ausbreitung der BK- (G) und LRRC52-Expression (H) wie auch eine konstante Kolokalisation beider Proteine am Hals der IHZ mit voranschreitender Entwicklung (hier gezeigt für P19; I). Diese Ergebnisse wurden für diese Altersstufen an mindestens 3 Individuen gefunden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur in den Überlagerungsbildern dargestellt (C, F, I). Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. Zur Vereinheitlichung wurde das mit AF488-aufgenommene Fluorophor in lila und das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis dargestellt. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 µm.

Die Abbildungen (Abb. 41) zeigen jeweils die *MIPs* von sieben IHZ von Corti-Organen aus unterschiedlichen Altersstufen und deren blau gefärbten Zellkerne in den Überlagerungsbildern (Abb. 41 C, F, I). Noch gehörlöse Mäuse (P10) wiesen weder eine spezifische BK- noch eine spezifische LRRC52-Färbung auf (A-C). Bei Mäusen zu Hörbeginn (P12) waren für beide Proteine überlappende punktförmige Signale im Halsbereich der IHZ detektierbar (D-F). Mit voranschreitendem Alter der Mäuse (P19) ging auch eine Ausbreitung der BK- und LRRC52-positiven Signale zu größeren Clustern am Hals

der IHZ einher (G-I). An P12 und P19 kolokalisierte die Färbung für BK-Kanäle mit der für das LRRC52-Protein im Halsbereich der IHZ größtenteils.

Hiermit wurde eindeutig bestätigt, dass das LRRC52-Protein parallel zur Hochregulation der BK-Kanäle entwicklungsabhängig in IHZ exprimiert wird.

3.4.4 Lokalisation von LRRC52-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von BK α -defizienten Mäusen

Die in Kapitel 3.4.3 festgestellte entwicklungsabhängige Expression von LRRC52 legt die Vermutung nahe, dass BK-Kanäle möglicherweise essentiell für die LRRC52-Expression sind und beide Proteine somit zeitgleich und in Abhängigkeit voneinander gebildet werden.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Corti-Organe 22 Tage alter BK α -defizienter Mäuse ($BK\alpha^{-/-}$) und deren Kontrolltiere simultan mit BK- und LRRC52-Antikörper gefärbt (Abb. 42). Als Positivkontrolle und um Färbeartefakte auszuschließen, wurde LRRC52 auch in Kofärbung mit dem HZ-Marker Otoferlin getestet.

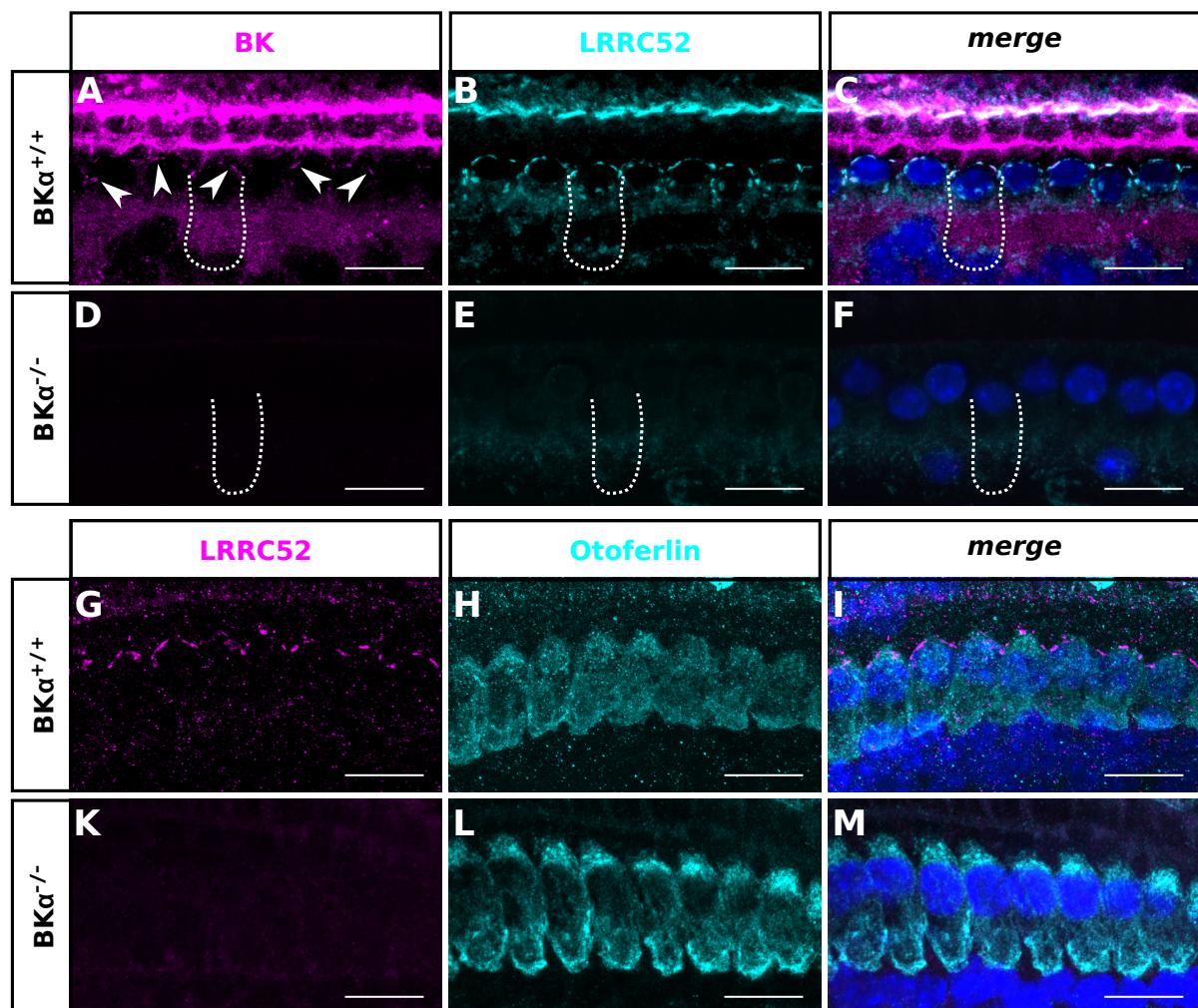


Abbildung 42: Lokalisation von BK-Kanälen und LRRC52 in IHZ von BK α -defizienten Mäusen

MIPs immunhistochemischer Färbungen von jeweils 8 IHZ von *whole mount* Corti-Organen 22 Tage alter BK α -defizienter Mäuse. **A-C**, Expression von BK-Kanälen (markiert mit Maus-anti-BK, lila, Pfeilspitzen) und LRRC52 (markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, türkis) am Hals der Haarsinneszellen von BK $\alpha^{+/+}$ -Mäusen. Starke unspezifische Färbung beider Antikörper-Kombinationen an den Kutikularplatten der IHZ. **D-F**, Keine BK- und LRRC52-Expression in BK $\alpha^{-/-}$ -Tieren. **G-I**, Expression von LRRC52 (markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, lila) im Halsbereich der IHZ (markiert mit Maus-anti-Otoferlin, türkis) von BK $\alpha^{+/+}$ -Mäusen. **K-M**, Keine LRRC52-Expression in Anwesenheit der Otoferlin-Färbung in IHZ von BK $\alpha^{-/-}$ -Mäusen. Zur Vereinheitlichung wurde das mit AF488-aufgenommene Fluorophor in lila und das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis dargestellt (A-F). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an je 3 Individuen jedes Genotyps bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur in den Überlagerungsbildern dargestellt (C, F, I, M). Weiße Punkte in A-F markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 μ m.

In Abbildung 42 sind jeweils die MIPs von acht IHZ von Corti-Organen aus BK α -defizienten Mäusen mit blau gefärbten Zellkernen in den Überlagerungsbildern (C, F, I, M) gezeigt. Bei den BK $\alpha^{+/+}$ -Tieren war deutlich eine überlappende Färbung (C) von BK-Kanälen (A) mit LRRC52 (B) am Hals der IHZ zu erkennen. Die intensive Färbung im oberen Bildbereich oberhalb der Zellkerne ist auf die unspezifische Bindung der beiden Sekundärantikörper an

die Stereozilien sowie an die Kutikularplatte der IHZ zurückzuführen und können somit vernachlässigt werden. Die BK $\alpha^{-/-}$ -Tiere wiesen dagegen keine BK- oder LRRC52-Signale auf (D-F; n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 8 IHZ). Der HZ-Marker Otoferlin (H) bestätigte als unabhängige Kontrolle die clusterförmige LRRC52-Färbung im Halsbereich der IHZ bei den Kontrolltieren (G, I). Durch die erfolgreiche Otoferlin-Färbung (L) in IHZ von BK α -KO-Mäusen wurde die Abwesenheit einer LRRC52-Färbung (K, M) in diesen Tieren eindeutig belegt (n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 8 IHZ).

In diesem Versuchsteil wurde dargelegt, dass LRRC52 ausschließlich in BK-positiven IHZ exprimiert wird. Die BK-Kanäle sind demnach für die korrekte und dauerhafte Lokalisation von LRRC52 in der Plasmamembran von IHZ unabdingbar.

3.4.5 Überprüfung von LRRC52-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Ca_v1.3-defizienten Mäusen

Als letzte immunhistochemische Analyse wurde der LRRC52-Antikörper auf *whole mount* Präparaten von Ca_v1.3-defizienten (Ca_v1.3 $^{-/-}$) Mäusen eingesetzt. In diesen Mäusen kommt die vorherrschende α 1-Kanalpore Ca_v1.3 nicht zur Expression (Platzer et al., 2000). Die Ca_v1.3 $^{-/-}$ -Mäuse sind für die Fragestellung dieser Arbeit interessant, da sie keine BK-Kanäle exprimieren (Brandt et al., 2003) und somit die Aussage aus dem vorherigen Kapitel (3.4.4) zusätzlich bestätigt oder auch widerlegt werden kann. Aufgrund der bereits bekannten Degeneration von IHZ in einem Alter von vier Wochen (Nemzou N. et al., 2006) wurden 23 Tage alte Mäuse verwendet. Zur Überprüfung der LRRC52-Expression in Ca_v1.3 $^{-/-}$ -Mäusen wurden IHZ von Ca_v1.3-KO-Tieren und deren Kontrolltieren simultan mit LRRC52- und BK- oder Otoferlin-Antikörper gefärbt (Abb. 43). Die Genotypen der Mäuse wurden zusätzlich zur Genotypisierung mit Hilfe des Ca_v1.3-Antikörpers überprüft.

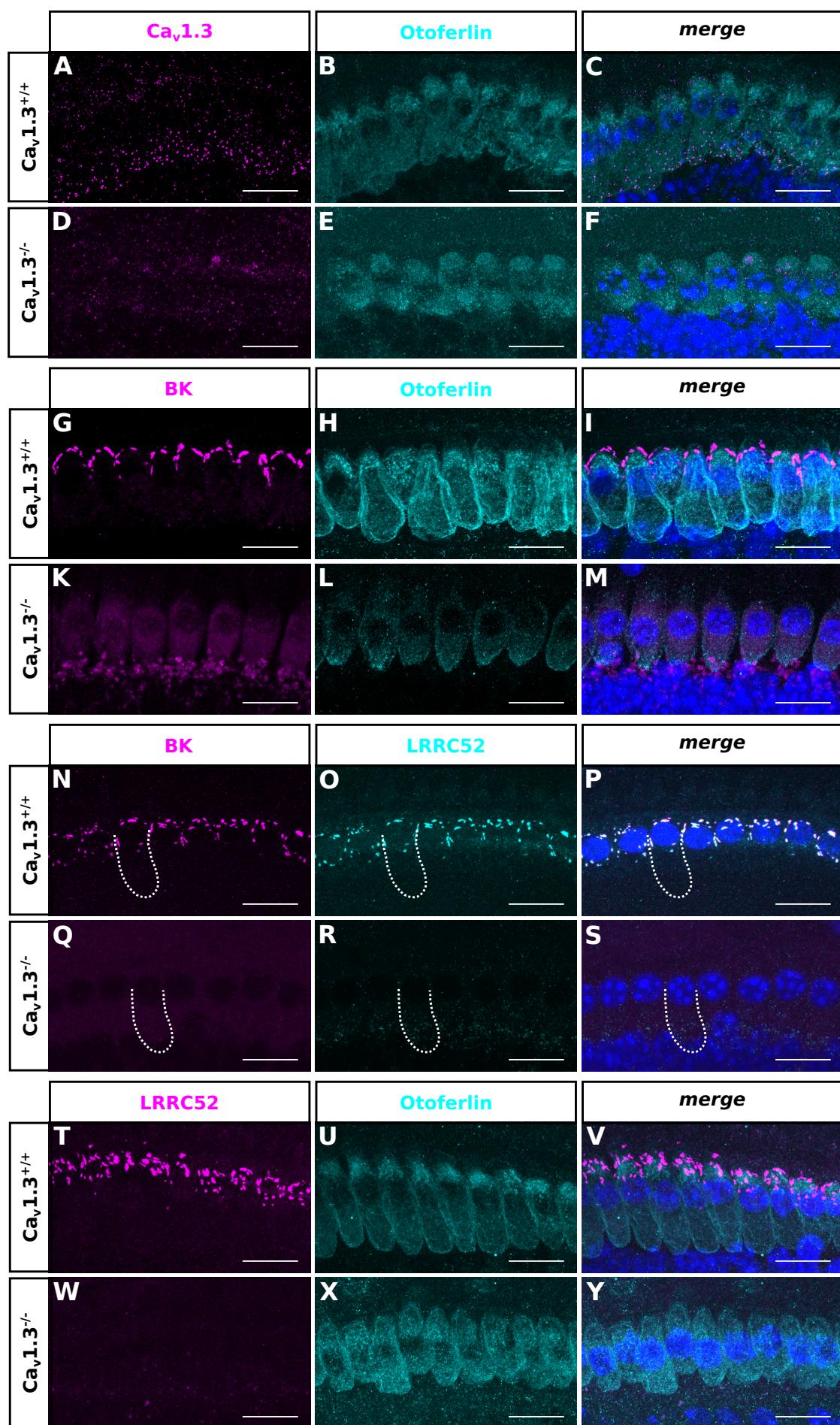


Abbildung 43: Überprüfung der Lokalisation von BK-Kanälen und LRRC52 in IHZ von Ca_v1.3-defizienten Mäusen

MIPs immunhistochemischer Färbungen von jeweils 7 bis 8 IHZ von *whole mount* Corti-Organen 23 Tage alter Ca_v1.3-defizienter-Mäuse. **A-C**, Expression von Ca_v1.3-Kanälen (markiert mit Kaninchen-anti-Ca_v1.3, lila) am synaptischen Pol IHZ einer Ca_v1.3^{+/+}-Maus (IHZ markiert mit Maus-anti-Otoferlin, türkis). **D-F**, Keine Ca_v1.3-Expression in IHZ einer Ca_v1.3-KO-Maus. **G-I**, Expression von BK-Kanälen (markiert mit Kaninchen-anti-BK, lila) am Hals von IHZ in Kontrolltieren. **K-M**, Bouton-artige BK-Expression am synaptischen Pol IHZ einer Ca_v1.3^{-/-}-Maus. **N-P**, BK- (markiert mit Maus-anti-BK, lila) und LRRC52- (markiert mit Kaninchen-anti-LRRC52, türkis) Expression im Halsbereich IHZ einer Ca_v1.3^{+/+}-Maus. **Q-S**, Keine BK- und LRRC52-Expression in IHZ einer Ca_v1.3^{-/-}-Maus. **T-V**, Expression von LRRC52-Protein am Hals IHZ eines Ca_v1.3^{+/+}-Tiers. **W-Y**, Keine LRRC52-Expression in IHZ einer Ca_v1.3^{-/-}-Maus. Zur Vereinheitlichung wurde das mit AF488-aufgenommenen Fluorophor in lila und das mit Cy3-aufgenommene Fluorophor in türkis dargestellt (N-S). Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an insgesamt 2 Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind nur in den Überlagerungsbildern dargestellt (C, F, I, M, P, S, V, Y). Weiße Punkte in N-S markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 µm.

Die vorhergehende Darstellung (Abb. 43) zeigt jeweils die *MIPs* von acht IHZ von Ca_v1.3-KO- und Ca_v1.3-WT-Tieren und deren blau gefärbten Zellkerne in den Überlagerungsbildern (C, F, I, M, P, S, V, Y). Durch die Kofärbung von Ca_v1.3 (A) mit Otoferlin (B) konnte in Ca_v1.3^{+/+}-Tieren eine punktförmige Ca_v1.3-Färbung am synaptischen Pol der IHZ (C) identifiziert werden. Die Abwesenheit der Färbung für die Ca_v1.3-Kanalpore in den Ca_v1.3^{-/-}-Tieren (D-F) bestätigte die Genotypen der Mäuse zusätzlich zur vorhergehenden Genotypisierung. Allerdings lieferte der anti-Ca_v1.3-Antikörper eine merkliche unspezifische Hintergrundfärbung (Ab. 29 D). Die spezifische clusterförmige BK-Färbung am Hals der IHZ (G) war ebenfalls nur bei den Kontrolltieren zu finden (H, I). In den KO-Mäusen war durch das Fehlen von BK-Kanälen auch keine spezifische BK-Färbung im Halsbereich der IHZ zu erkennen (K-M). Allerdings zeigten die Ca_v1.3^{-/-}-Tiere schwächere und leicht kugelförmige BK-positive Signale (K) unterhalb des synaptischen Pols der IHZ (M; n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 8 IHZ). Dieses Auftreten war nur für die Färbungen mit dem Kaninchen-anti-BK-Antikörper zu verzeichnen, nicht aber mit dem BK-Antikörper aus der Spezies Maus. Vermutlich handelt es sich um BK-Kanäle in den efferenten Boutons der IHZ von Ca_v1.3^{-/-}-Mäusen, die dort mehrere Wochen persistieren, im Gegensatz zu Ca_v1.3^{+/+}-Tieren, in welchen sie mit Hörbeginn verschwinden (Katz et al., 2004; Nemzou N. et al., 2006). In der Doppelfärbung mit dem BK- und LRRC52- Antikörper konnten in den Ca_v1.3^{+/+}-Tieren die clusterförmigen Signale am Hals der IHZ für beide Proteine (N-P) nachgewiesen werden. Die Ca_v1.3^{-/-}-Mäuse zeigten dagegen keine Färbungen für BK und LRRC52 (Q-S; n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 8 IHZ). Die Spezifität der clusterförmigen LRRC52-Färbung im Halsbereich der IHZ von Wildtyp-Mäusen (T, V) wurde durch die Doppelfärbung mit dem HZ-Marker Otoferlin (U, V) erneut bestätigt. Mit Hilfe dieser Färbung auch in den KO-Mäusen wurde zusätzlich das Ausbleiben einer spezifischen

LRRC52-Färbung in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Tieren (W-Y) eindeutig belegt ($n = 3$ Tiere pro Genotyp mit je 8 IHZ). Anhand der Otoferlin-Färbungen war zusätzlich in allen Experimenten erkennbar, dass die IHZ der $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäuse kürzer waren und einen reduzierteren basalen Pol aufwiesen als bei den Kontrolltieren (E, F, L, M, X, Y; $n = 3$ Tiere pro Genotyp mit je 8 IHZ) (Brandt et al., 2003).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zusätzlich zur bereits bekannten Abwesenheit der BK-Kanäle auch das Protein LRRC52 in $\text{Ca}_v1.3$ -defizienten Tieren nicht nachzuweisen war und unterstützen damit die Vermutung, dass BK-Kanäle in IHZ eine Voraussetzung für die korrekte und dauerhafte Lokalisation des LRRC52-Proteins in der Plasmamembran darstellen.

3.5 Interaktion von BK-Kanälen und LRRC52-Protein mit Hilfe des *in situ Proximity Ligation Assay*

Der Nachweis der Kolokalisation von BK-Kanälen mit dem Protein LRRC52 in den vorhergehenden immunhistochemischen Versuchen wird durch eine laterale Auflösung von ungefähr 250 nm am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) begrenzt (Fernández-Suárez und Ting, 2008). Zu Verifizierung dieser Ergebnisse wurde als weitere alternative Darstellung der räumlichen Nähe beider Proteine der „*in situ Proximity Ligation Assay (is-PLA)*“ verwendet. Bei diesem Assay handelt es sich um eine qualitative Methode, die immunhistochemische und molekularbiologische Ansätze vereint. Mit Hilfe des *is-PLA* ist es möglich Protein-Protein-Interaktionen mit einem räumlichen Abstand von unter 40 nm nachzuweisen (Söderberg et al., 2006), womit er eine wesentlich höhere Sensitivität als immunhistochemische Analysen besitzt. Diese Interaktion wird durch die Detektion eines fluoreszenzmikroskopischen Signals erreicht und ist zusammenfassend in der folgenden Abbildung grafisch dargestellt (Abb. 44).

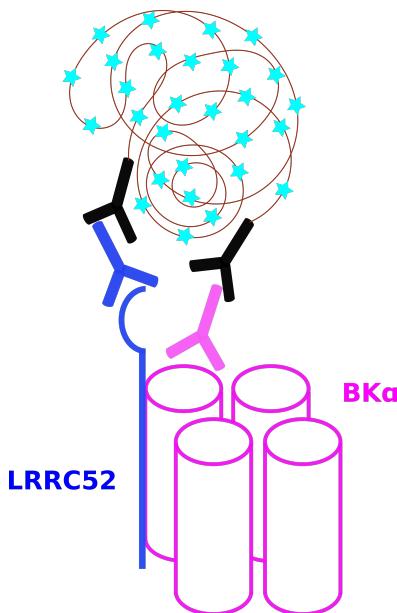


Abbildung 44: Schema des Prinzips des *is*-PLA

Der Nachweis zweier räumlich nahe gelegener Epitope (BK: lila, LRRC52: blau) erfolgt durch immunhistochemische Bindung der Primärantikörper (PAK) aus zwei verschiedenen Spezies an die entsprechenden Epitope der Zielproteine. Es folgt die Konjugation der Spezies-unterscheidenden PLUS- und MINUS-PLA Probes (schwarz) an die PAK mit anschließender *rolling-circle amplification* (RCA) zur Bildung eines DNA-Konstruktes (braun) beim Vorliegen einer räumlichen Entfernung beider Proteine von unter 40 nm. Die Detektion erfolgt über die Hybridisierung von mit fluoreszenzmarkierten und zu dem DNA-Konstrukt komplementären Sonden (türkis-farbige Sterne) am LSM.

3.5.1 Räumliche Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Wildtyp-Mäusen

Für den *is*-PLA wurden *whole mount* Corti-Organe 22 Tage alter NMRI-Mäuse mit einem monoklonalen BK- und dem synthetisierten polyklonalen LRRC52-Antikörper markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Positivkontrolle wurden zwei BK-Antikörper aus verschiedenen Spezies (monoklonal Maus und polyklonal Kaninchen) und die einzelnen Antikörper eigenständig als Negativkontrollen verwendet.

In der folgenden Abbildung (Abb. 45) sind die Ergebnisse des *is*-PLAs mit diesen Antikörper-Kombinationen für ausgereifte IHZ von NMRI-Mäusen dargestellt.

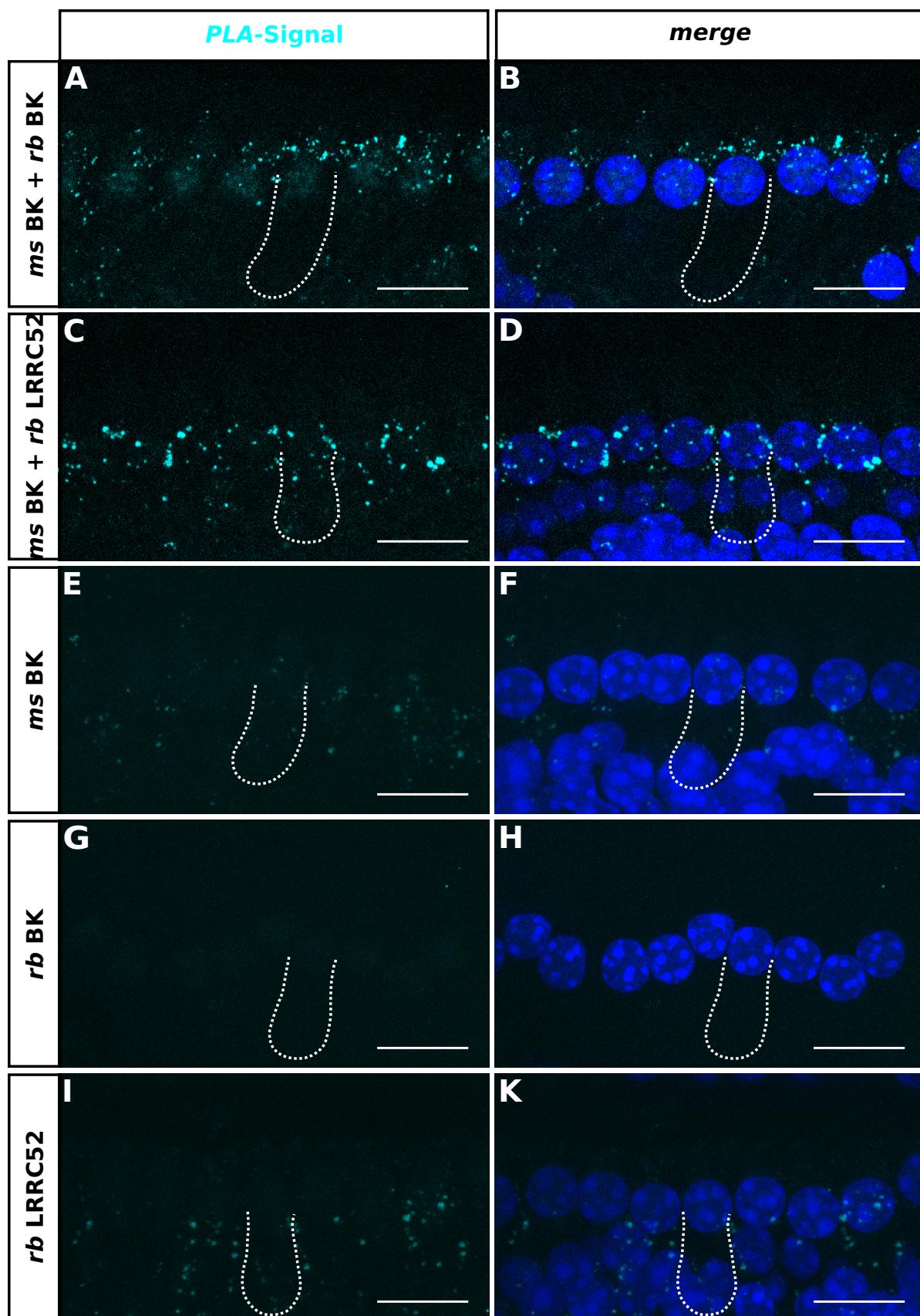


Abbildung 45: Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 in IHZ von NMRI-Mäusen

MIPs des *is*-PLA an 6 bis 9 IHZ von *whole mount* Corti-Organen 22 Tage alter NMRI-Mäuse. Die räumliche Interaktion zwischen zwei Proteinen ist an den punktförmigen, türkisfarbigen Signalen (PLA-Signale) zu erkennen. **A-D**, Intensive Fluoreszenz-Signale für den Nachweis von BK-Kanälen mit zwei Spezies-verschiedenen Antikörpern (anti-Maus-BK,

anti-Kaninchen-BK) als Positivkontrolle (A, B) sowie für die räumliche Nähe von BK-Kanälen mit LRRC52 (C, D, anti-Maus-BK, anti-Kaninchen-LRRC52). **E–K**, Wenig intensive bis keine Fluoreszenz-Signale für die drei Einzelfärbungen (E, F, anti-Maus-BK; G, H, anti-Kaninchen-BK; I, K, anti-Kaninchen-LRRC52) der Negativkontrollen. Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an 4 (A–D), 3 (E–H) und 2 (I, K) Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden zur Visualisierung mit DAPI gefärbt (rechte Spalte, *merge*). Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. *ms*: Maus; *rb*: Kaninchen. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 µm.

In den vorhergehenden Abbildungen (Abb. 45) sind die *MIPs* der jeweiligen *is-PLAs* von sechs bis neun IHZ eines Corti-Organs und deren blau gefärbten Zellkerne in den Überlagerungsbildern (B, D, F, H, K) dargestellt. Die punktförmigen, türkisfarbigen Signale spiegelten die Interaktion zwischen zwei räumlich nahe beieinander liegenden (≤ 40 nm) endogen exprimierten Proteinen wider. In der Positivkontrolle der IHZ, die mit zwei BK-Antikörpern (*ms* BK + *rb* BK) markiert wurden, waren deutlich türkisfarbige Signale am Hals der IHZ auszumachen (A, B; $n = 4$ NMRI-Tiere mit je ca. 8 IHZ). Für die Probe, in der endogen exprimierte BK- und LRRC52-Proteine nachgewiesen werden sollten, wurden im Halsbereich der IHZ ebenfalls spezifische Signale in türkis detektiert. Teilweise waren hierbei zusätzlich etwas weniger intensiv gefärbte Signale unterhalb des Zellkerns erkennbar (C, D; $n = 4$ NMRI-Tiere mit je ca. 8 IHZ). Beide Ergebnisse lassen vermuten, dass BK-Kanäle und LRRC52 in unmittelbarer Nähe zueinander vorliegen. Um falsch-positive Signale auszuschließen, wurden zusätzlich Negativkontrollen mit jeweils nur einem Primärantikörper verwendet. Da in diesen Proben nur eine einzige *PLA*-Probe (PLUS oder MINUS) binden konnte, sollte es nicht zur Ausbildung eines DNA-Kontraktes über RCA kommen und somit auch keine fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisenden Signale gebildet werden. In allen Einzelfärbungen konnten dementsprechend tatsächlich keine intensiv türkisfarbigen Signale in den IHZ ermittelt werden (E, F, G, H; $n = 3$ NMRI-Tiere mit je ca. 8 IHZ; I, K; $n = 2$ NMRI-Tiere mit je ca. 8 IHZ). Lediglich für die Proben, in denen entweder der Maus-anti-BK- (E, F) oder der Kaninchen-anti-LRRC52-Antikörper (I, K) verwendet wurde, waren weniger intensive, türkisfarbige Punkte unterhalb der Zellkerne sichtbar. Diese können auf eine unspezifische Hintergrundfärbung zurückgeführt werden, was damit auch eine Erklärung für die weniger intensiv gefärbten *PLA*-Signale unterhalb des Zellkerns in der BK/LRRC52-Probe (**45 C, D**) liefert.

Die fehlenden spezifischen *PLA*-Signale in den Negativkontrollen (nur 1 PAK) bestätigten somit die Spezifität des *PLA* und machen den Assay damit zu einer geeigneten Methode der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in den komplex aufgebauten und nicht immer trivial zu analysierenden Corti-Organen.

Dieses Experiment zeigt, dass BK-Kanäle und LRRC52 in den IHZ nicht mehr als 40 nm voneinander entfernt vorliegen und stellt nach den vorhergehenden immunhistochemischen Analysen somit einen weiteren Hinweis für die Interaktion von BK-Kanälen mit dem Protein LRRC52 dar.

3.5.2 Überprüfung einer räumlichen Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52-Protein in ausgereiften inneren Haarsinneszellen von Ca_v1.3-defizienten Mäusen

Als Kontrollgewebe für die Spezifität des *is*-PLA wurden Corti-Organe von 17 und 18 Tage alten Ca_v1.3-defizienten Mäusen (Ca_v1.3^{+/+}: P17, Ca_v1.3^{-/-}: P18) verwendet, da in den IHZ dieser Tiere keine BK-Kanäle exprimiert werden (Abb. 43 Q), (Brandt et al., 2003; Nemzou N. et al., 2006). Zur Detektion der potentiellen Interaktion von BK-Kanälen und LRRC52-Protein wurden erneut ein monoklonaler BK- sowie der synthetisierte polyklonale LRRC52-Antikörper eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden abermals zwei BK-Antikörper aus unterschiedlichen Spezies genutzt (monoklonal Maus und polyklonal Kaninchen). Die Abbildung 46 zeigt die *is*-PLA-Ergebnisse dieser Antikörper-Kombinationen an ausgereiften IHZ von Ca_v1.3^{-/-}-Mäusen und deren Kontrolltieren (Ca_v1.3^{+/+}).

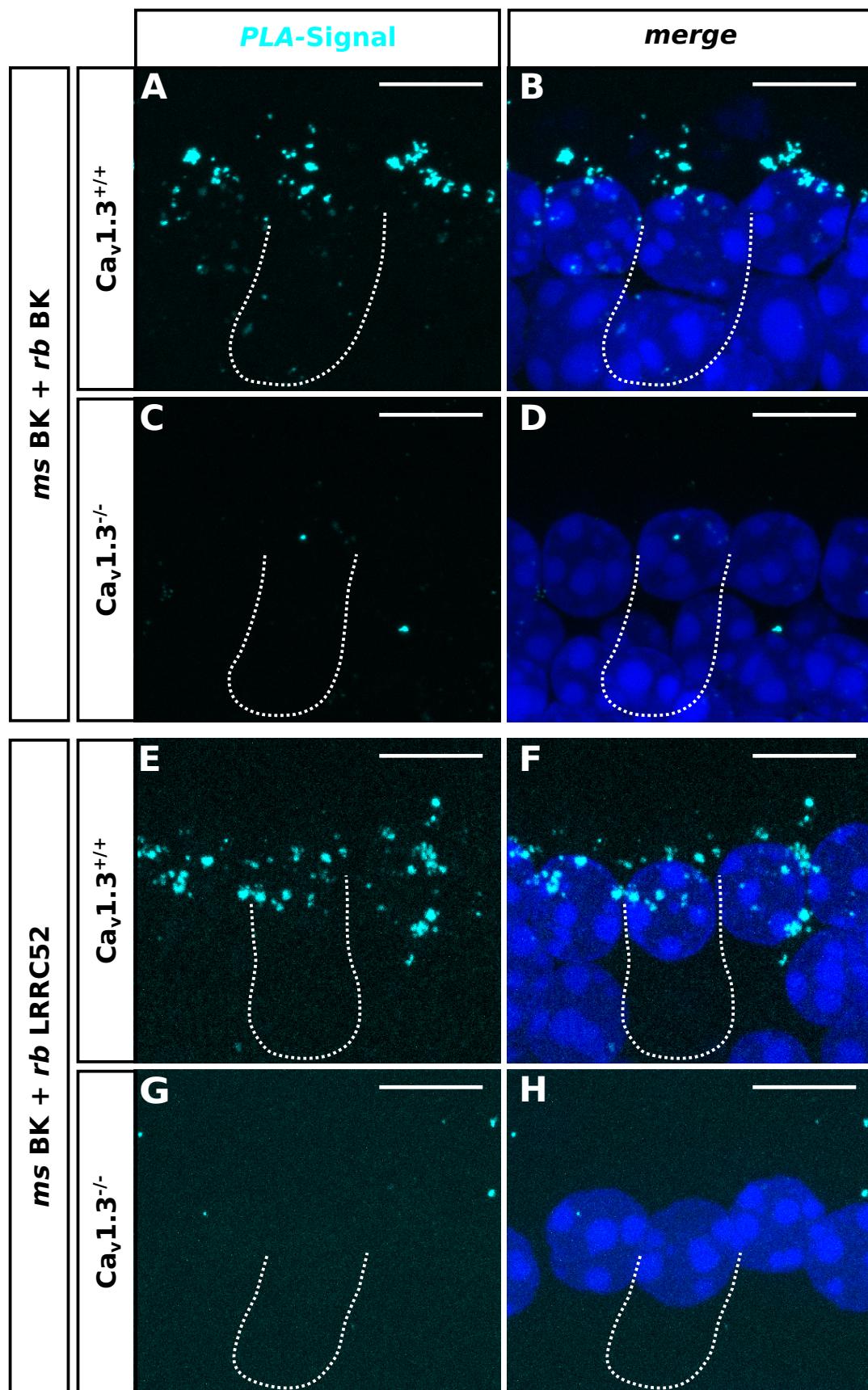


Abbildung 46: Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 in IHZ von Ca_v1.3-KO-Mäusen
 MIPs des *is*-PLAs an 3 IHZ von *whole mount* Corti-Organen 3 Wochen alter Ca_v1.3-defizienter Mäuse (WT: P17; KO: P18). Punktförmige, türkisfarbige Signale (PLA-Signal) detektieren die räumliche Nähe zwischen zwei Proteinen. **A, B, E, F**, Intensive

Fluoreszenz-Signale für den Nachweis von BK-Kanälen mit zwei Spezies-verschiedenen Antikörpern (anti-Maus-BK, anti-Kaninchen-BK) als Positivkontrolle (A, B) sowie für die räumliche Interaktion von BK-Kanälen mit LRRC52 (E, F anti-Maus-BK, anti-Kaninchen-LRRC52) in IHZ von $\text{Ca}_v1.3^{+/+}$ -Mäusen. C, D, G, H, Keine Fluoreszenz-Signale für den Nachweis von BK-Kanälen mit zwei Spezies-verschiedenen Antikörpern (C, D) sowie für die Kolokalisation von BK-Kanälen (G, H) mit LRRC52 in $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Tieren. Diese Beobachtungen wurden für diese Altersstufen an 2 (A-D) bzw. 3 (E-H) Individuen bestätigt. Die Zellkerne wurden zur Visualisierung mit DAPI gefärbt (rechte Spalte, *merge*). Weiße Punkte markieren den Umriss des basolateralen Pols einer IHZ. ms: Maus; rb: Kaninchen. 63 x Öl-Objektiv; Maßstabsbalken: 15 μm .

Dargestellt sind die *MIPs* der jeweiligen *is-PLAs* von drei IHZ eines Corti-Organs von $\text{Ca}_v1.3^{+/+}$ - und $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Tieren und deren blau gefärbten Zellkerne in den Überlagerungsbildern (Abb. 46 A, B, F, H). Die in unmittelbarer Nähe zueinander liegenden endogenen Proteine wurden abermals als türkisfarbige Punkte angezeigt. Die IHZ der Positivkontrolle, die mit zwei Spezies-verschiedenen BK-Antikörpern gefärbt wurden (*ms* BK + *rb* BK), wiesen nur in den $\text{Ca}_v1.3^{+/+}$ -Tieren ein intensives und spezifisches *PLA*-Signal im Halsbereich der IHZ auf (A, B; n = 2 Tiere pro Genotyp mit je 3 IHZ). In den $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen dagegen waren keine spezifischen *PLA*-Signale detektierbar (C, D; n = 2 Tiere pro Genotyp mit je 3 IHZ). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse für den Nachweis der räumlichen Interaktion von endogen exprimierten BK-Kanälen mit endogen exprimierten LRRC52-Proteinen zeigte in den Kontrolltieren ebenfalls eine intensive, spezifische Türkisfärbung am Hals der IHZ (E, F; n = 3 Tiere pro Genotyp mit je 3 IHZ). In den $\text{Ca}_v1.3$ -KO-Mäusen konnten dagegen, wie auch schon für die Positivkontrollen, keine spezifischen *PLA*-Signale ermittelt werden (G, H; n = 3 Tiere pro Genotyp mit 3 IHZ). Das erwartete Fehlen von *PLA*-Signalen in den $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Tieren bei der Verwendung beider Antikörper-Kombinationen ist wahrscheinlich auf die fehlende Expression von BK-Kanälen in diesen Mäusen zurückzuführen.

Nach dem schon in Kapitel 3.5.1 erbrachten Hinweis, konnte durch diesen Versuch ein weiterer Beleg dafür erbracht werden, dass BK-Kanäle und LRRC52 in reifen IHZ in unmittelbarer Nähe zueinander (≤ 40 nm) lokalisiert sind. Mit der hier verwendeten $\text{Ca}_v1.3$ -KO-Mauslinie wurde zusätzlich und unterstützend zu den immunhistochemischen Analysen in Kapitel 3.4.5 bestätigt, dass BK-Kanäle für die korrekte und dauerhafte Lokalisation des LRRC52-Proteins in der Plasmamembran von IHZ essentiell sind.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit stark darauf hin, dass BK-Kanäle und LRRC52 in IHZ miteinander interagieren, sodass LRRC52 als modulatorische γ -Untereinheit von BK-Kanälen in IHZ fungieren und damit an der negativen Aktivierungsverschiebung der BK-Kanäle beteiligt sein könnte.

4 Diskussion

In den IHZ von Mäusen und Ratten werden calcium- und spannungsabhängige *big conductance* (BK) Kaliumkanäle ab Hörbeginn und somit erst ab einem Alter von 12 Tagen (Ehret, 1985) exprimiert und sind somit mitunter charakteristisch für die reifen inneren Haarsinneszellen (IHZ). Durch die massive Hochregulation von BK-Kanälen, die für die schnell aktivierenden K^+ -Ströme $I_{K,f}$ verantwortlich sind, werden die postnatale Phase der Spontanaktivität beendet und die inneren Haarsinneszellen in sensorische Zelltypen umgewandelt. Sie besitzen nun die Fähigkeit ein Schall-gekoppeltes, graduiertes Rezeptorpotential zu bilden (Kros et al., 1998; Langer et al., 2003), und sind damit wie andere Sinneszellen in der Lage unterschiedlich starke Reizintensitäten in eine fein abgestufte Transmitterausschüttung zu wandeln. An der IHZ kommt es aufgrund der großen Leitfähigkeit der BK-Kanäle zu einer schnellen Repolarisation des Rezeptorpotentials sowie einer auf die Hälfte bis ein Drittel verringerten Membranzeitkonstante. Auch können so die durch die MET-Kanäle in die Zelle einströmenden, depolarisierenden K^+ -Ionen aufgrund dieser großen BK-Leitfähigkeit schnell wieder ausströmen und das Ruhemembranpotential der IHZ wieder herstellen (Marcotti et al., 2004; Oliver et al., 2006).

Durch eine systemische Deletion der BKα-Untereinheit kommt es zu einer progredienten Schwerhörigkeit, einer erhöhten Empfindsamkeit gegenüber Schalltraumata und zu zerebellärer Ataxie (Rüttiger et al., 2004; Sausbier et al., 2004). Außerdem wird das Rezeptorpotential der IHZ dahingehend verändert, dass dessen Gleichspannungskomponente ansteigt und die Wechselspannungskomponente reduziert und verlangsamt wird. BKα-defiziente ($BK^{-/-}$) Mäuse zeigen zusätzlich eine verzögerte Ausbildung von Aktionspotentialen (*Spiking*) in den auditorischen Nervenfasern (Oliver et al., 2006).

Eine haarzellspezifische Deletion der BK-Kanäle ab dem postnatalen Tag 10 resultiert darüber hinaus in einer Unfähigkeit, hohe Modulationsfrequenzen korrekt zu unterscheiden sowie in einem verminderten Lautstärkeumfang der Stimuluskodierung in den Nervenfasern eines zentralen Teils des auditorischen Systems, dem *Colliculus inferior* (Kurt et al., 2012). Die BK-Kanäle der IHZ sind demnach unerlässlich für die korrekte Kodierung der zeitlichen Feinstruktur sowie des dynamischen Bereichs der auditorischen Information.

In dieser Arbeit wurden BK-Kanäle auf (i) ihre exakte subzelluläre Expression innerhalb der inneren Haarsinneszelle (IHZ), (ii) ihre Verknüpfung mit extra- und (iii) intrazellulären Ca^{2+} -Quellen sowie (iv) auf ihre räumliche Interaktion mit potentiellen neu entdeckten modulatorischen Untereinheiten, den *Leucin-rich repeat-containing* (LRRC) -Proteinen, untersucht. Dazu wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von BK-Kanälen in IHZ vor, um und nach Hörbeginn sowie von spannungsgesteuerten Calciumkanälen ($Ca_v1.3$ -Kanälen) und Endoplasmatischem Retikulum in reifen IHZ durchgeführt. Zusätzlich wurden Transkriptanalysen zum Nachweis von LRRC26- und

LRRC52-mRNA an reifen und unreifen Corti-Organen und IHZ durchgeführt. Um die immunhistochemischen Kolokalisationsstudien zu unterstützen, wurde die sensitive Methode des *in situ Proximity Ligation Assay* (*is-PLA*) für das hochdifferenzierte und fragile reife Corti-Organ etabliert und für die Analyse von LRRC52 und BK in reifen IHZ von WT- und $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen angewendet.

4.1 Maximale Entfernung der apikalen BK-Kanal-Cluster zu extrazellulären präsynaptischen Ca^{2+} -Quellen in reifen IHZ

Bei Vögeln, Reptilien und Amphibien wird die Frequenzkodierung durch lokal unterschiedlich stark exprimierte $\text{Ca}_v1.3$ - und BK-Kanäle realisiert, sodass einzelne HZ für spezielle Tonfrequenzen zuständig sind. Unterschiedliche Spleißvarianten beider Kanaltypen sind durch ihre folglich verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften dafür verantwortlich, dass die Frequenzkodierung entlang des sensorischen Epithels bewerkstelligt werden kann (Art und Fettiplace, 1987b; Pyott und Duncan, 2016). Die Kombination aus der Aktivierung der $\text{Ca}_v1.3$ - und BK-Kanäle mit der Größe des Ca^{2+} -Einstroms hat somit einen sogenannten *electrical tuning* Mechanismus hervorgebracht, mit dem verschiedene Schallfrequenzen aufgelöst werden können. Da sich $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle durch das Schall-induzierte Rezeptorpotential öffnen und der daraus resultierende Ca^{2+} -Einstrom die Transmitterfreisetzung am synaptischen Pol und die Repolarisation der IHZ durch die BK-Kanäle auslöst, ist es notwendig, dass $\text{Ca}_v1.3$ - und BK-Kanäle in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sind (Roberts et al., 1990). In IHZ von Vögeln, Reptilien und Amphibien werden demnach die BK-Kanäle von Ca^{2+} -Ionen, die über die $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle in die IHZ einströmen, aktiviert (Art und Fettiplace, 1987b; Pyott und Duncan, 2016).

Unter den Lebewesen besitzen die Säugetiere den leistungsfähigsten Hörsinn, der sich besonders durch seinen großen Frequenzbereich von bis zu 11 Oktaven (Mensch: 16 Hz bis 20 kHz; Maus: 2 kHz bis 100 kHz) auszeichnet. Während der Evolution kam es zur Verlängerung des sensorischen Epithels und zu dessen schneckenförmigem Aufrollen ("Cochlea") (Manley et al., 2004). Anders als Vögel, Reptilien und Amphibien nutzen Säugetiere nicht das Prinzip des *electrical tunings* für die Frequenzkodierung, sondern entwickelten im Laufe der Evolution eine mechanisch abgestimmte Cochlea. Hierbei werden durch eine Tonfrequenz jene IHZ am stärksten aktiviert, die auf demjenigen Bereich der Basilarmembran aufsitzen, der durch die Schallwellen-induzierte Wanderwelle im Innenohr die stärkste Auslenkung erfährt (Békésy und Wever, 1960). Außerdem nutzen sie zusätzlich motile äußere Haarsinneszellen als cochleären Verstärker.

Die BK-Kanäle der IHZ von Säugern arbeiten zudem in einem anderen Kontext als in den HZ anderer Vertebraten. So ist eine weitere Besonderheit in Säugern die Tatsache, dass die Mehrheit der BK-Kanäle unabhängig ist von dem extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom durch

$\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Außerdem gibt es bei Säugern offensichtlich keine funktionale Kopplung zwischen BK- und $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen mehr. Das BK α -Protein, welches erst ab Hörbeginn exprimiert wird, ist hier hauptsächlich am Hals der IHZ lokalisiert und damit mehrere Mikrometer entfernt von den Clustern präsynaptischer $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle (Hafidi et al., 2005; Pyott, 2004). Die Lokalisation großer und intensiv gefärbter BK α -Kanal-Cluster am Hals der IHZ ab Hörbeginn konnte mit zwei in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern bestätigt werden (**s. Abb. 15, 16**).

Um einen tieferen Einblick in die subzelluläre Verteilung der großen BK-Kanal-Cluster in den IHZ zu erhalten, wurde die BK α -Untereinheit zusammen mit dem *Tight Junction* Marker Claudin-14 gefärbt, der eine Komponente der *Tight Junction* Barriere zwischen endolymphatischem und perilymphatischem Raum im Corti-Organ darstellt (**s. Abb. 17 A**) (Wilcox et al., 2001). Aufgrund der unterschiedlichen elektrochemischen Gradienten für einen K $^+$ -Ausstrom aus der IHZ (145 mM K $^+$, -70 mV) in die Endolymphe (145 mM K $^+$, +85 mV) bzw. in die Perilymphe (5 mM K $^+$, 0 mV) (Fettiplace, 2017; Wangemann, 2006) muss man postulieren, dass dieser durch BK-Kanäle ausschließlich unterhalb der *Tight Junctions* in die Perilymphe erfolgt.

Tatsächlich waren die intensiv gefärbten BK α -Kanal-Cluster am Hals der IHZ direkt unterhalb des *Tight Junction*-Rings exprimiert (**s. Abb. 17 C**). Oberhalb der *Tight Junctions*, also in Richtung der Kutikularplatte und der ÄHZ, wurden dagegen keine BK α -Kanäle in den IHZ detektiert (**s. Abb. 17 B**). Die BK-Kanäle befinden sich demnach in der größtmöglichen physiologisch sinnvollen Entfernung vom basolateralen Pol, an dem präsynaptische $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle lokalisiert und für den depolarisationsgekoppelten Ca $^{2+}$ -Einstrom verantwortlich sind.

Hafidi et al. konnten durch die Verwendung von fluoreszenz-markiertem Iberiotoxin, einem selektiven BK-Kanal-Blocker, zusätzlich zeigen, dass wenige BK-Kanäle auch am basolateralen Pol der IHZ lokalisiert sind (Hafidi et al., 2005). In Immunfluoreszenzanalysen (IF) von *whole mount* Corti-Organen wurde diese kleine Population von BK-Kanälen bislang noch nicht beschrieben, was vermutlich auf die sehr unterschiedliche Expressionsstärke zurückzuführen ist. Durch die Auswahl eines Bild-Ausschnittes eines vom intensiv BK α -gefärbten Halsbereich getrennten basolateralen Bereichs der IHZ und die Einstellung einer erhöhten Verstärkung des entsprechenden Fluoreszenzkanals am LSM (*Master gain*) konnte in dieser Arbeit am synaptischen Pol zusätzlich zur intensiven BK α -Halsfärbung (**s. Abb. 18**) auch eine schwächere BK α -positive Färbung in unmittelbarer Nachbarschaft zu den präsynaptischen $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen nachgewiesen werden (**s. Abb. 19**). Beide Proteincluster waren jedoch nicht kolokalisiert.

Entgegen der Ergebnisse von Vincent et al. konnten keine $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle am Hals der IHZ direkt unterhalb der Kutikularplatte und deutlich oberhalb der *Tight Junctions* detektiert

werden (Vincent et al., 2017). Die Forschungsgruppe vermutet, dass solche Nifedipin-sensitiven Ca^{2+} -Kanäle eine Calcium-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) aus intrazellulären Ca^{2+} -Quellen auslösen könnte (Beurg et al., 2005; Castellano-Muñoz und Ricci, 2014) und somit an der Modulation der calciumabhängigen BK-Ströme beteiligt sind (Beurg et al., 2005; Skinner et al., 2003). Es scheint jedoch, dass diese $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle am Hals der IHZ, sofern es sie gibt, so weit apikal liegen, dass sie die unterhalb der *Tight Junctions* liegenden BK-Kanäle - wenn überhaupt – höchstens indirekt und nicht schnell modulieren können.

Eine Modulation der im Halsbereich konzentrierten BK-Kanäle könnte theoretisch auch durch die Ca^{2+} -Ionen, die durch die Transduktionskanäle an der Spitze der Stereozilien (Lumpkin et al., 1997) einströmen, ausgelöst werden. Durch die weiten Diffusionsstrecken, die Ca^{2+} -Pufferung und die damit verbundene Verminderung der Ca^{2+} -Konzentration wäre eine solche Interaktion jedoch viel zu langsam für die schnell aktivierenden BK-Kanäle, welche die nach jedem Zyklus notwendige schnelle Repolarisation des Membranpotentials bewerkstelligen.

Im Jahr 2004 konnten Marcotti et al. eine sehr kleine und schnell aktivierende K^+ -Strom-Komponente aufdecken, die durch den $\text{Ca}_v1.3$ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom aktiviert und mit $I_{\text{K,Ca}}$ bezeichnet wird (Marcotti et al., 2004). Dieser Strom weist einige Charakteristika von BK-Kanälen auf, hat im Gegensatz dazu jedoch größere Aktivierungszeitkonstanten als die des BK-vermittelten $I_{\text{K,f}}$. Die Aktivierungszeitkonstanten von $I_{\text{K,Ca}}$ erstrecken sich von 2 bis 11 ms im basalen Teil bis hin zu 12 bis 48 ms im apikalen Bereich der Cochlea und sind damit um mindestens den Faktor 10 langsamer als für die große BK-Strom-Komponente $I_{\text{K,f}}$, die von 0,2 bis 0,7 ms reicht (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). Die kleinen und weniger intensiv gefärbten BK-positiven Punkte in der Nähe der präsynaptischen $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle könnten daher die Kanäle darstellen, die für $I_{\text{K,Ca}}$ verantwortlich sind. Darüber hinaus könnte die präsynaptische Subpopulation von BK-Kanälen erklären, wieso die BK-Ströme bei einem Ca^{2+} -Anstieg von 0 auf 10 μM in *inside-out* Makropatches an der basolateralen Membran von murinen IHZ eine Verschiebung der Aktivierungsspannung zu einer negativeren Spannung hin aufweisen (Oliver et al., 2003). Erwähnenswert ist noch, dass die Aktivierungskurve des BK-Gesamtstroms eine wesentlich steilere Spannungsabhängigkeit aufzeigt als die calcium- und spannungsabhängige Aktivierungskurve der BK-Ströme der Makropatches (Oliver et al., 2003). Dies ist überraschend, da die Ganzzellströme durch BK-Kanäle jedoch weitgehend unabhängig sind von einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (Thurm et al., 2005), sich aber offensichtlich so verhalten als würden sie Ca^{2+} „sehen“.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die größte Population der BK-Kanäle in größtmöglicher physiologisch sinnvoller Entfernung, nämlich direkt unter dem *Tight*

Junction-Ring, zu den präsynaptischen $\text{Ca}_{\text{v}}1.3$ -Kanälen lokalisiert ist. Außerdem wurde dargelegt, dass die kleinere Population der BK-Kanäle sich zwar am basolateralen Pol der IHZ befindet, aber nicht mit den dort exprimierten $\text{Ca}_{\text{v}}1.3$ -Kanälen kolokalisiert ist und für den $I_{\text{K,Ca}}$ verantwortlich sein könnte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die größere Population der BK-Kanäle am Hals der IHZ nicht durch Änderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von extern durch den Ca^{2+} -Einstrom über präsynaptische $\text{Ca}_{\text{v}}1.3$ -Kanäle oder die MET-Kanäle in die Stereozilien aktiviert werden kann.

Diese Ergebnisse deuten zusammenfassend daraufhin, dass mindestens ein weiterer Aktivierungsmechanismus für den dominierenden BK-Ganzzellstrom, der sehr wahrscheinlich durch die BK-Kanäle am Hals der IHZ fließt, vorliegen muss.

4.2 Keine Aktivierung von BK-Kanälen durch intrazelluläre Ca^{2+} -Quellen in reifen IHZ

Die Mehrheit der BK-Kanäle, die am Hals der IHZ direkt unterhalb des *Tight Junction-Rings* lokalisiert sind, wird sehr wahrscheinlich nicht durch die Erhöhungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch den extrazellulären $\text{Ca}_{\text{v}}1.3$ -vermittelten Ca^{2+} -Einstrom moduliert (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005). So stellt sich die Frage, ob und wenn ja welche intrazellulären Ca^{2+} -Quellen in die Aktivierungsmechanismen der BK-Kanäle mit einbezogen sind.

Hierzu gehört beispielsweise das mit Ca^{2+} -Ionen gefüllte Endoplasmatische Retikulum (ER), dessen Ca^{2+} -Ausstrom über Inositol-1,4,5-trisphosphat- oder Ryanodin-Rezeptoren vermittelt wird (Berridge, 1997). In Purkinje-Zellen im Kleinhirn wurde beispielsweise eine Subpopulation von BK-Kanälen in einem Bereich der Plasmamembran oberhalb der sackähnlichen Membranstrukturen des ER gefunden (Kaufmann et al., 2009). Die Autoren postulierten, dass diese BK-Kanäle über IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER aktiviert werden können. In einer Studie von Irie et al. wurde zusätzlich gezeigt, dass ein $\text{Ca}_{\text{v}}2.1$ -vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in das Soma sogenannter *Cartwheel cells*, Neurone eines auditorischen Hirnstammkerns (*dorsal cochlear nucleus*), eine schnelle Ca^{2+} -Freisetzung aus dem benachbarten ER hervorruft. Diese aktiviert ihrerseits BK-Kanäle in unmittelbarer Nähe und wirkt dadurch der elektrischen Erregbarkeit entgegen. Außerdem wurde in Hirnschnitten des *dorsal cochlear nucleus* eine enge Lokalisation von BK-Kanälen und Ryanodin-Rezeptoren an der somatischen Membran festgestellt (Irie und Trussell, 2017).

Als alternative Ca^{2+} -Quellen, welche die Aktivierung von BK-Kanälen zu negativeren Spannungen hin verschieben könnten, werden demnach auch Ca^{2+} release-Kanäle wie die Ca^{2+} -selektiven Ryanodin-Rezeptoren (RyR) diskutiert. Diese kommen im ER erregbarer Zellen, also vor allem in Muskelzellen und Neuronen, vor. So werden BK-Ströme von IHZ durch 20 μM Ryanodin moduliert, indem ihre halbmaximale Spannungsabhängigkeit ($V_{1/2}$)

um 20 mV nach negativ verschoben wurde (Marcotti et al., 2004). Ein ähnlicher Effekt wurde von Beurg et al. an IHZ von Meerschweinchen beobachtet (Beurg et al., 2005). In Ratten wurden Transkripte für die Isoform RyR2 in IHZ (Morton-Jones et al., 2006) und dessen Protein mittels *Immunogold Labeling* an der Basis und am Hals der IHZ nachgewiesen (Grant et al., 2006). Es wird vermutet, dass die Population der RyR2-Isoform am synaptischen Pol der IHZ durch *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR)* die Ca²⁺-Konzentration in diesem Bereich erhöhen und somit die afferente Neurotransmission erleichtern könnte (Kennedy und Meech, 2002). Die Population von RyR2 am Hals der IHZ und deren möglicher Einfluss auf die ebenfalls dort lokalisierten BK-Kanäle bleibt dabei jedoch weiterhin umstritten (s. Abschnittende).

Das Öffnungssignal der Ca²⁺-selektiven RyR ist selbst Ca²⁺, wie auch beim CICR in Herzmuskelzellen, wobei hier depolarisationsgesteuerte Ca_v1.2-Kanäle die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER bzw. dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), der Sonderform des ER im Muskel, triggern.

Im Gegensatz dazu benötigen die RyR des Skelettmuskels kein Ca²⁺-Signal zur Öffnung. Hier fand eine besondere Spezialisierung statt, bei der durch die Depolarisation einer Skelettmuskelfaser der Ca_v1.1-Kanal durch Konformationsänderung direkt physikalisch an den RyR koppelt und diesen öffnet (Hernández-Ochoa und Schneider, 2018).

Ein solcher Mechanismus ist theoretisch auch für die Öffnung der RyR in den IHZ denkbar, jedoch müsste der BK-Kanal selbst diese mechanische Kopplung vermitteln, sodass eine Depolarisation der IHZ die BK-Kanal-Pore in einem negativen Spannungsbereich öffnen könnte. Zu einer solchen Funktion von BK-Kanälen ist bislang jedoch nichts bekannt (Marcotti et al., 2004). Zu IP₃R gibt es derzeit weder aussagekräftige Studien über deren Lokalisation noch fundiertes Wissen über ihre biochemische Signaltransduktion in IHZ.

Um zu untersuchen, ob sich das ER in unmittelbarer Nachbarschaft zu den BK-Kanälen in den IHZ befindet, wurden immunhistochemische Färbungen mit dem ER-Marker Sec62 durchgeführt, der in der Membran des ER exprimiert ist und mit weiteren Proteinen die Translokationsmaschinerie bildet (Deshaines und Schekman, 1989). In diesem Experiment konnte keine eindeutige Nähe oder Überlappung der BKα-Kanal-Cluster mit der diffusen Sec62-Färbung aufgezeigt werden (**s. Abb. 20**), was den Schluss zulässt, dass das ER in IHZ nicht in unmittelbarer Nähe der BK-Kanäle aufzufinden ist. Die diffuse Sec62-Färbung im Zytoplasma der IHZ kann man dadurch erklären, dass das ER ein weit verzweigtes Netzwerk von Membranzisternen darstellt, welches somit einerseits im Zytoplasma der IHZ, in konzentrierter Form jedoch in der Nähe des Zellkerns aufzufinden ist (**s. Abb. 20 D**).

Auch wenn in vorangehenden Studien bestätigt wurde, dass RyR auf einer langsamen Zeitskala die BK-Ströme in IHZ modulieren können (Beurg et al., 2005; Marcotti et al., 2004), konnte bislang noch keine direkte Lokalisierung von RyR und BK-Kanälen in diesen

Zelltypen gezeigt werden. Mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Lokalisation des ER erscheint die Wahrscheinlichkeit gering, dass die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in die schnelle Aktivierung der BK-Kanäle bei negativen Spannungen involviert ist. Die zeitliche Verzögerung zwischen der Depolarisation der Membran und der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER im Skelettmuskel liegt bereits bei ungefähr einer Millisekunde (Kim und Vergara, 1998) und wäre damit zu langsam für die Öffnung der BK-Kanäle in den IHZ, die in weniger als einer Millisekunde abläuft (Thurm et al., 2005).

Wahrscheinlicher ist eine alternative Erklärung des Öffnungsverhaltens der BK-Kanäle am Hals der IHZ als rein spannungsgesteuerte Kanäle durch Anwesenheit von Mitgliedern der LRRC-Proteinfamilie.

4.3 Leucin-rich repeat-containing Proteine in reifen IHZ

Die Aktivierung der als calcium- und spannungsabhängig beschriebenen K^+ -Kanäle in den IHZ erfolgt bei ungefähr -75 mV (Marcotti et al., 2004; Thurm et al., 2005) und ist damit weitaus negativer als z.B. bei Expression von BK-Kanälen in Oozyten des Krallenfroschs (*Xenopus*) oder in heterologen Expressionssystemen. Hier öffnen sich die BK-Kanäle in Abwesenheit von Ca^{2+} erst bei +100 mV (Thurm et al., 2005), sofern nicht bestimmte neu entdeckte Mitglieder der Familie der LRRC-Proteine als modulatorische γ -Untereinheiten anwesend sind (Gonzalez-Perez und Lingle, 2019; Li et al., 2016a; Yan und Aldrich, 2012).

In nicht-erregbaren Prostatakrebszellen (*Lymph Node Carcinoma of the prostate*, LNCaP) wurde beispielsweise eine durch LRRC26 ausgelöste Verschiebung der Aktivierung des BK-Stroms in Richtung des Ruhemembranpotentials bei einer sehr geringen Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen (Yan und Aldrich, 2010). In heterologen Expressionssystemen wurde bei Expression der BK α -Untereinheit zusammen mit LRRC26, 52, 55 und 38 die halbmaximale Aktivierungsspannung der BK-Kanäle um -140 mV, -100 mV, -50 mV bzw. -20 mV verschoben (Yan und Aldrich, 2012). LRRC-Proteine könnten als γ -Untereinheiten den calcium- und spannungsabhängigen BK-Kanal in einen rein spannungsabhängigen Kanal umwandeln, der somit auch unter physiologischen Spannungen funktionsfähig wäre und damit die negative Aktivierung von BK-Kanälen in IHZ in Abwesenheit von Ca^{2+} erklären würde.

Mit Hilfe von Transkriptanalysen, immunhistochemischen Färbungen (IF) und dem *in situ Proximity Ligation Assay* wurde in dieser Arbeit das Vorliegen der mRNA und die Expression der Proteine von Mitgliedern aus der LRRC-Familie in IHZ und Corti-Organen von Mäusen überprüft.

4.3.1 LRRC-Transkripte in unreifen und reifen Corti-Organen

LRRC26 gilt als wahrscheinlichster Kandidat für eine neue γ -Untereinheit ($\gamma 1$) der BK-Kanäle in IHZ. Diese Annahme kommt daher, dass LRRC26 bereits zusammen mit BK-Kanälen in nicht elektrisch erregbaren sekretorischen Epithelzellen wie in den Tränendrüsen, den Ohrspeicheldrüsen und im Dickdarm detektiert werden konnte (Yang et al., 2017). Darüber hinaus ruft es in heterologen Expressionssystemen mit -140 mV die stärkste Verschiebung der BK-Aktivierungsspannung hervor (Yan und Aldrich, 2012). Zudem ist weiterhin bekannt, dass LRRC26 an der Plasmamembran arterieller Myozyten von Ratten mit BK-Kanälen kolokalisiert und dort eine Erweiterung der Blutgefäße durch Erhöhung der Spannungs- und Calciumsensitivität dieser Kanäle bewirkt (Evanson et al., 2014).

LRRC52 bewirkt mit -100 mV die zweitgrößte Verschiebung der Aktivierungsspannung von BK-Kanälen in heterologen Expressionssystemen (Yan und Aldrich, 2012). Es wurde darüber hinaus bereits als γ -Untereinheit des pH-sensitiven SLO3 (oder KSPER)-Kaliumkanals in menschlichen Spermien identifiziert und wird bis dato als Spermien-spezifisch eingestuft (Yang et al., 2011; Zeng et al., 2011). Obwohl SLO3-Kanäle die größte Sequenzhomologie zu den BK (SLO1)-Kanälen besitzen (Salkoff et al., 2006), wurde bislang noch keine Interaktion von LRRC52 und BK in nativen Zellen berichtet.

In dieser Arbeit konnten spezifische Signale für das Vorhandensein sowohl von LRRC26- als auch von LRRC52-Transkripten in den reifen Corti-Organen von WT- und BK α -KO Mäusen detektiert werden (s. Abb. 21, 23, 31, 32). LRRC26- und LRRC52-Transkripte wurden auch in einigen Proben unreifer Corti-Organe (P5-P6) von WT- (s. Abb. 26, 27) und TyfC-Mäusen (s. Abb. 28, 29), in denen entwicklungsabhängig noch keine BK-Kanäle exprimiert werden, detektiert. Weiterhin wurden LRRC52-Transkripte nicht nur in Corti-Organen, sondern auch regelmäßig in reifen IHZ nachgewiesen (s. Abb. 34). Da im Gegensatz dazu LRRC26-Transkripte nicht in reifen IHZ gefunden werden konnten, stellt sich die Frage nach der Relevanz der Transkriptanalyse der Corti-Organe.

Das Corti-Organ besteht neben inneren und äußeren Haarzellen aus einer Vielzahl von weiteren Zelltypen (Geisler, 1998), die potentiell LRRC26 und 52 exprimieren könnten. Hinzu kommen die Spiralganglien-Neurone (SGN) Typ I und Typ II, die mit ihren peripheren Dendriten IHZ und ÄHZ (axosomatische Synapse) innervieren und LRRC-mRNA enthalten könnten. Tatsächlich wurde mRNA für LRRC52 besonders in den SGN des Typs Ib identifiziert (Shrestha et al., 2018). Zudem enthält das Corti-Organ mediale und laterale olivocochleäre Fasern aus dem oberen Olivenkomplex (MOC, LOC), welche die ÄHZ und die Typ I-Fasern efferent innervieren (Synapsen: MOC: axosomatisch; LOC: axodendritisch) (Malmierca und Mechán, 2004).

Für Neurone wurde eine lokale präsynaptische Translation als Mechanismus beschrieben, bei der bestimmte Proteine an einem Synapsen-assoziierten endoplasmatischen Retikulum

und synaptischen polyribosomalen Komplexen synthetisiert werden (Steward und Levy, 1982; Steward und Reeves, 1988). Zusätzlich zu den somatischen Transkripten wurden in verschiedenen Studien beispielsweise für die α -Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II (Burgin et al., 1990) und für das Neurotrophin BDNF und seinen Rezeptor TrkB (Tongiorgi et al., 1997) solche dendritischen Transkripte identifiziert. Für beide LRRC-Proteine wäre solch eine lokale axodendritische Translation besonders in den LOCs, aber auch in den MOCs, denkbar, was die positiven Signale für LRRC26 in den Corti-Organen erklären könnte.

Das mögliche Vorliegen von LRRC26 und LRRC52 in peripheren Dendriten der SGNs oder Axonterminalen der efferenten Fasern müsste weitergehend auch nicht unbedingt bedeuten, dass LRRC26 und LRRC52 als γ -Untereinheiten der BK-Kanäle fungieren, die in den SGN exprimiert sind (Hafidi et al., 2005; Shrestha et al., 2018; Skinner et al., 2003). Die beiden LRRC-Proteine könnten auch eigenständig oder in Assoziation mit anderen Proteinen weitere, bisher unbekannte Funktionen in der Cochlea erfüllen und somit die positiven Transkriptnachweise in den Corti-Organen erklären. Dies wäre auch eine mögliche Ursache für die LRRC26- und LRRC52-Transkripte in den reifen Corti-Organen von BK α -KO-Mäusen (**s. Abb. 31, 32**), in denen die BK α -Untereinheit systemisch deletiert ist (**s. Abb. 30**).

Durch die oben genannten Punkte müssen die spezifischen Signale für die LRRC26- und LRRC52-Transkripte in den Corti-Organen von Mäusen mit großer Vorsicht interpretiert werden, da sie keine Aussage über IHZ darstellen. Um Kontamination durch andere Zelltypen oder Nervenfasern zu vermeiden, sollten nach Möglichkeit für Transkriptanalysen an IHZ, ÄHZ oder anderen speziellen Zelltypen im Innenohr die entsprechenden Zelltypen isoliert und eigenständig untersucht werden. Es ist außerdem zu beachten, dass man vom mRNA-Level nicht unmittelbar auf das Level der Proteinexpression schließen kann.

4.3.2 Keine Expression der $\gamma 1$ -Untereinheit LRRC26 in reifen IHZ

Entgegen der im vorherigen Kapitel beschriebenen Detektion von LRRC26-Transkripten in den Corti-Organen konnten weder in reifen IHZ (**s. Abb. 33**) noch in unreifen IHZ (**s. Abb. 35**) LRRC26-Transkripte identifiziert werden. Auch in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie über LRRC26-defiziente Mäuse, die über ein LacZ-Reporter gen die endogene Expression von LRRC26 anzeigen, wurde das Fehlen der LacZ-Färbung und damit die Abwesenheit der LRRC26-Expression in der Cochlea festgestellt (Yang et al., 2017). Hier muss jedoch angemerkt werden, dass die knöcherne Cochlea mit dem sehr empfindlichen sensorischen Epithel ein schwieriges Gewebe für LacZ-Färbungen darstellt.

Diese Ergebnisse werden durch Befunde der SHIELD Datenbank (*Shared Harvard Inner Ear Laboratory Database*) unterstützt (Scheffer et al., 2015). In dieser Datenbank finden sich Daten zur Einzelzell-Transkriptanalyse für verschiedene Gene für sensorische (IHZ + ÄHZ)

und nicht-sensorische Zellen des Corti-Organs. Die Zellen entstammen einer transgenen Mauslinie mit GFP-Expression ausschließlich in den HZ und wurden durch Dissoziation des jungen Corti-Organs und FACS-Sorting gewonnen. Der Nachteil der Datenbank besteht darin, dass sie nur bis zum Entwicklungsalter P7 reicht und Aussagen über die Expression in ausgereiften HZ nicht möglich sind. Für LRRC26 wies die Datenbank für Haarzellen nur sehr wenige Transkripte bei vier Tage alten Mäusen auf, die bei Mäusen in einem Alter von sieben Tagen wieder bis auf den Nullwert abnahm.

Die Transkriptanalysen an abgesaugten IHZ stellt zusammenfassend ein spezifischeres Analyse-Tool dar als die der kompletten Corti-Organe, sodass die Abwesenheit der LRRC26-Transkripte in unreifen sowie in reifen IHZ als höchstwahrscheinlich nachgewiesen angesehen werden kann.

Parallel zur Transkriptanalyse wurde in dieser Arbeit immunhistochemisch getestet, ob das LRRC26-Protein in den reifen IHZ exprimiert wird. In zwei Studien wurde bereits bestätigt, dass LRRC26 mit BK-Kanälen sowohl in arteriellen Myozyten (Evanson et al., 2014) als auch in erregbaren sekretorischen Epithelzellen (Yang et al., 2017) kolokalisiert. In reifen IHZ konnte in dieser Arbeit jedoch mit keinem der drei getesteten Primärantikörper gegen Maus-LRRC26 und unterschiedlichen Färbebedingungen (Fixierung, Blockierung, PAK-Inkubation) eine spezifische Färbung nachgewiesen werden (**s. Abb. 37**).

Hieraus ergibt sich, dass der vermeintlich wahrscheinlichste Kandidat der LRRC-Familie, LRRC26, keine neue γ 1-Untereinheit von BK-Kanälen in IHZ darstellt.

4.3.3 Synchrone Expression der γ 2-Untereinheit LRRC52 mit BK-Kanälen am Hals reifer IHZ

Nach dem Ausschluss der γ 1-Untereinheit LRRC26 wurde LRRC52 als die zweitwahrscheinlichste γ 2-Untereinheit von BK-Kanälen untersucht, welche in heterologen Expressionssystemen eine Spannungsverschiebung der BK-Kanäle von -100 mV auslöst (Yan und Aldrich, 2012).

LRRC52-Transkripte waren in den reifen IHZ ab Hörbeginn (**s. Abb. 34**), jedoch nicht in unreifen IHZ (**s. Abb. 36**) vorhanden, was für eine entwicklungsabhängige Expression von LRRC52 spricht. Auch für BK wurden in diesen Analysen nur Transkripte in reifen IHZ und nur selten in unreifen IHZ an P5/P6 Tage alten Tieren detektiert. Dies entspricht den Befunden vorangehender Studien, die zuvor die entwicklungsabhängige Expression von BK-Kanälen untersuchten (Housley et al., 2006; Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003b). Auch die SHIELD-Datenbank unterstützt mit einer ansteigenden Transkriptanzahl für LRRC52- sowie für BK-Transkripte in FACS-sortierten Haarzellen für Mäuse mit zunehmendem Alter (bis P7) tendenziell die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse (Scheffer et al., 2015).

Mit dem an Hodengewebe validierten (**s. Abb. 39**) LRRC52-Antikörper wurde zudem ein zu BK α synchrones entwicklungsabhängiges Auftreten von LRRC52-Protein am Hals der IHZ nachgewiesen (**s. Abb. 40, 41**). Durch das *is*-PLA wurde die räumliche Nähe dieser intensiven apikalen LRRC52- und BK α -Kanal-Cluster in drei Wochen alten Mäusen bestätigt (**s. Abb. 45**), welches die Lokalisation beider Proteine mit einer Entfernung von weniger als 40 nm zueinander durch ein distinktes Fluoreszenzsignal nachweist (Gullberg und Andersson, 2010; Söderberg et al., 2006). Das *is*-PLA ist eine sehr sensitive Methode, die durch den Nachweis exponentiell amplifizierter DNA auch eine extrem geringe Konzentration an interagierenden Molekülen, wie sie beispielsweise oft in klinischen Proben vorhanden sind (Gullberg et al., 2004), nachweisen kann bzw. diese unterrepräsentierten Moleküle auch ein starkes und detektierbares Signal erzeugen können. Im Vergleich zu anderen immunhistochemischen Untersuchungen wie der zuvor angewendeten konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (250 nm) (Sanderson et al., 2014) oder auch der *Super Resolution Microscopy* mit 3D-SIM (*3D Structured Illumination Microscopy*, 100 nm) oder STED (*STimulated Emission Depletion*, 50 nm) (Laviña und Gaengel, 2015), besitzt das *is*-PLA die höchste Auflösung (≤ 40 nm). An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass mit dieser Methode keine tatsächliche physikalische Interaktion zwischen zwei Molekülen nachgewiesen werden kann, sondern lediglich zwei in enger Nachbarschaft liegende Moleküle im fixierten Gewebe. Zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen in den IHZ von Mäusen passt auch die Studie, in der LRRC52 als γ -Untereinheit des pH-sensitiven SLO1-verwandten Kaliumkanals SLO3 (KSPER) (Salkoff et al., 2006) identifiziert werden konnte (Yang et al., 2011; Zeng et al., 2011).

Diese Ergebnisse deuten stark daraufhin, dass das LRRC52-Protein den BK-Kanal als neue γ -Untereinheit modulieren und beide folglich funktional miteinander interagieren könnten.

4.3.4 Abhängigkeit der γ 2-Untereinheit LRRC52 von BK α in zwei verschiedenen BK α -defizienten Mausmodellen

Da es so scheint als würden alle IF-Signale für LRRC52 mit denen für BK α überlagern, aber nicht alle BK α - mit LRRC52-positiven Signalen (**s. Abb. 41**), stellt sich die Frage, ob die α -Untereinheit der BK-Kanäle notwendig für die Expression von LRRC52 in IHZ ist.

Hierzu wurden BK $\alpha^{-/-}$ -Mäuse mit systemischer Deletion der α -Untereinheit (**s. Abb. 42 D, F**) auf die Expression von LRRC52 hin untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass Ca v 1.3-deletierte Mäuse (**s. Abb. 43 D, F**) (Platzer et al., 2000) eine Reduzierung der BK-mRNA-Konzentration und eine Abwesenheit der BK-Kanal-Cluster am Hals der IHZ (**s. Abb. 43 K, M**) (Nemzou N. et al., 2006) sowie eine Abwesenheit von BK-Strömen selbst bei Depolarisationen mit hohen Spannungen aufweisen (Brandt et al., 2003), wurden auch diese Tiere immunhistochemisch auf LRRC52 hin untersucht.

In beiden KO-Mausmodellen wurden keine LRRC52-Proteine in den IHZ identifiziert (**s. Abb. 42 E, F, K, M und 43 R, S, W, Y**). Dazu passend ist auch die Tatsache, dass LRRC52 in Spermatozyten nicht anwesend ist, wenn die α -Untereinheit des SLO1-verwandten SLO3-Kaliumkanals deletiert ist (Zeng et al., 2011). Die mit dem polyklonalen Kaninchen anti-BK α Primärantikörper (PAK) nachgewiesene, Bouton-ähnliche BK-Färbung unterhalb der IHZ kann durch die Expression von BK-Kanälen in den MOC-Fasern begründet werden (**s. Abb. 43 K, M**). Diese MOC-Boutons sind für die vorübergehende efferente inhibitorische Innervierung der IHZ während der frühen postnatalen Entwicklung (bis P5) verantwortlich (Simmons, 2002), wandern jedoch nicht wie in WT-Tieren anschließend zu den ÄHZ sondern verbleiben mit ihren axosomatischen, cholinergen Synapsen an den IHZ, sodass diese ihren juvenilen Charakter beibehalten (Katz und Elgoyhen, 2014; Katz et al., 2004). Die Abwesenheit solcher Signale bei Färbungen der IHZ von $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen mit dem monokonalen Maus anti-BK α PAK (**s. Abb. 43 Q, S**) könnte auf sterische Hinderungen der Antikörper-Epitop-Bindung zurückgeführt werden. Da die Ursachen für die Abwesenheit funktionaler BK-Kanäle in den $\text{Ca}_v1.3$ -KO-Mäusen (Brandt et al., 2003; Nemzou N. et al., 2006) noch nicht bekannt ist, wäre es denkbar, dass in den Nervenfasern dieser Tiere andere Proteine mit den BK-Kanälen interagieren und möglicherweise genau die BK-Aminosäuresequenz maskieren, die für eine spezifische Bindung des monokonalen Maus anti-BK α PAK, nicht aber des polyklonalen Kaninchen anti-BK α PAK frei zugänglich sein muss. Durch die Abwesenheit der $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle könnten die Nervenfasern auch andere Ionenkanäle exprimieren, da der Input bzw. das Feedback durch $\text{Ca}_v1.3$ fehlt.

Die Ursache für die Abwesenheit von BK-Kanälen in den $\text{Ca}_v1.3$ -KO-Mäusen konnte bislang noch nicht aufgedeckt werden. Durch die Abwesenheit der an einer Vielzahl von Funktionen beteiligten $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle, wie der Zellgröße (Brandt et al., 2003) oder der efferenten Innervation von IHZ durch MOC-Fasern, die in den konstitutiven KOs bestehen bleibt (Katz und Elgoyhen, 2014; Katz et al., 2004), wären verschiedene Regulationsmechanismen denkbar, die auch für die Abwesenheit des LRRC52-Proteins in diesen Mäusen ursächlich sein könnten. Dazu gehört zum einen die essentielle Rolle von $\text{Ca}_v1.3$ in der Entwicklung der Hörbahn durch neonatale regenerative Ca^{2+} -Aktionspotentiale, die für die Differenzierung der IHZ mitverantwortlich ist und dadurch an der Initiierung von Transkriptionsprogrammen beteiligt sein könnte (Brandt et al., 2003). Dafür spricht beispielsweise eine stärkere Transkription von BK in den IHZ von WT- im Vergleich zu $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Tieren (Nemzou N. et al., 2006). Dies könnte auch für die LRRC52-Transkription zutreffen. In dieser Studie wird ebenfalls diskutiert, dass eine reduzierte mRNA-Konzentration von BK und möglicherweise damit auch von LRRC52 in den $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ -Mäusen nicht für die Synthese der α -Untereinheit von BK-Kanälen bzw. von LRRC52 ausreichen könnte. Ferner käme als Ursache für die

Abwesenheit von LRRC52 in diesem Mausmodell, wie auch schon für BK vorgeschlagen (Nemzou N. et al., 2006), eine erhöhte mRNA-Degradation und/oder eine gehemmte Translation für LRRC52 in Betracht, genauso wie eine Fehltranslokation und/oder eine beschleunigte Degradation des LRRC52-Proteins.

Abschließend bleibt anzumerken, dass LRRC52 in IHZ nicht exprimiert wird, wenn die BK α -Untereinheit abwesend ist, und damit eine direkte funktionale Interaktion beider Proteine sehr wahrscheinlich macht. Insgesamt unterstützen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Transkriptanalysen, der immunhistochemischen Untersuchungen und des *is-PLAs* die Annahme, dass LRRC52 als eine intrinsische BK- γ 2-Untereinheit in IHZ an der Aktivierung der BK-Kanäle bei negativen Spannungen ohne nominellen Ca²⁺-Einstrom beteiligt ist und die BK-Kanal-Komplexe am Hals der IHZ in rein spannungsabhängige Kalium-selektive Kanäle umwandeln.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass (i) die BK-Kanal-Cluster am Hals der IHZ die größte (physiologisch noch sinnvolle) Entfernung von den spannungsgesteuerten präsynaptischen Ca_v1.3-Kanälen besitzen, dass (ii) die BK-Kanal-Cluster am Hals der IHZ nicht dicht am ER liegen, dass (iii) die γ 2-Untereinheit LRRC52 entwicklungsabhängig mit BK α synchron hochreguliert wird und dass (iv) in IHZ LRRC52 und BK α in einem Abstand von weniger als 40 nm zueinander lokalisiert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die BK-Kanal-Cluster am Hals der IHZ durch einen anderen Mechanismus aktiviert werden als die kleinere BK-Kanal-Subpopulation am basolateralen Pol. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese nicht mehr calcium- und spannungsabhängig, sondern durch die Assoziation mit LRRC52 nur noch spannungsabhängig sind. Damit wäre es interessant, die BK-Ströme der beiden Subpopulationen in isolierten *excised inside out patches* nochmals genauer zu analysieren. Hierbei könnten beispielsweise unterschiedliche extrazelluläre Calciumkonzentration (0 μ M und 10 μ M) angewendet werden um zu untersuchen, ob die *Patches* am synaptischen Pol wie vermutet weiterhin calciumabhängig sind und die BK-Kanäle in den *Patches* am Hals der IHZ nur auf eine Veränderung in der Membranspannung und demnach nicht auf die Veränderung der Extrazellulärösung reagieren.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die synchrone Hochregulation von BK α und LRRC52, wovon LRRC52 in IHZ von Mäusen ohne BK-Kanal-Expression [BK α ^{-/-} (Sausbier et al., 2004); Ca_v1.3^{-/-} (Platzer et al., 2000)] komplett abwesend war und damit möglicherweise als eine neue intrinsische γ 2-Untereinheit identifiziert werden konnte.

Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass LRRC52 für die Verschiebung der Aktivierungsspannung von BK-Kanälen hin zu negativeren Spannungen verantwortlich ist. Von besonderem Interesse wäre die Generierung einer LRRC52-defizienten Mauslinie und deren Analyse auf die subzelluläre Expression von BKα in IHZ hin. Interessant wäre es hierbei zu untersuchen, ob die Expression von BK-Kanälen von LRRC52 abhängig ist und damit in LRRC52-defizienten Mäusen überhaupt nicht vorhanden ist oder ein anderes Muster aufweist (Kros et al., 1998; Langer et al., 2003; Marcotti et al., 2003b). Zusätzlich wäre es aufschlussreich, in diesen KO-Mäusen die Kalium-Ganzzell-Ströme und das Rezeptorpotential der IHZ zu charakterisieren, um zu identifizieren, ob es in Abwesenheit von LRRC52 genauso beeinflusst wird wie in Abwesenheit von BK-Strömen (Oliver et al., 2006).

Um den Effekt einer LRRC52-Deletion auf BK-Ströme zu analysieren, wäre auch ein LRRC52-*siRNA Knockdown* eine mögliche und interessante Option, um durch RNA-Interferenz die Expression von LRRC52 zu unterdrücken. Diese Methode ist für die auditorischen Sinneszellen jedoch problematisch, da es bisher nicht gelungen ist, IHZ im Alter von mindestens P12 erfolgreich über mehrere Tage in Kultur zu halten.

Da LRRC52 mit -100 mV (Yan und Aldrich, 2012) nicht die komplette Verschiebung nach negativeren BK-Aktivierungsspannungen erklären kann (ca. -150 mV) wäre es wichtig, IHZ von WT-Mäusen auf das Vorliegen von LRRC55 hin zu untersuchen. In heterologen Expressionssystemen bewirkt dieses eine Verschiebung der Aktivierungsspannung von BK-Kanälen um -50 mV (Yan und Aldrich, 2012). Eine Expression von LRRC55 könnte möglicherweise die fehlende Verschiebung der Aktivierungsspannung von BK-Kanälen in IHZ von ca. -50 mV beisteuern. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde LRRC55 jedoch nur im Zentralnervensystem detektiert (Zhang et al., 2018). Bei allen rechnerischen Überlegungen in dieser Arbeit darf jedoch nicht vergessen werden, dass die Zahlenwerte über die durch LRRC-ausgelöste Aktivierungsspannung erstens aus heterologen Expressionssystemen stammen und zweitens hierbei menschliche DNA-Konstrukte transfiziert wurden, deren zugrunde liegenden Sequenzen nur eine Sequenzhomologie von 70-80% zu denen der Maus aufweisen. Die Effekte der Verschiebung der BK-Aktivierungsspannung könnten somit in der Maus entweder auch einen stärkeren oder gar schwächeren Effekt auf die endogen in Mäusen exprimierten BK-Kanäle haben.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre es zu überprüfen, ob LRRC52 auch in HZ von Vögeln nachzuweisen ist. Wäre LRRC52 tatsächlich für die Verschiebung der Aktivierungsspannung der apikalen BK-Kanäle in den IHZ von Mäusen verantwortlich, sollte LRRC52 in den *tall hair cells*, dem Vogel-Äquivalent zu den IHZ in Mäusen, nicht vorliegen, da hier die BK-Kanäle mit Ca_v1.3-Kanälen kolokalisieren und durch extrazellulären Calcium-Einstrom aktiviert werden (Fuchs und Evans, 1990; Pyott und Duncan, 2016; Roberts et al., 1990).

5 Literatur

- Adelman, J.P., Shen, K.-Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y.-N., Lagrutta, A., Bond, C.T., and Alan North, R. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9, 209–216.
- Alioua, A., Mahajan, A., Nishimaru, K., Zarei, M.M., Stefani, E., and Toro, L. (2002). Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14560–14565.
- Anderson, J.M. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 126–130.
- Anniko, M., and Bagger-Sjöbäck, D. (1982). Maturation of junctional complexes during embryonic and early postnatal development of inner ear secretory epithelia. *Am. J. Otolaryngol.* 3, 242–253.
- Anwer, K., Oberti, C., Perez, G.J., Perez-Reyes, N., McDougall, J.K., Monga, M., Sanborn, B.M., Stefani, E., and Toro, L. (1993). Calcium-activated K^+ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 265, C976–C985.
- Arikkath, J., and Campbell, K.P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 298–307.
- Art, J.J., and Fettiplace, R. (1987a). Variation of membrane properties in hair cells isolated from the turtle cochlea. *J. Physiol.* 385, 207–242.
- Ashmore, J.F., Gélécoc, G.S., and Harbott, L. (2000). Molecular mechanisms of sound amplification in the mammalian cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11759–11764.
- Atkinson, N.S., Robertson, G.A., and Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* 253, 551–555.
- Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnecker-Brauns, M.J., Brandt, N., et al. (2011). Loss of $\text{Ca}_v1.3$ (*CACNA1D*) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat. Neurosci.* 14, 77–84.
- Barbado, M., Fablet, K., Ronjat, M., and De Waard, M. (2009). Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1793, 1096–1104.
- Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., and Müller, F. (2012). Duale Reihe Physiologie (Stuttgart: Thieme).
- Békésy, G. von., and Wever, E.G. (1960). Experiments in hearing. (New York: McGraw-Hill).
- Benarroch, E.E. (2009). Potassium channels: Brief overview and implications in epilepsy. *Neurology* 72, 664–669.
- Berglund, A.M., and Ryugo, D.K. (1987). Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 255, 560–570.
- Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.-O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., et al. (2006). $\text{BK}_{\text{Ca}}\text{-Ca}_v$ Channel Complexes Mediate Rapid and Localized Ca^{2+} -Activated K^+ Signaling. *Science* 314, 615–620.

- Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* **499**, 291–306.
- Beurg, M., Hafidi, A., Skinner, L.J., Ruel, J., Nouvian, R., Henaff, M., Puel, J.-L., Aran, J.-M., and Dulon, D. (2005). Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells. *Euro. J. Neurosci.* **22**, 1109–19.
- Beutner, D., Voets, T., Neher, E., and Moser, T. (2001). Calcium Dependence of Exocytosis and Endocytosis at the Cochlear Inner Hair Cell Afferent Synapse. *Neuron* **29**, 681–690.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., Kunzelmann, K., and Bubendorf, L. (2007). KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* **26**, 2525–2534.
- Brandt, A., Striessnig, J., and Moser, T. (2003). $\text{Ca}_V1.3$ Channels Are Essential for Development and Presynaptic Activity of Cochlear Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* **23**, 10832–10840.
- Brandt, N., Kuhn, S., Munkner, S., Braig, C., Winter, H., Blin, N., Vonthein, R., Knipper, M., and 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.
- Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* **256**, 532–535.
- Brenner, R., Jegla, T.J., Wickenden, A., Liu, Y., and Aldrich, R.W. (2000). Cloning and Functional Characterization of Novel Large Conductance Calcium-activated Potassium Channel β Subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J. Biol. Chem.* **275**, 6453–6461.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., and Ribaupierre, Y. de (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* **227**, 194–196.
- Buraei, Z., and Yang, J. (2010). The β Subunit of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. *Physiol. Rev.* **90**, 1461–1506.
- Burgin, K.E., Waxham, M.N., Rickling, S., Westgate, S.A., Mobley, W.C., and Kelly, P.T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**, 1788–1798.
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D.P., Wei, A., and Salkoff, L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding “maxi” calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221–224.
- Cambien, B., Rezzonico, R., Vitale, S., Rouzaire-Dubois, B., Dubois, J.-M., Barthel, R., Soilihi, B.K., Mograbi, B., Schmid-Alliana, A., and Schmid-Antomarchi, H. (2008). Silencing of hSlo potassium channels in human osteosarcoma cells promotes tumorigenesis. *Int. J. Cancer* **123**, 365–371.
- Castellano-Muñoz, M., and Ricci, A.J. (2014). Role of intracellular calcium stores in hair-cell ribbon synapse. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 162.
- Catterall, W.A. (1995). Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 493–531.
- Catterall, W.A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521–555.

- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 411–425.
- Cereijido, M., Valdés, J., Shoshani, L., and Contreras, R.G. (1998). Role of Tight Junctions in Establishing and Maintaining Cell Polarity. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 161–177.
- Chen, M., and Petkov, G.V. (2009). Identification of Large Conductance Calcium Activated Potassium Channel Accessory $\beta 4$ Subunit in Rat and Mouse Bladder Smooth Muscle. *J. Urol.* **182**, 374–381.
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., and Sawada, N. (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 588–600.
- Comes, N., Serrano-Albarrás, A., Capera, J., Serrano-Novillo, C., Condom, E., Ramón y Cajal, S., Ferreres, J.C., and Felipe, A. (2015). Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2477–2492.
- Contreras, G.F., Castillo, K., Enrique, N., Carrasquel-Ursulaez, W., Castillo, J.P., Milesi, V., Neely, A., Alvarez, O., Ferreira, G., González, C., et al. (2013). A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Channels* **7**, 442–458.
- Cox, D.H., and Aldrich, R.W. (2000). Role of the $\beta 1$ Subunit in Large-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channel Gating Energetics: Mechanisms of Enhanced Ca^{2+} Sensitivity. *J. Gen. Physiol.* **116**, 411–432.
- Cox, D.H., Cui, J., and Aldrich, R.W. (1997). Allosteric Gating of a Large Conductance Ca-activated K^+ Channel. *J. Gen. Physiol.* **110**, 257–281.
- Cui, J., Cox, D.H., and Aldrich, R.W. (1997). Intrinsic Voltage Dependence and Ca^{2+} Regulation of mslo Large Conductance Ca-activated K^+ Channels. *J. Gen. Physiol.* **109**, 647–673.
- Cui, J., Yang, H., and Lee, U.S. (2009). Molecular Mechanisms of BK Channel Activation. *Cell. Mol. Life Sci. CMSL* **66**, 852–875.
- Curran, M.E. (1998). Potassium ion channels and human disease: phenotypes to drug targets? *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 565–572.
- Deshaines, R.J., and Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**, 2653–2664.
- Dolphin, A.C. (2012). Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 542–555.
- Dolphin, A.C. (2013). The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 1541–1549.
- Dou, H., Vazquez, A.E., Namkung, Y., Chu, H., Cardell, E.L., Nie, L., Parson, S., Shin, H.-S., and Yamoah, E.N. (2004). Null Mutation of $\alpha 1D$ Ca^{2+} Channel Gene Results in Deafness but No Vestibular Defect in Mice. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **5**, 215–226.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+

Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69–77.

Du, W., Bautista, J.F., Yang, H., Diez-Sampedro, A., You, S.-A., Wang, L., Kotagal, P., Lüders, H.O., Shi, J., Cui, J., et al. (2005). Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat. Genet.* 37, 733–738.

Duncan, R.K., and Fuchs, P.A. (2003). Variation in Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels from Hair Cells Along the Chicken Basilar Papilla. *J. Physiol.* 547, 357–371.

Duncker, S.V., Franz, C., Kuhn, S., Schulte, U., Campanelli, D., Brandt, N., Hirt, B., Fakler, B., Blin, N., Ruth, P., et al. (2013). Otoferlin Couples to Clathrin-Mediated Endocytosis in Mature Cochlear Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* 33, 9508–9519.

Egland, K.A., Liu, X.F., Squires, S., Nagata, S., Man, Y.-G., Bera, T.K., Onda, M., Vincent, J.J., Strausberg, R.L., Lee, B., et al. (2006). High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103, 5929–5934.

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

Elkins, T., Ganetzky, B., and Wu, C.F. (1986). A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8415–8419.

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

Evans, B.N., and Dallos, P. (1993). Stereocilia displacement induced somatic motility of cochlear outer hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8347–8351.

Evanson, K.W., Bannister, J.P., Leo, M.D., and Jaggar, J.H. (2014). LRRC26 Is a Functional BK Channel Auxiliary Subunit in Arterial Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 115, 423–431.

Fakler, B., and Adelman, J.P. (2008). Control of K_{Ca} Channels by Calcium Nano/Microdomains. *Neuron* 59, 873–881.

Fell, B., Eckrich, S., Blum, K., Eckrich, T., Hecker, D., Obermair, G.J., Munkner, S., Flockerzi, V., Schick, B., and Engel, J. (2016). $\alpha_2\delta 2$ Controls the Function and Trans-Synaptic Coupling of $Ca_V1.3$ Channels in Mouse Inner Hair Cells and Is Essential for Normal Hearing. *J. Neurosci.* 36, 11024–11036.

Fernández-Suárez, M., and Ting, A.Y. (2008). Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 929–943.

Ferry, E., Bernard, C., Teixeira, M., Julien, N., Bismuth, P., Sterkers, O., and Amiel, C. (1996). Hormonal modulation of inner ear fluids. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 116, 244–247.

Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *American Cancer Society*, 7, 1197–1227.

Fettiplace, R., and Fuchs, P.A. (1999). Mechanisms of Hair Cell Tuning. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 809–834.

Fodor, A.A., and Aldrich, R.W. (2006). Statistical Limits to the Identification of Ion Channel Domains by Sequence Similarity. *J. Gen. Physiol.* 127, 755–766.

- Fodor, A.A., and Aldrich, R.W. (2009). Convergent Evolution of Alternative Splices at Domain Boundaries of the BK Channel. *Annual Review Physiol.* 71, 19–36.
- Fuchs, P.A., and Evans, M.G. (1990). Potassium currents in hair cells isolated from the cochlea of the chick. *J. Physiol.* 429, 529–551.
- Fuchs, P.A., Glowatzki, E., and Moser, T. (2003). The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 452–458.
- Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16, 181–188.
- Gackière, F., Warnier, M., Katsogiannou, M., Derouiche, S., Delcourt, P., Dewailly, E., Slomianny, C., Humez, S., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M., et al. (2013). Functional coupling between large-conductance potassium channels and $\text{Ca}_v3.2$ voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Comp. Biol. Ltd* 2, 941–951.
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* 265, 11083–11090.
- Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M.H., Lerman, M., Lee, J.-H., Perez-Reyes, E., et al. (2000). Functional Properties of a New Voltage-dependent Calcium Channel $\alpha_2\delta$ Auxiliary Subunit Gene (CACNA2D2). *J. Biol. Chem.* 275, 12237–12242.
- Geisler, C. (1998). From Sound to Synapse- Physiology of the mammalian ear. New York, NY: Oxford University Press.
- Gilibili, R.R., Vogl, A.W., Chang, T.K.H., and Bandiera, S.M. (2014). Localization of Cytochrome P450 and Related Enzymes in Adult Rat Testis and Downregulation by Estradiol and Bisphenol A. *Tox. Sciences* 140, 26–39.
- Glowatzki, E., and Fuchs, P.A. (2002). Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat. Neurosci.* 5, 147–154.
- Glueckert, R., Wietzorre, G., Kammen-Jolly, K., Scholtz, A., Stephan, K., Striessnig, J., and Schrott-Fischer, A. (2003). Role of class D L-type Ca^{2+} channels for cochlear morphology. *Hear. Res.* 178, 95–105.
- Goldman, D.E. (1943). POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *J. Gen. Physiol.* 27, 37–60.
- Gonzalez-Perez, V., and Lingle, C.J. (2019). Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits. *Annual Review Physiol.* 81, 113–137.
- Gonzalez-Perez, V., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2014). Functional regulation of BK potassium channels by $\gamma 1$ auxiliary subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4868–4873.
- Grant, L., Slapnick, S., Kennedy, H., and Hackney, C. (2006). Ryanodine receptor localisation in the mammalian cochlea: An ultrastructural study. *Hear. Res.* 219, 101–109.
- Grunnet, M., and Kaufmann, W.A. (2004). Coassembly of Big Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channels and L-type Voltage-gated Ca^{2+} Channels in Rat Brain. *J. Biol. Chem.* 279, 36445–36453.

- Guinan, J. (2006). Olivocochlear Efferents: Anatomy, Physiology, Function, and the Measurement of Efferent Effects in Humans. *Ear Hear.* 27, 589–607.
- Gullberg, M., and Andersson, A.-C. (2010). Visualization and quantification of protein-protein interactions in cells and tissues. *Nat. Met.* 7.
- Gullberg, M., Gústafsdóttir, S.M., Schallmeiner, E., Jarvius, J., Bjarnegård, M., Betsholtz, C., Landegren, U., and Fredriksson, S. (2004). Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 101, 8420–8424.
- Hafidi, A., Beurg, M., and Dulon, D. (2005). Localization and developmental expression of BK channels in mammalian cochlear hair cells. *Neurosci.* 130, 475–484.
- Hernández-Ochoa, E.O., and Schneider, M.F. (2018). Voltage sensing mechanism in skeletal muscle excitation-contraction coupling: coming of age or midlife crisis? *Skelet. Muscle* 8.
- Hicks, G.A., and Marrion, N.V. (1998). Ca^{2+} -dependent inactivation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle. *J. Physiol.* 508, 721–734.
- Holtzman, J., Grimm, P., and Sansom, S. (2011). Role of BK channels in hypertension and potassium secretion. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20, 512–517.
- Horrigan, F.T., and Aldrich, R.W. (1999). Allosteric Voltage Gating of Potassium Channels II: Mslo Channel Gating Charge Movement in the Absence of Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 114, 305–336.
- Horrigan, F.T., Cui, J., and Aldrich, R.W. (1999). Allosteric Voltage Gating of Potassium Channels I. Mslo Ionic Currents in the Absence of Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 114, 277–304.
- Hoshi, T., Tian, Y., Xu, R., Heinemann, S.H., and Hou, S. (2013). Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA. *Proc. Natl Acad. Sci.* 110, 4822–4827.
- Housley, G.D., Marcotti, W., Navaratnam, D., and Yamoah, E.N. (2006). Hair Cells – Beyond the Transducer. *J. Membr. Biol.* 209, 89–118.
- Hudspeth, A.J. (1989). How the ear's works work. *Nature* 341, 397–404.
- Hudspeth, A.J., and Lewis, R.S. (1988). A model for electrical resonance and frequency tuning in saccular hair cells of the bull-frog, *Rana catesbeiana*. *J. Physiol.* 400, 275–297.
- Huppelsberg, J., and Walter, K. (2009). Auditorisches System und Gleichgewichtssinn. In *Kurzlehrbuch Physiologie* (Stuttgart: Thieme).
- Irie, T., and Trussell, L.O. (2017). Double-Nanodomain Coupling of Calcium Channels, Ryanodine Receptors, and BK Channels Controls the Generation of Burst Firing. *Neuron* 96, 856–870.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2006). Claudins and Epithelial Paracellular Transport. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 403–429.
- Jeevaratnam, K., Chadda, K.R., Huang, C.L.-H., and Camm, A.J. (2017). Cardiac Potassium Channels: Physiological Insights for Targeted Therapy: *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *J. Cardiov. Pharm. Therap.* 23, 119–129.

- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2001). Structure of the RCK Domain from the *E. coli* K⁺ Channel and Demonstration of Its Presence in the Human BK Channel. *Neuron* 29, 593–601.
- Kaczorowski, G.J., Knaus, H.G., Leonard, R.J., McManus, O.B., and Garcia, M.L. (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 255–267.
- Kang, M.-G., and Campbell, K.P. (2003). γ Subunit of Voltage-activated Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 278, 21315–21318.
- Katz, E., and Elgoyen, A.B. (2014). Short-term plasticity and modulation of synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear synapses. *Front. Syst. Neurosci.* 8, 224.
- Katz, E., Elgoyen, A.B., Gómez-Casati, M.E., Knipper, M., Vetter, D.E., Fuchs, P.A., and Glowatzki, E. (2004). Developmental Regulation of Nicotinic Synapses on Cochlear Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* 24, 7814–7820.
- Kaufmann, W.A., Ferraguti, F., Fukazawa, Y., Kasugai, Y., Shigemoto, R., Laake, P., Sexton, J.A., Ruth, P., Wietzorre, G., Knaus, H.-G., et al. (2009). Large-conductance calcium-activated potassium channels in purkinje cell plasma membranes are clustered at sites of hypolemmal microdomains. *J. Comp. Neurol.* 515, 215–230.
- Kennedy, H.J., and Meech, R.W. (2002). Fast Ca²⁺ signals at mouse inner hair cell synapse: a role for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J. Physiol.* 539, 15–23.
- Kim, A.M., and Vergara, J.L. (1998). Fast voltage gating of Ca²⁺ release in frog skeletal muscle revealed by supercharging pulses. *J. Physiol.* 511, 509–518.
- Kim, J.M., Beyer, R., Morales, M., Chen, S., Liu, L.Q., and Duncan, R.K. (2010). Expression of BK-type calcium-activated potassium channel splice variants during chick cochlear development. *J. Comp. Neurol.* 518, 2554–2569.
- Kitajiri, S., Furuse, M., Morita, K., Saishin-Kiuchi, Y., Kido, H., Ito, J., and Tsukita, S. (2004). Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear. Res.* 187, 25–34.
- Klugbauer, N., Lacinová, L., Marais, E., Hobom, M., and Hofmann, F. (1999). Molecular Diversity of the Calcium Channel α2δ Subunit. *J. Neurosci.* 19, 684–691.
- Knaus, H.-G., Eberhart, A., Koch, R.O.A., Munujos, P., Schmalhofer, W.A., Warmke, J.W., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1995). Characterization of Tissue-expressed α Subunits of the High Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channel. *J. Biol. Chem.* 270, 22434–22439.
- Knaus, H.G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Smith, M., and Swanson, R. (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 269, 17274–17278.
- Knaus, H.G., Schwarzer, C., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M.L., and Sperk, G. (1996). Distribution of high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J. Neurosci.* 16, 955–963.

- Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Münker, S., Knipper, M., and Engel, J. (2007). Persistence of Ca_v1.3 Ca²⁺ Channels in Mature Outer Hair Cells Supports Outer Hair Cell Afferent Signaling. *J. Neurosci.* 27, 6442–6451.
- Kros, C.J., and Crawford, A.C. (1990). Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J. Physiol.* 421, 263–291.
- Kros, C.J., Ruppertsberg, J.P., and Rüsch, A. (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394, 281–284.
- Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., and Jentsch, T.J. (1999). KCNQ4, a Novel Potassium Channel Expressed in Sensory Outer Hair Cells, Is Mutated in Dominant Deafness. *Cell* 96, 437–446.
- Kurt, S., Sausbier, M., Rüttiger, L., Brandt, N., Moeller, C.K., Kindler, J., Sausbier, U., Zimmermann, U., van Straaten, H., Neuhuber, W., et al. (2012). Critical role for cochlear hair cell BK channels for coding the temporal structure and dynamic range of auditory information for central auditory processing. *FASEB J.* 26, 3834–3843.
- Langer, P., Gründer, S., and Rüsch, A. (2003). Expression of Ca²⁺-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea: BK Channels in Rat Cochlea. *J. Comp. Neurol.* 455, 198–209.
- Latorre, R., and Brauchi, S. (2006). Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel: Activation by Ca²⁺ and voltage. *Biol. Res.* 39, 385–401.
- Latorre, R., Castillo, K., Carrasquel-Ursulaez, W., Sepulveda, R.V., Gonzalez-Nilo, F., Gonzalez, C., and Alvarez, O. (2017). Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol. Rev.* 97, 39–87.
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., and Alvarez, O. (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annual Rev. Physiol.* 51, 385–399.
- Latorre, R., Vergara, C., and Hidalgo, C. (1982). Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 805–809.
- Laviña, B., and Gaengel, K. (2015). New imaging methods and tools to study vascular biology. *Curr. Opin. Hematol.* 22, 258–266.
- Li, Q., Fan, F., Kwak, H.R., and Yan, J. (2015). Molecular basis for differential modulation of BK channel voltage-dependent gating by auxiliary γ subunits. *J. Gen. Physiol.* 145, 543–554.
- Li, Q., Guan, X., Yen, K., Zhang, J., and Yan, J. (2016b). The single transmembrane segment determines the modulatory function of the BK channel auxiliary γ subunit. *J. Gen. Physiol.* 147, 337–351.
- Lberman, M.C., Gao, J., He, D.Z.Z., Wu, X., Jia, S., and Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419, 300–304.
- Liu, X.F., Xiang, L., Zhang, Y., Becker, K.G., Bera, T.K., and Pastan, I. (2012). CAPC negatively regulates NF-κB activation and suppresses tumor growth and metastasis. *Oncogene* 31, 1673–1682.
- Loane, D.J., Lima, P.A., and Marrion, N.V. (2007). Co-assembly of N-type Ca²⁺ and BK channels underlies functional coupling in rat brain. *J. Cell Sci.* 120, 985–995.

- Lu, R., Alioua, A., Kumar, Y., Eghbali, M., Stefani, E., and Toro, L. (2006). MaxiK channel partners: physiological impact. *J. Physiol.* 570, 65–72.
- Lumpkin, E.A., Marquis, R.E., and Hudspeth, A.J. (1997). The selectivity of the hair cell's mechanoelectrical-transduction channel promotes Ca^{2+} flux at low Ca^{2+} concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 10997–11002.
- Lumpkin, O.J., Déjardin, P., and Zimm, B.H. (1985). Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers* 24, 1573–1593.
- Magleby, K.L. (2003). Gating Mechanism of BK (Slo1) Channels: So Near, Yet So Far. *J. Gen. Physiol.* 121, 81–96.
- Malmierca, M., and Mechán, M. (2004). Auditory System. In In: *The Rat Nervous System*. Section VI: Systems.
- Manley, G.A., Popper, A.N., and Fay, R.R. (2004). Evolution of the vertebrate auditory system. (New York: Springer, New York, NY).
- Marcotti, W. (2012). Functional assembly of mammalian cochlear hair cells: Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Exp. Physiol.* 97, 438–451.
- Marcotti, W., Johnson, S.L., Holley, M.C., and Kros, C.J. (2003b). Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J. Physiol.* 548, 383–400.
- Marcotti, W., Johnson, S.L., and Kros, C.J. (2004). Effects of intracellular stores and extracellular Ca^{2+} on Ca^{2+} -activated K^+ currents in mature mouse inner hair cells. *J. Physiol.* 557, 613–633.
- Marrion, N.V., and Tavalin, S.J. (1998). Selective activation of Ca^{2+} -activated K^+ channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature* 395, 900–905.
- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *J. Cell Biol.* 161, 459–460.
- McManus, O.B., Helms, L.M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., and Leonard, R.J. (1995). Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 14, 645–650.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., and Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14066–14071.
- Meera, P., Wallner, M., and Toro, L. (2000). A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 5562–5567.
- Meredith, A.L., Thorneloe, K.S., Werner, M.E., Nelson, M.T., and Aldrich, R.W. (2004). Overactive Bladder and Incontinence in the Absence of the BK Large Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel. *J. Biol. Chem.* 279, 36746–36752.
- Michael T, Ramanathan K, Jones E M C, Fettiplace R, R, F., and Fuchs P A (1997). Functional expression of cochlear Slo potassium channels in HEK293 cells and Xenopus oocytes. *Biophys. J.* 72, 352.

- Michna, M., Knirsch, M., Hoda, J.-C., Muenkner, S., Langer, P., Platzer, J., Striessnig, J., and Engel, J. (2003). $\text{Ca}_v1.3$ ($\alpha 1D$) Ca^{2+} Currents in Neonatal Outer Hair Cells of Mice. *J. Physiol.* 553, 747–758.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313, 316–318.
- Morton-Jones, R.T., Cannell, M.B., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S., and Housley, G.D. (2006). Differential expression of ryanodine receptors in the rat cochlea. *Neurosci.* 137, 275–286.
- Navaratnam, D.S., Bell, T.J., Tu, T.D., Cohen, E.L., and Oberholtzer, J.C. (1997). Differential Distribution of Ca^{2+} -Activated K^+ Channel Splice Variants among Hair Cells along the Tonotopic Axis of the Chick Cochlea. *Neuron* 19, 1077–1085.
- Neef, J., Gehrt, A., Bulankina, A.V., Meyer, A.C., Riedel, D., Gregg, R.G., Strenzke, N., and Moser, T. (2009). The Ca^{2+} Channel Subunit 2 Regulates Ca^{2+} Channel Abundance and Function in Inner Hair Cells and Is Required for Hearing. *J. Neurosci.* 29, 10730–10740.
- Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J., and Lederer, W.J. (1995). Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Calcium Sparks. *Science* 270, 633–637.
- Nemzou N., R.M., Bulankina, A.V., Khimich, D., Giese, A., and Moser, T. (2006). Synaptic organization in cochlear inner hair cells deficient for the $\text{Ca}_v1.3$ ($\alpha 1D$) subunit of L-type Ca^{2+} channels. *Neurosci.* 141, 1849–1860.
- Nimigean, C.M., and Magleby, K.L. (2000). Functional Coupling of the $\beta 1$ Subunit to the Large Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channel in the Absence of Ca^{2+} : Increased Ca^{2+} Sensitivity from a Ca^{2+} -Independent Mechanism. *J. Gen. Physiol.* 115, 719–736.
- Niu, X., Qian, X., and Magleby, K.L. (2004). Linker-Gating Ring Complex as Passive Spring and Ca^{2+} -Dependent Machine for a Voltage- and Ca^{2+} -Activated Potassium Channel. *Neuron* 42, 745–756.
- Ogston, A.G. (1958). The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Trans. Faraday Soc.* 54, 1754–1757.
- Oliver, D., Knipper, M., Derst, C., and Fakler, B. (2003). Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J. Neurosci.* 23, 2141–2149.
- Oliver, D., Taberner, A.M., Thurm, H., Sausbier, M., Arntz, C., Ruth, P., Fakler, B., and Liberman, M.C. (2006). The Role of BK_{Ca} Channels in Electrical Signal Encoding in the Mammalian Auditory Periphery. *J. Neurosci.* 26, 6181–6189.
- Orio, P., and Latorre, R. (2005). Differential Effects of $\beta 1$ and $\beta 2$ Subunits on BK Channel Activity. *J. Gen. Physiol.* 125, 395–411.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., and Latorre, R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 17, 156–161.
- Pangršić, T., Reisinger, E., and Moser, T. (2012). Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci.* 35, 671–680.

- Pickles, J.O., and Corey, D.P. (1992). Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* 15, 254–259.
- Pickles, J.O., Comis, S.D., and Osborne, M.P. (1984). Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear. Res.* 15, 103–112.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca^{2+} Channels. *Cell* 102, 89–97.
- Puel, J.-L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog. Neurobiol.* 47, 449–476.
- Pujol, R., Lavigne-Rebillard, M., and Lenoir, M. (1998). Development of Sensory and Neural Structures in the Mammalian Cochlea. In *Development of the Auditory System*, E.W. Rubel, A.N. Popper, and R.R. Fay, eds. (New York, NY: Springer New York), 146–192.
- Pyott, S.J. (2004). Extrasynaptic Localization of Inactivating Calcium-Activated Potassium Channels in Mouse Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* 24, 9469–9474.
- Pyott, S.J., and Duncan, R.K. (2016). BK Channels in the Vertebrate Inner Ear. (Elsevier), 128, 369–399.
- Pyott, S.J., Meredith, A.L., Fodor, A.A., Vázquez, A.E., Yamoah, E.N., and Aldrich, R.W. (2007). Cochlear Function in Mice Lacking the BK Channel α , $\beta 1$, or $\beta 4$ Subunits. *J. Biol. Chem.* 282, 3312–3324.
- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.-L., Codd, E.E., and D'Andrea, M.R. (2002). Molecular Cloning and Characterization of the Human Voltage-Gated Calcium Channel $\alpha_2\delta$ -4 Subunit. *Mol. Pharmacol.* 62, 485–496.
- Ramanathan, K., Michael, T.H., Jiang, G.-J., Hiel, H., and Fuchs, P.A. (1999). A Molecular Mechanism for Electrical Tuning of Cochlear Hair Cells. *Science* 283, 215–217.
- Ramanathan, K., Michael, T.H., and Fuchs, P.A. (2000). β Subunits Modulate Alternatively Spliced, Large Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels of Avian Hair Cells. *J. Neurosci.* 20, 1675–1684.
- Reimann, F., and Ashcroft, F.M. (1999). Inwardly rectifying potassium channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 503–508.
- Roberts, W.M., Jacobs, R.A., and Hudspeth, A.J. (1990). Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.* 10, 3664–3684.
- Robitaille, R., and Charlton, M.P. (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12, 297–305.
- Rosenblatt, K.P., Sun, Z.-P., Heller, S., and Hudspeth, A.. (1997). Distribution of Ca^{2+} -Activated K^+ Channel Isoforms along the Tonotopic Gradient of the Chicken's Cochlea. *Neuron* 19, 1061–1075.
- Rothberg, B.S. (2012). The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling. *Protein Cell* 3, 883–892.

- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.-C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., et al. (2006). Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell* 127, 277–289.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25, 729–749.
- Ruel, J., Chen, C., Pujol, R., Bobbin, R.P., and Puel, J.L. (1999). AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig. *J. Physiol.* 518, 667–680.
- Ruffer, C. (2004). The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 135–144.
- Rusznák, Z., and Szűcs, G. (2009). Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 457, 1303–1325.
- Rutherford, M.A. (2015). Resolving the structure of inner ear ribbon synapses with STED microscopy. *Synap. N. Y.* N 69, 242–255.
- Rüttiger, L., Sausbier, M., Zimmermann, U., Winter, H., Braig, C., Engel, J., Knirsch, M., Arntz, C., Langer, P., and Hirt, B. (2004). Deletion of the Ca^{2+} -activated potassium (BK) α -subunit but not the BK β 1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 12922–12927.
- Ryan, A.F., and Woolf, N.K. (1983). Energy dispersive x-ray analysis of inner ear fluids and tissues during the ontogeny of cochlear function. *Scan. Electron Microsc.* 1, 201–207.
- Sakai, Y., Harvey, M., and Sokolowski, B. (2011). Identification and quantification of full-length BK channel variants in the developing mouse cochlea. *J. Neurosci. Res.* 89, 1747–1760.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 921–931.
- Sanderson, M.J., Smith, I., Parker, I., and Bootman, M.D. (2014). Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* 10.
- Santi, C.M., Ferreira, G., Yang, B., Gazula, V.-R., Butler, A., Wei, A., Kaczmarek, L.K., and Salkoff, L. (2006). Opposite Regulation of Slick and Slack K^+ Channels by Neuromodulators. *J. Neurosci.* 26, 5059–5068.
- Sausbier, M., Hu, H., Arntz, C., Feil, S., Kamm, S., Adelsberger, H., Sausbier, U., Sailer, C.A., Feil, R., and Hofmann, F. (2004). Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^+ channel deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 9474–9478.
- Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X.-B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C.A., et al. (2005). Elevated Blood Pressure Linked to Primary Hyperaldosteronism and Impaired Vasodilation in BK Channel–Deficient Mice. *Circulation.* 112, 60–68.
- Scheffer, D.I., Shen, J., Corey, D.P., and Chen, Z.-Y. (2015). Gene Expression by Mouse Inner Ear Hair Cells during Development. *J. Neurosci.* 35, 6366–6380.
- Schmidt, R.F., Lang, F., and Heckmann, M. (2005). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie* (Heidelberg: Springer).

- Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* 262, 647–661.
- Schreiber, M., and Salkoff, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* 73, 1355.
- Schreiber, M., Yuan, A., and Salkoff, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat. Neurosci.* 2, 416.
- Shen, K.-Z., Lagrutta, A., Davies, N.W., Standen, N.B., Adelman, J.P., and North, R.A. (1994). Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in Xenopus oocytes: Evidence for tetrameric channel formation. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 426, 440–445.
- Shipston, M.J. (2001). Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular excitability. *Trends Cell Biol.* 11, 353–358.
- Shrestha, B.R., Chia, C., Wu, L., Kujawa, S.G., Liberman, M.C., and Goodrich, L.V. (2018). Sensory Neuron Diversity in the Inner Ear Is Shaped by Activity. *Cell* 174, 1229–1246.
- Sigworth, F.J. (2003). Life's transistors. *Nature* 423, 21–22.
- Simmons, D.D. (2002). Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J. Neurobiol.* 53, 228–250.
- Singh, H., Stefani, E., and Toro, L. (2012). Intracellular BK_{Ca} (BK_{Ca}) channels. *J. Physiol.* 590, 5937–5947.
- Skinner, L.J., Enée, V., Beurg, M., Jung, H.H., Ryan, A.F., Hafidi, A., Aran, J.-M., and Dulon, D. (2003). Contribution of BK Ca²⁺-Activated K⁺ Channels to Auditory Neurotransmission in the Guinea Pig Cochlea. *J. Neurophysiol.* 90, 320–322.
- Slater, G.W., and Noolandi, J. (1988). Electric field gradients and band sharpening in DNA gel electrophoresis. *Electrophoresis* 9, 643–646.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000.
- Solaro, C.R., and Lingle, C.J. (1992). Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* 257, 1694–1698.
- Soom, M., Gessner, G., Heuer, H., Hoshi, T., and Heinemann, S.H. (2008). A mutually exclusive alternative exon of slo1 codes for a neuronal BK channel with altered function. *Channels Austin Tex* 2, 278–282.
- Souter, M., and Forge, A. (1998). Intercellular junctional maturation in the stria vascularis: possible association with onset and rise of endocochlear potential. *Hear. Res.* 119, 81–95.
- Spoendlin, H. (1969). Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 67, 239–254.
- Stefanini, M., De Martino, C., and Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173–174.

- Steward, O., and Levy, W.B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2, 284–291.
- Steward, O., and Reeves, T.M. (1988). Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J. Neurosci.* 8, 176–184.
- Stumpff, F., Georgi, M.-I., Mundhenk, L., Rabbani, I., Fromm, M., Martens, H., and Günzel, D. (2011). Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J. Exp. Biol.* 214, 2871–2882.
- Swartz, K.J. (2004). Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 905–916.
- Takeuchi, S., Ando, M., and Kakigi, A. (2000). Mechanism Generating Endocochlear Potential: Role Played by Intermediate Cells in Stria Vascularis. *Biophys. J.* 79, 2572–2582.
- Thurm, H., Fakler, B., and Oliver, D. (2005). Ca^{2+} -independent activation of BK_{Ca} channels at negative potentials in mammalian inner hair cells: Ca^{2+} -independent gating of BK_{Ca} channels. *J. Physiol.* 569, 137–151.
- Tongiorgi, E., Righi, M., and Cattaneo, A. (1997). Activity-Dependent Dendritic Targeting of BDNF and TrkB mRNAs in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 17, 9492–9505.
- Tseng-Crank, J., Foster, C.D., Krause, J.D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T.J., and Reinhart, P.H. (1994). Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca^{2+} -activated K^+ channel isoforms from human brain. *Neuron* 13, 1315–1330.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285–293.
- Turksen, K., and Troy, T.-C. (2004). Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117, 2435–2447.
- Vergara, C., and Latorre, R. (1983). Kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca^{2+} and Ba^{2+} blockade. *J. Gen. Physiol.* 82, 543–568.
- Vergara, C., Moczydlowski, E., and Latorre, R. (1984). Conduction, Blockade and Gating in a Ca^{2+} -activated K^+ Channel Incorporated into Planar Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 45, 73–76.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., and Adelman, J.P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 321–329.
- Vincent, P.F.Y., Bouleau, Y., Charpentier, G., Emptoz, A., Safieddine, S., Petit, C., and Dulon, D. (2017). Different $\text{Ca}_V1.3$ Channel Isoforms Control Distinct Components of the Synaptic Vesicle Cycle in Auditory Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* 37, 2960–2975.
- Vivas, O., Moreno, C.M., Santana, L.F., and Hille, B. (2017). Proximal clustering between BK and $\text{Ca}_V1.3$ channels promotes functional coupling and BK channel activation at low voltage. *eLife* 6, e28029.
- Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. (1996). Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca^{2+} -sensitive K^+ channels: An additional transmembrane region at the N terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 14922–14927.
- Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage

- and Ca^{2+} -activated K^+ channels: A transmembrane β -subunit homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4137–4142.
- Wang, B., Rothberg, B.S., and Brenner, R. (2006). Mechanism of $\beta 4$ Subunit Modulation of BK Channels. *J. Gen. Physiol.* **127**, 449–465.
- Wang, S., Yoo, S., Kim, H.y. Wang, M., Zheng, C., Parkhouse, W., Krieger, C., Harden, N. (2015). Detection of In Situ Protein-protein Complexes at the Drosophila Larval Neuromuscular Junction Using Proximity Ligation Assay. *J. Vis. Exp.* **95**, e52139.
- Wang, Y.-W., Ding, J.P., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2002). Consequences of the Stoichiometry of Slo1 α and Auxiliary β Subunits on Functional Properties of Large-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channels. *J. Neurosci.* **22**, 1550–1561.
- Wangemann, P. (2006). Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J. Physiol.* **576**, 11–21.
- Weaver, A.K., Liu, X., and Sontheimer, H. (2004). Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **78**, 224–234.
- Weiger, T.M., Holmqvist, M.H., Levitan, I.B., Clark, F.T., Sprague, S., Huang, W.-J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M.E., et al. (2000). A Novel Nervous System β Subunit that Downregulates Human Large Conductance Calcium-Dependent Potassium Channels. *J. Neurosci.* **20**, 3563–3570.
- Werner, M.E., Zvara, P., Meredith, A.L., Aldrich, R.W., and Nelson, M.T. (2005). Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J. Physiol.* **567**, 545–556.
- Wilcox, E.R., Burton, Q.L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T.N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N.A., and Morell, R.J. (2001). Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* **104**, 165–172.
- Winter, H., Braig, C., Zimmermann, U., Engel, J., Rohbock, K., and Knipper, M. (2007). Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ is a critical regulator for the expression of ion channels during final differentiation of outer hair cells. *Histochem.* **128**, 65–75.
- Wong, A.B., Rutherford, M.A., Gabrielaitis, M., Pangršič, T., Göttfert, F., Frank, T., Michanski, S., Hell, S., Wolf, F., Wichmann, C., et al. (2014). Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca^{2+} influx to exocytosis. *EMBO J.* **33**, 247–264.
- Wu, Y., Yang, Y., Ye, S., and Jiang, Y. (2010). Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca^{2+} -gated K^+ channel. *Nature* **466**, 393–397.
- Xia, X.-M., Ding, J.P., and Lingle, C.J. (1999). Molecular Basis for the Inactivation of Ca^{2+} - and Voltage-Dependent BK Channels in Adrenal Chromaffin Cells and Rat Insulinoma Tumor Cells. *J. Neurosci.* **19**, 5255–5264.
- Xia, X.-M., Ding, J.-P., Zeng, X.-H., Duan, K.-L., and Lingle, C.J. (2000). Rectification and Rapid Activation at Low Ca^{2+} of Ca^{2+} -Activated, Voltage-Dependent BK Currents: Consequences of Rapid Inactivation by a Novel β Subunit. *J. Neurosci.* **20**, 4890–4903.
- Xia, X.-M., Zeng, X., and Lingle, C.J. (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 880–884.

- Yan, J., and Aldrich, R.W. (2010). LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* **466**, 513–516.
- Yan, J., and Aldrich, R.W. (2012). BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 7917–7922.
- Yang, C., Gonzalez-Perez, V., Mukaibo, T., Melvin, J.E., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2017). Knockout of the LRRC26 subunit reveals a primary role of LRRC26-containing BK channels in secretory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E3739–E3747.
- Yang, C., Zeng, X.-H., Zhou, Y., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2011). LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19419–19424.
- Ben-Yosef, T. (2003). Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2049–2061.
- Yu, S.P., Yeh, C.-H., Sensi, S.L., Gwag, B.J., Canzoniero, L.M.T., Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S., Tian, M., Dugan, L.L., and Choi, D.W. (1997). Mediation of Neuronal Apoptosis by Enhancement of Outward Potassium Current. *Science* **278**, 114–117.
- Yuan, P., Leonetti, M.D., Pico, A.R., Hsiung, Y., and MacKinnon, R. (2010). Structure of the Human BK Channel Ca^{2+} -Activation Apparatus at 3.0 Å Resolution. *Science* **329**, 182–186.
- Zarei, M.M., Eghbali, M., Alioua, A., Song, M., Knaus, H.-G., Stefani, E., and Toro, L. (2004). An endoplasmic reticulum trafficking signal prevents surface expression of a voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channel splice variant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 10072–10077.
- Zeng, X., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2008). Species-specific Differences among KCNMB3 BK β 3 Auxiliary Subunits: Some β 3 N-terminal Variants May Be Primate-specific Subunits. *J. Gen. Physiol.* **132**, 115–129.
- Zeng, X.-H., Benzinger, G.R., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2007). BK Channels with β 3a Subunits Generate Use-Dependent Slow Afterhyperpolarizing Currents by an Inactivation-Coupled Mechanism. *J. Neurosci.* **27**, 4707–4715.
- Zeng, X.-H., Yang, C., Kim, S.T., Lingle, C.J., and Xia, X.-M. (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K^+ current in mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5879–5884.
- Zenner, H.P., Zimmermann, U., and Schmitt, U. (1985). Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear. Res.* **18**, 127–133.
- Zhang, J., and Yan, J. (2014). Regulation of BK channels by auxiliary γ subunits. *Front. Physiol.* **5**, 401.
- Zhang, Y.-Y., Han, X., Liu, Y., Chen, J., Hua, L., Ma, Q., Tang, Q.-Y., and Zhang, Z. (2018). mRNA expression of LRRC55 protein (leucine-rich repeat-containing protein 55) in the adult mouse brain. *PLoS One* **13**, e0191749.
- Zheng, J., Shen, W., He, D.Z.Z., Long, K.B., Madison, L.D., and Dallos, P. (2000). Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* **405**, 149–155.
- Zhou, Y., Yang, H., Cui, J., and Lingle, C.J. (2017). Threading the biophysics of mammalian Slo1 channels onto structures of an invertebrate Slo1 channel. *J. Gen. Physiol.* **149**, 985–1007.

6 Anhang

6.1 DNA-Längenstandards für Transkriptanalysen mit *nested PCR*

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die DNA-Marker, die in den Transkriptanalysen (s. Ergebnisse, Kap. 3.2) verwendet wurden.

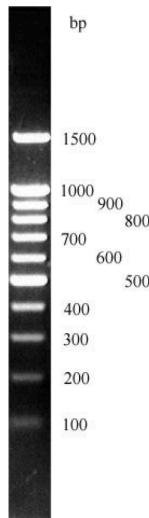


Abbildung 47: DNA-Marker 100 bp Plus Blue

Der 100 bp Plus Blue DNA-Marker (Konzentration 0,1 µg/µl; Anwendung 0.25 – max. 1.0 µg/ Spur in 1.2 - 2.0 % Agarose) besteht aus einem Gemisch von 11 einzelnen chromatographisch aufgereinigten DNA-Fragmenten mit definierten Größenstandards von 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 Basenpaaren. Die durch einen erhöhten DNA-Gehalt deutlich verstärkten 1000 bp- und 500 bp-Banden erleichtern die Orientierung. Die Lieferung erfolgt 'ready-to-use' in Ladepuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM NaCl; 1 mM EDTA inklusive einem blauen Tracking-Farbstoff).

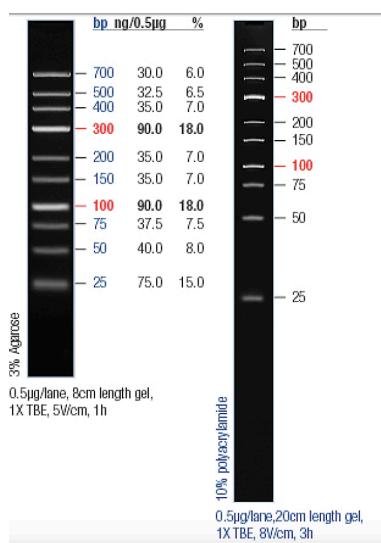


Abbildung 48: DNA-Marker *peqGOLD Ultra Low Range II*

Der *peqGOLD Ultra Low Range* DNA-Marker II (Konzentration 0,1 mg DNA/ml; Anwendung 1 µl/mm Spurbreite in 2.5 – 3 % Agarose) besteht aus einem Gemisch von 10 einzelnen chromatographisch aufgereinigten DNA-Fragmenten mit definierten Größenstandards von 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50 und 25 Basenpaaren. Die durch einen erhöhten DNA-Gehalt deutlich verstärkten 300 bp- und 100 bp-Banden erleichtern die Orientierung. Die Lieferung erfolgt 'ready-to-use' in Ladepuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.005 % Bromphenolblau, 0.005 % Xylencyanol und 10 % Glycerin).

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben!

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. Jutta Engel für die kompetente Betreuung meines interessanten Forschungsthemas und dafür, dass sie mich bei all meinen Fragen und Ideen so hervorragenden unterstützt hat. Bei Frau Prof. Dr. Carola Meier bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur und die Unterstützung während meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Martin Jung für die Synthese des LRRC52-Antikörpers, der für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich war, und Martin für seinen fortwährenden humorvollen Zuspruch. Ein großes Dankeschön geht außerdem an Frau Prof. Dr. Barbara A. Niemeyer und Frau Dr. Dalia Alansary für die Mithilfe bei molekularbiologischen Fragestellungen sowie für die lehrreichen Diskussionsrunden. Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter Ruth danke ich für die Bereitstellung der BK-KO-Mäuse und für die geistreichen Anregungen in angenehmer Atmosphäre. Mein Dank gilt weiterhin der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Petra Weisgerber, die Gefrierschnitten von Maushoden zur Verfügung gestellt haben. Bei Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi und Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann bedanke ich mich für die Bereitstellung des Sec62-Antikörpers. Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Stefan Münker für die Hilfe bei komplexen technischen und physikalischen Fragestellungen und vor allem für das Korrekturlesen und den Zuspruch bezüglich dieser Arbeit.

Ich bedanke mich außerdem bei der *International Research and Training Group 1830* für die Möglichkeit meines halbjährigen Kanada-Aufenthalts, insbesondere bei Frau Dr. Gabriele Amoroso und Frau Malika Mounassib. Meinen IRTG-Mädels und besonders Laura danke ich für die unvergessliche Zeit in Edmonton und für jedes offene Ohr. *Thanks to the lab of Prof. Dr. Joe Casey for the cordially support during my research stay abroad and a special thank to Darpan who made my stay absolutely amazing (#friendsforever#noboundaries).*

Besonders danke ich allen „Engels“ die mich während meiner Promotion unterstützt haben und für die vielen gemeinsamen Leckereien und humorvollen Augenblicke. Die interessante Zeit mit euch wird unvergessen bleiben! Herzlich möchte ich auch allen Tierfiegern für die wundervolle Betreuung der Mäuse danken.

Mein tiefer Dank geht an meine Familie und alle meine Freunde für die Unterstützung und Motivation. Besonders danke ich Anna (#fts), Ela, Krissi, Lima, Nina, Phili und Sabine, dass sie nie aufgehört haben an mich zu glauben wenn ich mal den Mut verloren hatte.

Von Herzen danke ich meinem Mann Marcel ohne den ich in der Schreibphase zeitweise wohl - man glaubt es kaum;) - verhungert wäre. Ich danke ihm für sein endloses Verständnis, seine fortwährende Motivation und seinen unermüdlichen Glauben an mich und dafür, dass er jeden Tag an meiner Seite ist.

Danke!

Publikationen, Konferenzbeiträge und Forschungsaufenthalte

Publikationen

Die Daten dieser Arbeit sind zum jetzigen Zeitpunkt vollständig ausreichend für die Publikation in einer internationalen Fachzeitschrift. Das Manuskript wurde am 18.03.2019 bei der Zeitschrift „*The FASEB Journal*“ eingereicht und befindet sich in positiver Revision.

Lang I., Jung M., Niemeyer B.A., Ruth P. and Engel J. *Expression of the LRRC52 γ Subunit (γ2) May Provide Ca²⁺-Independent Activation of BK Currents in Mouse Inner Hair Cells.*

Für die Daten eines Projekts zu *RIM-binding proteins* wurde von I. Lang die cDNA von inneren und äußeren Haarsinneszellen gewonnen und zur Verfügung gestellt. Die von den Autoren erhobenen Daten sind zum jetzigen Zeitpunkt vollständig ausreichend für die Publikation in einer internationalen Fachzeitschrift. Das Manuskript befindet sich in Vorbereitung.

Ortner N., Pinggera A., Hofer N., Siller A., Brandt N., Schraffl A., **Lang I., Blum K., Stefan E., Obermair G., Engel J. and Striessnig J. *RBP stabilizes physiological gating properties of Ca_v1.3 Ca²⁺channels typical for cochlear inner hair cells.***

Konferenzbeiträge

Lang I., Jung M., Niemeyer B.A., Ruth P. and Engel J. (2019) *Expression of the BK Channel γSubunit LRRC52 (γ2) in Mouse Inner Hair Cells and the „BK Channel Activation Paradox“*
Poster presented at the 42th Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, MA, USA

Lang I., Niemeyer B., Fell B., Engel J. (2017) *Expression of BK channel γSubunits LRRC26 and LRRC52 in Inner Hair Cells.* Poster presented at the 54th Workshop on Inner Ear Biology and Symposium, Hannover

Lang I., Niemeyer B., Fell B., Engel J. (2016) *Evolutionary Change of BK Channel Function in Mammalian Inner Hair Cells.* Poster presented at the Linking Evolution and Development of the Auditory System, Delmenhorst

Lang I., Niemeyer B., Fell B., Engel J. (2015) *Are Members of the LRRC Protein Family Expressed in Mammalian Inner Hair Cells?* Poster presented at the 2nd European Calcium Channel Conference, Alpbach, Österreich

Lang I., Fell B., Münkner S., Engel J. (2015) *BK Channels are not the Target of the NO-cGMP Signaling Cascade in Mouse Inner Hair Cells*. Poster presented at the 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen

Lang I., Fell B., Münkner S., Engel J. (2015) *BK Channels are not the Target of the NO-cGMP Signaling Cascade in Mouse Inner Hair Cells*. Poster presented at the 35th Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, MA, USA

Lang I., Fell B., Münkner S., Engel J. (2014) *Effects of cGMP on BK Currents and Subcellular Distribution of BK Channels in Mature Mouse Inner Hair Cells*. Poster presented at the 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society (DPG), Mainz

Konferenzbeiträge und Forschungsaufenthalte

im Rahmen des Deutsch-Kanadischen Graduiertenkollegs IRTG 1830 der Universität Kaiserslautern, der Universität des Saarlandes und der University of Alberta, Canada

Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joe Casey, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine & Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada (07-12/2015)

Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Isabelle Brunette, Department of Ophthalmology, Centre de Recherche Hôpital-Maison-Neuve-Rosemont, University of Montreal, Quebec, Canada (12/2015)

Lang I., Niemeyer B., Fell B., Engel J. (2015) *Are Members of the LRRC Protein Family Expressed in Mammalian Inner Hair Cells?* Poster presented at the 2nd Network Meeting SFB 807/TRAM & IRTG 1830, Kaiserslautern

Lang I. (2014) *Are Members of the LRRC Protein Family Expressed in Mammalian Inner Hair Cells?* 2nd Colloquium of the German IRTG members, Orscholz

Lang I., Fell B., Münkner S., Engel J. (2014) *Effects of cGMP on BK Currents and Subcellular Distribution of BK Channels in Mature Mouse Inner Hair Cells*. Poster presented at the 3rd Joint Symposium, Banff, Alberta, Canada

Lang I., Fell B., Münkner S., Engel J. (2013) *BK Channels in Mouse Inner Hair Cells (IHC)*. 2nd Joint Symposium, Ebernburg, Bad Münster am Stein